

# **Beteiligung von Proteinen der Bcl-2-Familie an Apoptosevorgängen im kardiovaskulären System**



Kumulative Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Dipl. Biochem. Babett Bartling

geb. am: 18.09.1972 in: Wernigerode

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Jürgen Holtz, Halle
2. Dr. rer. nat. Sabine Rospert, Halle
3. Prof. Dr. rer. nat. Markus Hecker, Göttingen

Verteidigung am 22. November 2001, Halle/Saale

**urn:nbn:de:gbv:3-000002696**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000002696>]

## Referat und bibliographische Beschreibung

Im Endstadium der Herzinsuffizienz ist das hämodynamisch überlastete Myokard durch die Zunahme der ventrikulären Wandspannung und eine akute Überforderung seiner funktionellen Reserve gekennzeichnet. Dabei scheint an der Entwicklung der Herzerkrankung ein vermehrt auftretender Zelltod von Kardiomyozyten durch Apoptose beteiligt zu sein. Da das Ausmaß der Apoptose im erkrankten Myokard und die zugrunde liegenden Mechanismen nur sehr unvollständig verstanden sind, war das Ziel der Arbeit, die Expression von Apoptose-regulierenden Proteinen der Bcl-2-Familie im terminal erkrankten Myokard zu untersuchen.

Das explantierte Überlastmyokard ist durch eine dehnungsinduzierte Aktivierung des atrialen natriuretischen Faktors (Pro-ANF-mRNA) und durch eine veränderte Expression von funktionellen Determinanten der myozytären Kalziumhomöostase (sarkoplasmatisch retikuläre (SR)  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, sarkolemmaler  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher) gekennzeichnet. Im Vergleich zum nichttransplantierten Spendermyokard wurde eine erhöhte myokardiale Apoptoserate bei Herzinsuffizienz bestätigt. Die verstärkte Apoptose im humanen Myokard geht mit einer verminderten Expression des antiapoptotischen Bcl-2-homologen Bcl-x<sub>L</sub> einher. Durch pharmakologische Entlastung des erkrankten Herzens mit Inhibitoren des Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) oder eine mechanische Entlastungstherapie durch Implantation eines Ventrikulären Unterstützungssystems (VAD) wurde eine partielle Normalisierung der Bcl-x<sub>L</sub>-Expression beobachtet. Neben Bcl-x<sub>L</sub> deutet eine normalisierte Expression des antiapoptotischen Bcl-2 unter ACE-Hemmerbehandlung auf die kardioprotektive Wirkung der ACE-Inhibitoren im Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz hin. Während unter VAD auch ein Rückgang der myokardialen Apoptose eintrat, konnte für die Determinanten der myozytären Kalziumhomöostase keine signifikante mRNA-Expressionserhöhung der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase im Vergleich zum  $\text{Na}^+$  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenaustauscher beobachtet werden. Jedoch zeichnete sich eine Subgruppe von Patienten mit einer etwas weniger schlechten Herzfunktion vor der VAD-Implantation sowie einer verbesserten mRNA-Expression von antiapoptotischen Bcl-2-Homologen unter VAD durch eine partielle Reexpression der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase per  $\text{Na}^+$  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenaustauscher aus. Die Daten zeigen die Korrigierbarkeit der bei Herzinsuffizienz verminderten myokardialen Expression von Proteinen der Bcl-2-Familie durch Entlastungstherapie mit einer Veränderung des Expressionsgleichgewichtes zur Apoptosehemmung.

Ursache für die Entstehung der Herzinsuffizienz kann eine lokale Minderdurchblutung des Myokards (Hypoperfusion) bis hin zur Ischämie und zum Herzinfarkt durch einen totalen Koronarverschluss sein. Das Myokard ist dennoch in der Lage, sich unter einer definierten, lokalen Hypoperfusion durch eine regional verminderte Kontraktilität (*Hibernation*) an die Mangelversorgung anzupassen. Daher wurde am Schwein untersucht, ob eine erhöhte myokardiale Expression von kardioprotektiven Determinanten an der Vermittlung des *Hibernation*-Zustandes beteiligt ist. Da im Modell zur Kurzzeit-*Hibernation* weder für das antiapoptotische Bcl-x<sub>L</sub> noch für das induzierbare Hsp70 eine myokardiale mRNA-Expressionserhöhung unter Hypoperfusion und nachfolgender Reperfusion beobachtet werden konnte, deutet dies auf eine hinreichende funktionelle und metabolische Anpassung des Myokards durch *Hibernation* hin, um eine Gefährdung der Kardiomyozyten zu verhindern.

Die ausreichende Durchblutung des Herzmuskels hängt unmittelbar mit einer intakten Funktion des Gefäßendothels der Koronararterien zusammen. Das Endothel übt über eine durch den Blutstrom erzeugte, Schubspannungs-induzierte Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) in allen arteriellen Gefäßen eine Schutzfunktion mit Dilatation der Arterien und Arteriolen aus. Zur Applikation von Schubspannung auf kultivierte humane Endothelzellen

wurde das Modell des Plattenkegelviskosimeters etabliert. Arterielle laminare Schubspannung verringert dabei die Apoptoserate von Endothelzellen, die mit einer NO-abhängigen Induktion der Bcl-x<sub>L</sub>-Expression einhergeht.

Bartling, B. Beteiligung von Proteinen der Bcl-2-Familie an Apoptosevorgängen im kardiovaskulären System. *Univ., Math.-Nat.-Tech. Fak., Diss.*, 56 Seiten, Halle, 2001

## Abkürzungen, Erläuterungen

Abb.	Abbildung	
ACE	Angiotensin-Konversionsenzym	<i>angiotensin-converting enzyme</i>
ACE-I	ACE-Inhibitoren	
ANF	atrialer natriuretischer Faktor	<i>atrial natriuretic peptide, ANP</i>
AIF	Apoptose-induzierender Faktor	<i>apoptosis-inducing factor</i>
Apaf-1	Caspase-aktivierender Faktor	<i>apoptotic protease-activating factor</i>
ANT	ADP/ATP-Nukleotidtranslokator	<i>adenine nucleotide translocator</i>
ADP	Adenosindiphosphat	
ATP	Adenosintriphosphat	
Bad	proapoptotisches Bcl-2-Homolog	<i>Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub>-associated death promotor</i>
Bax	proapoptotisches Bcl-2-Homolog	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bak,	proapoptotisches Bcl-2-Homolog	<i>Bcl-2-homologous antagonist/killer</i>
Bcl-2	B-Zell-Lymphoma-Gen-2	<i>B cell lymphoma gene-2</i>
BH	Bcl-2-Homologiedomäne	<i>Bcl-2 homology domain</i>
Bid	proapoptotisches Bcl-2-Homolog	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
Bik	proapoptotisches Bcl-2-Homolog	<i>Bcl-2-interacting killer</i>
BNP	im Gehirn vorkommendes natriuretisches Peptid	<i>brain natriuretic peptide</i>
bp	Basenpaar	<i>basepair</i>
CAD	Caspase-aktivierte Desoxyribonuklease	<i>caspase-activated deoxyribonuclease</i>
CAD	Koronare Herzkrankheit	<i>coronary artery disease</i>
CARD	Caspasebindungsdomäne	<i>caspase recruitment domain</i>
Caspase	Cystein- Aspartat-spezifische Protease	<i>cystein aspartat-specific protease</i>
Caspase-3	CPP32/Yama/Apopain	
Caspase-8	MACH/FLICE/Mch5	
Caspase-9	ICE-LAP6/Mch6	
cDNA	DNA-Kopie eines RNA-Moleküls	<i>copy DNA</i>
CED	<i>C. elegans</i> Todesprotein	<i>C. elegans death protein</i>
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat	<i>cyclic guanidinium monophosphate</i>
CI	Kardialer Index, $\text{HZV} \cdot \text{Körperoberfläche}^{-1}$ , $\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$	<i>cardiac index</i>
Cyt c	Cytochrom c	
DCM	Dilatative Kardiomyopathie	<i>dilated cardiomyopathy</i>
DD	Todesdomäne	<i>death domain</i>
DED	Todeseffektordomäne	<i>death effector domain</i>
DFF	DNA-Fragmentierungsfaktor	<i>DNA fragmentation factor</i>
DISC	Apoptose-induzierender Signalkomplex	<i>death-induced signaling complex</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure, DNS	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DR	Todesrezeptor	<i>death receptor</i>
EDP	enddiastolischer Füllungsdruck, mmHg	<i>end-diastolic pressure</i>
EDRF	Endothel-relaxierender Faktor, Sickoxid, NO	<i>endothelium-derived relaxing factor</i>
ecNOS	endotheliale NO-Synthase	<i>endothelial cell NO synthase</i>

EF	Ejektions- (Auswurf-) Fraktion des Ventrikels, %	<i>ejection fraction</i>
FADD	Fas-assoziierte Todesdomäne	<i>Fas-associated death domain</i>
Fas	FS7-assoziiertes Zelloberflächenantigen	<i>FS7-associated cell surface antigen</i>
FasL	Fas-Ligand, CD95L	<i>Fas ligand</i>
FLIP	FLICE-inhibierendes Protein	<i>FLICE-inhibitory protein</i>
FLICE	FADD-ähnliche Protease, Caspase-8	<i>FADD-like ICE/Ced-3-like protease</i>
<i>et al.</i>	und andere	
Hrk	proapoptotisches Bcl-2-Homolog	<i>harakiri</i>
Hsp	Hitzeschockprotein	<i>heat shock protein</i>
HSP	Stressproteine der Hitzeschockfamilie	<i>heat shock family of stress protein</i>
HUVEC	humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
HZV	Herzzeitvolumen, l·min <sup>-1</sup>	<i>cardiac output, CO</i>
IAP	Caspaseinhibitor	<i>inhibitor of apoptosis proteins</i>
ICAD	CAD-Inhibitor	<i>inhibitor of CAD</i>
IL	Interleukin	
iNOS	induzierbare NO-Synthase	<i>inducible NO synthase</i>
Jak/Stat	Jak/Stat-Signaltransduktionsweg	<i>Janus kinase/signal transducer and activator of transcription</i>
kb	Kilobasen	<i>kilobases</i>
LAD	links anterior hervorgehenden Koronararterie	<i>left anterior descending coronary artery</i>
L-NNA	N <sup>o</sup> -Nitro-L-Arginin	
LARD	Apo3, WSL-1, TRAMP	<i>lymphoid associated receptor of death domain</i>
LIF-R	Rezeptorkomponente für Zytokine der IL-6-Familie	<i>leukemia-inhibitory factor receptor</i>
LV	linker Ventrikel	
LVAD	linksventrikuläres Unterstützungssystem	<i>left ventricular assist device</i>
Mcl-1	antiapoptotisches Bcl-2-Homolog	<i>myeloid cell leukemia-1</i>
mRNA	Boten-RNA	<i>messenger RNA</i>
NADPH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat	
NMR	Kernresonanz	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NBT/BCIP	Nitroblau-Tetrazolium/5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat	
NF-κB	Kernfaktor-κB	<i>nuclear factor-κB</i>
NO	Stickstoffmonoxid	<i>nitric oxide</i>
oxLDL	oxidiertes Lipoprotein geringer Dichte	<i>oxidized low density lipoproteins</i>
PARP	Poly-(ADP)-Ribosepolymerase	<i>poly (ADP) ribose polymerase</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion	<i>polymerase chain reaction</i>
PCWP	pulmonal-kapillärer Verschlussdruck, mmHg	<i>pulmonary capillary wedge pressure</i>
PIGs	p53-induzierte Gene	<i>p53-induced genes</i>
PT	Permeabilitätstransition	<i>permeability transition</i>

PTP	Mitochondrialer Megakanal	<i>permeability transition pore</i>
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	
Rel	<i>ppGpp</i> -Synthetase	
rel. U	relative Einheit	<i>relative unit</i>
RNA	Ribonukleinsäure, RNS	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Reverse Transkription	<i>reverse transcription</i>
RV	rechter Ventrikel	
RVAD	rechtsventrikuläres Unterstützungssystem	<i>right ventricular assist device</i>
<i>tdT</i>	terminale Desoxynukleotidtransferase	<i>terminal deoxynucleotidyltransferase</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor	<i>tumor necrosis factor</i>
TNF-R1	TNF-Rezeptor1, CD120a/p55	
TUNEL	<i>tdT</i> -vermittelte dUTP-Markierung	<i>tdT-mediated dUTP nick end-labeling</i>
S	Septum	
SERCA	sarkoplasmatische Ca <sup>2+</sup> -ATPase	
SOLVD	klinische Studie zur Analyse der Herzinsuffizienz	<i>studies of left ventricular dysfunction</i>
SR	sarkoplasmatisches Retikulum	
Stat	Stat-Transkriptionsfaktor	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
VAD	Ventrikuläres Unterstützungssystem	<i>ventricular assist device</i>
VDAC	spannungsabhängiger Anionenkanal	<i>voltage-dependent anion channel</i>
vgl.	vergleiche	
<i>zool.</i>	zoologisch	

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
Referat und bibliographische Beschreibung	ii
Abkürzungen, Erläuterungen	iv
Inhaltsverzeichnis	vii
1. Einführung	1
1.1. Pathophysiologische Aspekte der Herzinsuffizienz	1
1.2. Charakterisierung und Bedeutung des Zelltodes durch Apoptose	9
1.3. Apoptoseregulation durch Proteine der Bcl-2-Familie	16
1.4. Fragestellung der Arbeit: Bedeutung von Proteinen der Bcl-2-Familie im kardiovaskulären System?	22
2. Expression von Proteinen der Bcl-2-Familie im Myokard von Patienten mit terminaler Herzerkrankung	22
2.1. Ausmaß der myokardialen Apoptose in der terminalen Herzinsuffizienz	22
2.2. Expression von Proteinen der Bcl-2-Familie im terminal insuffizienten menschlichen Myokard	24
2.3. Einfluss von therapeutischer Behandlung auf die Abnahme des ventrikulären „Wandstress“ und die myokardiale Expression der Bcl-2-ähnlichen Proteine	26
2.4. Modell zur Beteiligung von Proteinen der Bcl-2-Familie bei der Manifestation der Herzinsuffizienz	28
3. Expression von Proteinen der Bcl-2-Familie im <i>hibernating</i> Myokard am Tiermodell des Schweins ( <i>Sus scrofa</i> )	32
3.1. Apoptose im hypoperfundierten Myokard und nach Reperfusion	32
3.2. Charakterisierung der <i>Sus scrofa</i> cDNA-Sequenzen von Bcl-x <sub>L</sub> und Bak	34
3.3. mRNA-Expression von Proteinen der Bcl-2-Familie im Kurzzeit- <i>hibernating</i> und <i>stunned</i> Myokard	35
4. Einfluss der laminaren Schubspannung auf die Apoptoseinduktion in humanen Endothelzellen	36
4.1. Bedeutung des Gefäßendothels bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen	36
4.2. Verminderte Apoptoseinduktion und veränderte Expression Bcl-2-ähnlicher Proteine durch laminare Schubspannung in humanen Endothelzellen	38
5. Zusammenfassung	41
5.1. Klinische Studien	41
5.2. Experimentelle Studien	42

6. Literaturverzeichnis	44
7. Veröffentlichte Originalarbeiten	56
7.1. Myocardial gene expression of regulators of myocyte apoptosis and myocyte calcium homeostasis during hemodynamic unloading by ventricular assist devices in patients with end-stage heart failure Bartling, B., Milting, H., Schumann, H., Darmer, D., Arusoglu, L., Körner, M.M., El-Banayosy, A., Körfer, R., Holtz, J., Zerkowski, H.-R. <i>Circulation</i> 100 (Suppl. II), II-216-II-223, 1999	
7.2. Quantification of cardioprotective gene expression in porcine short-term hibernating myocardium Bartling, B., Hoffmann, J., Schulz, R., Heusch, G., Holtz, J., Darmer, D. <i>Journal of Molecular and Cellular Cardiology</i> 31, 147-158, 1999	
7.3. Shear stress-dependent expression of apoptosis-regulating genes in endothelial cells Bartling, B., Tostlebe, H., Darmer, D., Holtz, J., Silber, R.E., Morawietz, H. <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> 278, 740-746, 2000	
Anhang	
Danksagung	ix
Eidesstattliche Erklärung	x
Lebenslauf	xi

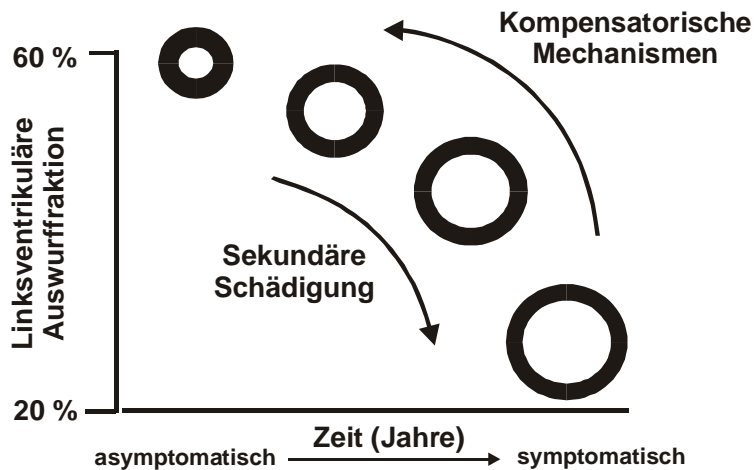


# 1. Einführung

## 1.1. Pathophysiologische Aspekte der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz zählt zu den häufigsten Erkrankungen mit zunehmender Inzidenz (Cowie *et al.*, 1997). Ihre Prognose ist trotz medikamentöser Therapie äußerst schlecht und mit der vieler Krebserkrankungen vergleichbar (Ho *et al.*, 1993). Die Herzinsuffizienz stellt dabei keine distinkte Erkrankung sondern vielmehr einen Komplex vieler klinischer Krankheitsbilder dar. Demnach erfolgt die Definition der kardialen Dysfunktion unter Berücksichtigung des gesamten kardiovaskulären Systems. Im Allgemeinen spricht man von einer Herzinsuffizienz, wenn bei ausreichendem Blutstrom aus der Peripherie sowie ausreichendem enddiastolischen Füllungsdruck das Herz nicht mehr in der Lage ist, das vom Organismus benötigte Herzzeitvolumen zu fördern (Denolin *et al.*, 1983). Dieses Missverhältnis von vermindertem Angebot aber gleichbleibendem Bedarf verursacht die Aktivierung neurohumoraler Kompensationsmechanismen, die zunächst eine ausreichende Organperfusion gewährleisten können, aber letztlich zum beschleunigten Fortschreiten der Herzinsuffizienz beitragen (*Circulus vitiosus*) (Abb. 1). Die wichtigsten Symptome der Herzinsuffizienz sind eine mangelnde Durchblutung der peripheren Organe mit niedrigem Herzzeitvolumen und systemischer Hypotonie. Man spricht von einem Vorwärtsversagen des Herzens. Die reduzierte Förderleistung des insuffizienten Ventrikels führt über eine Minderperfusion des von ihm abhängigen Kreislaufabschnittes hinaus aber auch zu Störungen im vorgeschalteten venösen Gefäßsystem und wird mit dem Begriff Rückwärtsversagen beschrieben (Ross, 1983). Das Rückwärtsversagen des Herzens ist durch einen charakteristischen Blutstau im großen und kleinen Blutkreislauf gekennzeichnet. Während die Linksherzinsuffizienz zu Stauungserscheinungen in der Lunge führt, treten beim Rechtsherzversagen Venen- und Leberstauungen sowie Ödem- und Aszitesbildung auf. Die Schweregrade der Herzinsuffizienz werden nach Empfehlung der *New York Heart Association* (1964) anhand anamnestischer und einfacher klinischer Kriterien in vier Klassen eingeteilt (NYHA I-IV). Demnach liegt bei einer Herzerkrankung ohne eingeschränkte körperliche Belastbarkeit das NYHA-Stadium I und bei Beschwerden bereits im Ruhezustand mit erheblicher Steigerung der Symptomatik bei geringster körperlicher Tätigkeit das NYHA-Stadium IV vor. Durch weiterführende hämodynamische Untersuchungen von Druck- und Volumenparametern des erkrankten Herzens lassen sich die Schweregrade der Herzinsuffizienz jedoch genauer festlegen. Als messbare Parameter spiegeln diesbezüglich die Verringerung der ventrikulären Auswurffraktion (<30 %) und

des kardialen Indexes ( $<2,5 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ) sowie ein erhöhter enddiastolischer Füllungsdruck und pulmonal-kapillärer Verschlussdruck ( $>20 \text{ mmHg}$ ) die schlechte Ventrikelfunktion wider (Franciosa *et al.*, 1983). Infolge der Dominanz des linken Ventrikels bei der Aufrechterhaltung des Kreislaufsystems steht die Beurteilung seiner Funktion dabei im Vordergrund.



**Abb. 1. Pathogenese der Herzerkrankung.** Durch die Verminderung der kardialen Pumpkapazität werden neurohumorale Kompensationsmechanismen aktiviert, die eine ausreichende Pumpfunktion des Ventrikels gewährleisten können. Der Patient bleibt dadurch zunächst asymptomatisch. Die anhaltende Aktivierung kompensatorischer Mechanismen und sekundäre Schädigung des Myokards (Nekrose, Fibrose) trägt aber zum Fortschreiten der Herzerkrankung bei (*Circulus vitiosus*). Im Endstadium führen das ventrikuläre *Remodeling* und die nachfolgende Dekompensation des Ventrikels zum symptomatischen Erscheinungsbild der Herzinsuffizienz. *Modifiziert nach Mann, 1999.*

Der Insuffizienz des Myokards liegen in den meisten Fällen kardiale Ursachen mit Kontraktions- und Relaxationsstörungen zu Grunde. Man bezeichnet heute alle Herzerkrankungen mit einer Insuffizienz des Herzmuskels als Kardiomyopathie (Force, 1996). Die Kardiomyopathie umfasst im engeren Sinne seltene Herzerkrankungen, die primär das Myokard betreffen, und beispielsweise bei einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) oder hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) vorliegen. Im Gegensatz dazu wird der Begriff spezifische Kardiomyopathie für Herzerkrankungen gewählt, bei denen eine Myokardinsuffizienz als Folge von Erkrankungen auftritt, die primär nicht den Herzmuskel betreffen. Hierbei spricht man auch von einer sekundären Kontraktionsinsuffizienz. Letztere Herzmuskelerkrankungen liegen bei einer ischämisch bedingten Kardiomyopathie (ICM; bei koronarer Herzkrankheit, CAD), valvulärer Kardiomyopathie (bei Herzklappendefekten) oder hypertensiven Kardiomyopathie (bei Hypertonie) vor. Die spezifischen Kardiomyopathien umfassen die meisten aller chronischen Herzerkrankungen, wobei eine

koronare Herzerkrankung am häufigsten vorliegt und beispielsweise an selektionierten Patienten in der SOLVD-Studie nahezu 70 % betrug (The SOLVD investigators, 1991). Demgegenüber ist die Bedeutung der arteriellen Hypertonie seit vielen Jahren rückläufig und wahrscheinlich Ausdruck einer verbesserten Diagnosemöglichkeit und konsequent durchgeführten antihypertensiven Therapie (Yusuf *et al.*, 1989).

### ***Koronare Herzerkrankung (CAD)***

Die koronare Herzerkrankung führt zu einem Missverhältnis von Nährstoffbedarf des Herzens und Nährstoffangebot durch das Koronarblut. Häufigste Ursache ist hierbei die Einengung des Lumens der Koronargefäße durch Arteriosklerose (Koronarsklerose) oder eine erhöhte Vasokonstriktion der Koronargefäße (Koronarspasmus). Die Motorik der Gefäße und damit die Organdurchblutung hängen dabei unmittelbar mit der Funktion des Gefäßendothels zusammen, das in der Lage ist, vasoaktive Substanzen, wie Angiotensin oder Noradrenalin, aufzunehmen und zu metabolisieren. Das Endothel kann aber auch selbst vasoaktive Autakoide bilden und freisetzen. Hierzu gehört neben Prostazyklin und anderen Prostaglandinen auch der EDR- (*endothelium-derived relaxing*) Faktor (Furchgott & Zawadzki, 1980), der später als Stickstoffmonoxid identifiziert werden konnte (Furchgott *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987). Stickstoffmonoxid (NO) wird aus L-Arginin durch die NO-Synthase der Endothelzellen (ecNOS) gebildet, diffundiert in die glatten Gefäßmuskelzellen und löst dort durch Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels eine Erschlaffung und Vasodilatation aus. Darüber hinaus hemmt Stickstoffmonoxid die Aggregation von Thrombozyten und trägt so zur Aufrechterhaltung der Gewebedurchblutung bei (Radomski *et al.*, 1987). In allen Arterien und Arteriolen findet eine kontinuierliche NO-Freisetzung statt, die zur Regulation des basalen Gefäßtonus beiträgt und durch den Einfluss des Blutstroms (Schubspannung, *shear stress*) auf die Endothelzellen ausgelöst wird (Noris *et al.*, 1995). Physikalische Reize, wie Blutflusssteigerung, aber auch die Wirkung vasoaktiver Substanzen (Angiotensin II, Noradrenalin) können die NO-Bildung weiter verstärken und eine Gefäßerweiterung verursachen. Das Endothel übt somit in allen arteriellen Gefäßen eine Schutzfunktion durch eine Dilatation der Arterien und Arteriolen aus (Pohl *et al.*, 1986). Ferner trägt die NO-Synthese zum Selbstschutz der Endothelzellen gegenüber atherogenen Stimuli (oxLDL, oxidativer Stress, Angiotensin II) (Dimmeler *et al.*, 1997a; Dimmeler *et al.*, 1997c) und Zytokinen (Polte *et al.*, 1997) bei. Ist die Endothelfunktion und damit die Bildung von NO durch mechanische Einflüsse oder Entstehung von atherosklerotischen Plaques (Atherogenese) gestört (Pirillo *et al.*, 2000), können durch die Hypersensibilität der Gefäßwand Koronarspasmen und

durch die Thrombozytenaggregation Myokardthrombosen an der defekten Gefäßfläche auftreten. Dabei ist das geschädigte Endothel auch unmittelbar an der Atherogenese beteiligt. Die Pathogenese der Atherosklerose ist durch die Akkumulation intra- und extrazellulärer Lipide, Einwanderung von Monozyten, die sich zu Makrophagen und Schaumzellen umwandeln, und Proliferation der glatten Muskelzellen gekennzeichnet (Segrest & Anantharamaiah, 1994). Infolge der atherosklerotischen Veränderungen kommt es zur Potenzierung der endothelialen Dysfunktion, zunehmenden Einengung des Gefäßlumens und Abnahme der arteriellen Elastizität. Koronarsklerotische Plaques und Myokardthrombosen können nun eine zeitweilige oder chronische Unterversorgung des Herzmuskels verursachen, die zum klinischen Syndrom der *Angina pectoris* oder bei schweren Durchblutungsstörungen zum Herzinfarkt führt. Bleibt beim Vorliegen einer regionalen Hypoperfusion eine ausreichende Restdurchblutung erhalten, kann sich dieser Myokardbereich über einen gewissen Zeitraum metabolisch adaptieren. In dieser Zeit ist die Kontraktion chronisch reduziert, so dass ein neues Gleichgewicht zwischen der verminderten Durchblutung und der reduzierten kontraktilen Funktion eingestellt wird (Rahimtoola, 1989). Dieser Zustand wird klinisch mit dem Begriff *Hibernation* (zool. Winterschlaf) umschrieben. Die im frühischämischen Stadium auftretenden metabolischen Veränderungen (Abnahme des zellulären Kreatinphosphat- und ATP-Gehaltes, Laktatanstieg) erholen sich bei unveränderter regionaler Hypoperfusion wieder und passen sich dem verminderten Bedarf an (Ross, 1991). Die Normalisierung der Herzfunktion erfolgt nach der Reperfusion des *hibernating* Myokards ohne bleibende Schäden (Matsuzaki *et al.*, 1983). Im Vergleich zum kurzzeitigen *Hibernation* treten beim Langzeit-*Hibernation* über Wochen und Monate auch morphologische Veränderungen mit einer Reduktion der Myofibrillen auf, die sich nach der Reperfusion wieder erholen können (Borgers & Ausma, 1995). Zunächst ist das reperfundierte Myokard allerdings noch durch eine eingeschränkte kontraktile Funktion gekennzeichnet. Man spricht vom *Stunning* (Benommenheit) des Myokards (Heyndrickx *et al.*, 1978). Klinisch ist das *stunned* Myokard durch abnormal kontrahierende Myokardabschnitte mit einer normalen Ruhedurchblutung aber eingeschränkter Koronarreserve charakterisiert (Vanovershelde *et al.*, 1993). Die kontraktile Dysfunktion, die trotz der Reperfusion des hypoperfundierten Myokards auftritt, entsteht durch einen noch anhaltenden ATP-Mangel, da zuerst die Kreatinphosphatspeicher aufgefüllt werden (Ichihara & Abiko, 1984). Darüber hinaus bleibt im postischämischen Gewebe zunächst die Kalziumüberladung der Kardiomyozyten bestehen (Nayler *et al.*, 1988), und die schlagartige Sauerstoffzufuhr führt zur Bildung freier Sauerstoffradikale

durch die NADPH-Oxidase oder Xanthinoxidase (Garlick *et al.*, 1987). Da der reperfusionsbedingte Anstieg der freien Radikale sowie die intrazelluläre Kalziumüberladung zum Verlust der Zellen mit Nekrosen und Entzündungsreaktionen führen (Smith *et al.*, 1988), können neben den Ischämie- oft noch irreversible Reperfusionsschäden auftreten.

### ***Dilatative Kardiomyopathie (DCM)***

Im Gegensatz zur sekundären Kontraktionsinsuffizienz durch eine unzureichende Blutzufuhr bei der Koronaren Herzerkrankung, durch intrakardiale Druck- und Volumenbelastungen (arterielle Hypertonie, Herzklappeninsuffizienz) oder infolge einer entzündlichen Herzmuskelerkrankung (Myokarditis) bleibt die Ursache einer dilatativen Kardiomyopathie im klinischen Alltag ätiologisch oft ungeklärt (idiopathische dilatative Kardiomyopathie, IDCM). Als Auslöser der morphologischen Umbauprozesse mit Erweiterung (Dilatation) des linken Ventrikels oder auch beider Herzkammern sowie eingeschränkter systolischer Pumpfunktion werden genetische, virale, immunologische und toxische Faktoren diskutiert (Seidmann & Seidmann, 1999). In den meisten klinischen Studien und experimentellen Untersuchungen wird eine Einteilung der Herzinsuffizienz in dilatative (DCM), ischämische (ICM) und hypertrophe (HCM) Kardiomyopathie gewählt. Im Gegensatz zur DCM ist die hypertrophe Kardiomyopathie durch eine ausgeprägte spontane Hypertrophie des Herzens gekennzeichnet und häufig familiär bedingt (Maron *et al.*, 1987). Kann die Funktionseinschränkung des Herzens allerdings nicht allein durch das Ausmaß der Druck- und Volumenbelastungen oder des ischämischen Schadens erklärt werden, so rechnet man auch diese myokardiale Dysfunktion zum Krankheitsbild der dilatativen Kardiomyopathie. Im gesamten Kollektiv der herzinsuffizienten Patienten ist der Anteil derer, die an einer DCM erkrankt sind, mit ungefähr 10% sehr gering. Dennoch stellt dieses Patientenkollektiv mit 40-50 % einen großen Anteil der Patienten, die nur noch durch eine Herztransplantation therapiert werden können (Andersson & Waagstein, 1993).

### ***Kalziumhomöostase***

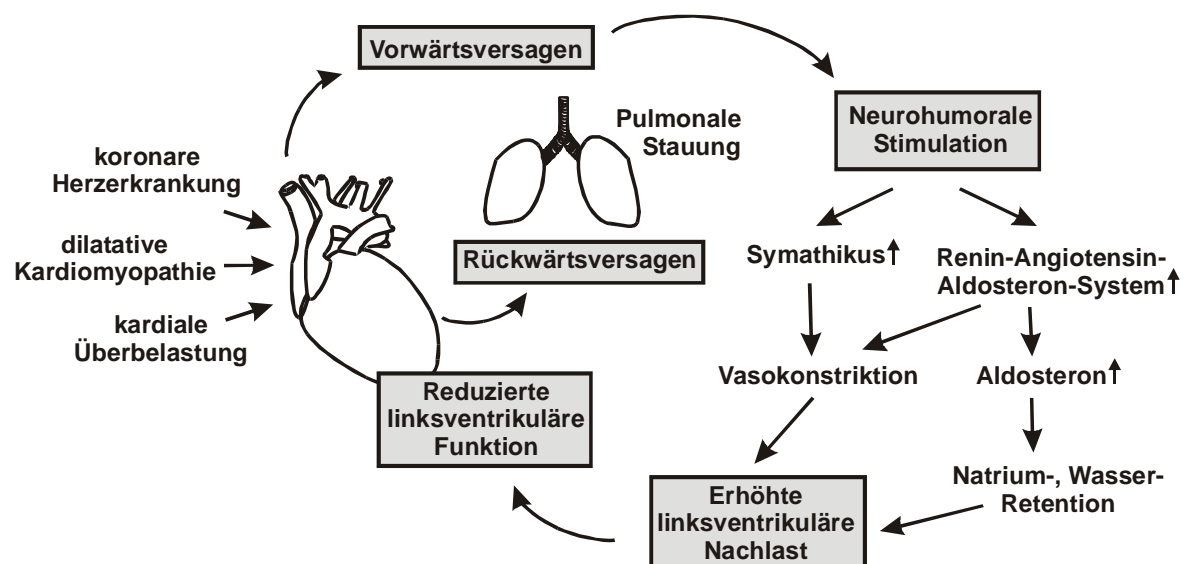
Die Kalziumfreisetzung aus den longitudinalen Tubuli des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) und nachfolgende Sequestrierung ist ein entscheidender Faktor für eine effiziente Kontraktion des Herzmuskels. Bei der Herzinsuffizienz tritt jedoch eine eingeschränkte Kalziumsequestration aufgrund einer verminderten Expression der sarkoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) auf (Arai *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 1995). Da die Aufgabe der SERCA darin besteht, Kalzium während der Diastole wieder zurück in das SR zu transportieren, sinkt in der Systole die freigesetzte Menge an Kalzium aufgrund einer

unzureichenden Kalziumneubeladung des SR. Dadurch steigt die diastolische Konzentration an Kalzium im Zytosol an. Es entsteht eine intrazelluläre Kalziumüberladung. Um dem erhöhten diastolischen Kalziumgehalt der Zelle entgegenzuwirken, führt die erhöhte Expression des  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers in der Plasmamembran zur Regulation des zytoplasmatischen Kalziumsgehaltes (Studer *et al.*, 1994). Dennoch kann durch diese kompensatorische Reaktion die Kalziumbeladung des SR nicht normalisiert werden. Daher werden Veränderung der Kalziumhomöostase als ein wesentlicher Grund für die verschlechterte diastolische und systolische Funktion des Myokards bei der terminalen Herzinsuffizienz angesehen (Schmidt *et al.*, 1998).

### ***Anpassungsvorgänge des chronisch erkrankten Herzens, Remodeling***

Die Herzinsuffizienz beginnt nach einem initialen Auslöser, der den Verlust der Kontraktilität des Myokards zur Folge hat. Dieser Auslöser kann, wie im Fall des Herzinfarkts, durch direkte Beschädigung des Herzmuskels mit dem Verlust von Kardiomyozyten einen sehr abrupten Ausbruch der Krankheit zur Folge haben. Der Initiator kann aber auch der Verlust der Fähigkeit des Myokards sein, ausreichend Pumpkraft zu entwickeln und einen eher allmählichen Verlauf nehmen, wie bei den hämodynamisch verursachten Herzerkrankungen oder bei vielen noch ungeklärten Kardiomyopathien. Den Anpassungsvorgängen des Herzens an die verminderte Pumpkapazität liegen myokardiale Umbauvorgänge zu Grunde, die als *Remodeling* bezeichnet werden (Mann, 1999). Der Umbau des Myokards vollzieht sich auf verschiedenen Ebenen und ist durch den Einfluss neurohormoneller Systeme, die veränderte Geometrie des Herzens, den Verlust an Myozytenmasse sowie molekulare und zelluläre Umbauvorgänge gekennzeichnet. Der wichtigste neurohumorale Einfluss liegt in der Aktivierung des sympathischen Nervensystems (Bristow, 1984; Brodde *et al.*, 1995; Eisenhofer *et al.*, 1996), wodurch zunächst das erforderliche Herzzeitvolumen durch Zunahme von Kontraktionskraft und Herzfrequenz aufrechterhalten werden kann (Abb. 1, 2). Langfristig führt jedoch diese Leistungszunahme mit gesteigertem Energieverbrauch und der Tendenz zur Kalziumüberladung der Kardiomyozyten zu einer schnelleren Progression der myokardialen Dysfunktion. Von großer Bedeutung in der Herzinsuffizienz sind darüber hinaus das systemische und das kardiale Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (Dzau, 1994; Dzau *et al.*, 1981) sowie das Endothelinsystem (Hiroie *et al.*, 1991) (Abb. 2). Diesen Systemen mit stark vasokonstriktorischer Wirkung und Retention von Salz und Wasser steht die Aktivierung vasodilatierender Moleküle, wie den natriuretischen Peptiden (ANF, BNP), Prostaglandinen ( $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGEI}_2$ ) und Stickstoffmonoxid (NO) gegenüber (Mann, 1999). Da

deren Dominanz aber nicht ausreichend ist, um die vasokonstringierenden und volumenretendierenden Systeme zu überwinden und den *Remodeling*-Prozess aufzuhalten, werden heute bei der Behandlung der Herzinsuffizienz Pharmaka eingesetzt, die in die Sympathikus- und Renin-Angiotensin-Aktivierung antagonistisch eingreifen. Dazu zählen insbesondere die  $\beta$ -Rezeptoren-Blocker, die ihre pharmakologische Wirkung durch die reversible Bindung an die  $\beta$ -Adrenorezeptoren ausüben und somit die Sympathikuswirkungen reduzieren (Hall *et al.*, 1995; Packer *et al.*, 1996). Darüber hinaus gehört auch der Einsatz von ACE-Inhibitoren zu den sehr effizienten therapeutischen Maßnahmen (The SOLVD investigators, 1991). ACE-Inhibitoren hemmen das Angiotensin-Konversionsenzym (ACE), das Angiotensin I proteolytisch in das hämodynamisch wirksame Angiotensin II spaltet (Wolny *et al.*, 1997). Diesbezüglich zeichnet sich auch die Entwicklung von AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten als neuartige und erfolgversprechende Therapieform ab, die selektiv den Angiotensin II-Rezeptor vom Subtyp 1 blockiert (Bauer & Reams, 1995; Pitt *et al.*, 1997). Ferner werden zur Verminderung der eingangs erläuterten Stauungssymptomatik vor allem bei Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz (NYHA-Stadien III-IV) Diuretika eingesetzt, die durch eine vermehrt renale Elektrolyt- und Wasserausscheidung zur Reduktion des effektiv zirkulierenden Blutvolumens (Vorlastsenkung) und des arteriellen Mitteldrucks (Nachlastsenkung) beitragen (Wilson *et al.*, 1981).



**Abb. 2. Klinische Pathophysiologie der Herzinsuffizienz.** Schematische Darstellung der pathophysiologischen Konsequenzen der Herzinsuffizienz.

Gemeinsamer Nenner aller Formen der Herzinsuffizienz ist die Überlastung des kontraktilen Apparates. Durch die akute Überforderung seiner funktionellen Reserve und Zunahme der ventrikulären Wandspannung („Wandstress“) resultiert dies anfänglich in der Hypertrophie des Myokards (Katz, 1990). Hierbei spielt die Expression Überlast-aktivierter Gene, wie Angiotensin II, Endothelin oder TNF- $\alpha$ , eine entscheidende Rolle (Givertz & Colucci, 1998; Kapadia *et al.*, 1997). Somit ist unabhängig von der unmittelbaren hämodynamischen Funktion das kardiale Renin-Angiotensin-System auch an der hypertrophen Pathogenese beteiligt (Sadoshima *et al.*, 1993). Nach dem Gesetz von LaPlace führt, im Gegensatz zur Dilatation des Ventrikels, die Hypertrophie zu einer Abnahme des ventrikulären „Wandstress“, so dass die Patienten dadurch vorübergehend kompensiert sind (Yin, 1981). Das Schlagvolumen wird solange über den Frank-Starling-Mechanismus aufrechterhalten (Starling, 1908). Die Hypertrophie ist die wichtigste von vielen Anpassungsvorgängen (Hunter & Chien, 1999). Ausdruck der pathologischen Hypertrophie sind Veränderungen in der myokardialen Genexpression mit einer Größenzunahme der Kardiomyozyten sowie der Proliferation von Fibroblasten. Im Endstadium ist dadurch der Herzmuskel durch einen auffallend fibrösen Umbau gekennzeichnet, der die Steifheit des Myokards zur Folge hat. Durch die Hypertrophiebedingten Mechanismen sowie durch die Erschöpfung der überlasteten Kardiomyozyten und deren Zelltod geht letztlich die Kompensations- in die Dekompensationsphase über. Im Endstadium der Herzinsuffizienz kann der erhöhte „Wandstress“ nicht mehr ausgeglichen werden. Die Herzkammer ist morphologisch durch eine starke Dilatation, Abnahme der ventrikulären Wanddicke sowie durch den irreversiblen Verlust an Kardiomyozyten und Bindegewebsersatz gekennzeichnet (Mann, 1999). Durch den kontinuierlichen Rückgang der Ventrikelwanddicke, aber die Zunahme des enddiastolischen Füllungsvolumens infolge der Kammerdilatation (ventrikulären Nachlast), um das der Herzmuskel in der Systole seine Wandspannung aufbauen muss, verringert sich das vom Herzen ausgeworfene Schlagvolumen (Ross, 1983). Die Ursache liegt darin, dass die Verkürzungsfähigkeit der Muskelfasern mit dem Anstieg der aufzubauenden Faserspannung abnimmt. Darüber hinaus verursacht die erhöhte Wandspannung auch eine Frequenz-abhängige Mangel durchblutung des subendokardialen Gewebes mit erhöhtem oxidativen Stress (Givertz & Colucci, 1998) und führt ihrerseits zur Schädigung der Kardiomyozyten und myokardialen Dysfunktion (Shannon *et al.*, 1993).



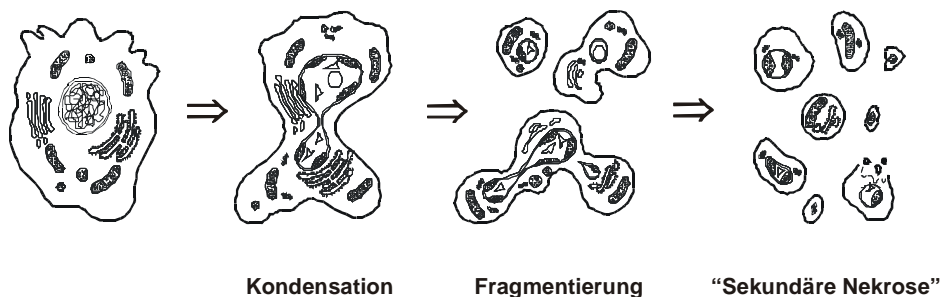
## 1.2. Charakterisierung und Bedeutung des Zelltodes durch Apoptose

In der Initiation und Manifestation der Herzinsuffizienz spielt der Zelltod von Kardiomyozyten eine bedeutende Rolle. Infolge der schweren Zellschädigung durch Hypoperfusion des Myokards oder schwerwiegende Überlastung der Kardiomyozyten kommt es zum Untergang der Zellen (Anversa & Kajstura, 1998). Dieser Zelltod ist in vielen Fällen nekrotisch und durch eine irreversible Dysfunktion der Mitochondrien gekennzeichnet, da die Energiereserven ausgeschöpft sind. Die Kardiomyozyten sind einem erhöhten oxidativen Stress und einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung ausgesetzt (Ferrari *et al.*, 1998). Die Zellhomöostase und Regulation des osmotischen Druckes kann nicht mehr aufrechterhalten werden. Das hat ein Anschwellen der Zellen (Oncoese) und die Zerstörung der Plasmamembran zur Folge (Cohen, 1993). Die Lyse der Zellen und die Freisetzung zytosolischer Enzyme und anderer biogener Peptide in den extrazellulären Raum verursacht entzündliche Prozesse im angrenzenden Gewebe, die ihrerseits zum Zelluntergang beitragen. Aus diesem Grund ist Nekrose mit irreversiblen Gewebeveränderungen verbunden. Die terminal differenzierten Kardiomyozyten werden nun durch Fibroblasten ersetzt.

Neben dem nekrotischen spielt eine weitere Art des Zelluntergangs eine wichtige physiologische Rolle. Dieser Zelltod wird mit dem Begriff Apoptose umschrieben (Kerr *et al.*, 1972) und ist im Gegensatz zur Nekrose genetisch codiert. Apoptose wird daher auch als „programmierter“ Zelltod bezeichnet. Morphologisch unterscheidet sich Apoptose vom nekrotischen Zelluntergang durch „geordnete“ Zellveränderungen (Cohen, 1993). Charakteristisches Merkmal ist dabei die Aufrechterhaltung der Membranintegrität und des osmotischen Gradienten unter Abschnürung von membranumschlossenen Zellbestandteilen (*blebbing*), die als apoptotische Körperchen bezeichnet werden (*apoptotic bodies*, vgl. Abb. 3). Da die *apoptotic bodies* von benachbarten Zellen und Makrophagen phagozytiert werden, ist der apoptotische im Vergleich zum nekrotischen Zelluntergang nicht durch entzündliche Prozesse gekennzeichnet.

Apoptose beginnt in der frühen Phase mit typischen sarkolemmalen Veränderungen durch eine Scramblase-vermittelte Translokation von Phosphatitylserinresten an die Außenseite der Plasmamembran (Kagan *et al.*, 2000). Dies hat den Verlust der Membranstabilität und die Ausstülpung der Zellmembran (Zeiose) zur Folge. Im Zytosol kommt es zur Kondensation des Zytoplasmas durch Wasserverlust, zur Erweiterung des Endoplasmatischen Retikulums, und erste mitochondriale Dysfunktionen können festgestellt werden.

Die Integrität der zytoplasmatischen Organellen bleibt aber noch weitestgehend erhalten. Im schrumpfenden Zellkern tritt eine Spaltung der chromosomalen DNA in zunächst große DNA-Bruchstücke (50 und 300 kbp) (Walker *et al.*, 1994; Zhivotovsky *et al.*, 1994) und eine Kondensation des Chromatins ein, das nahe der Kernmembran aggregiert. Die RNA- und Proteinbiosyntheserate sinken. Im Endstadium der Apoptose führt die definierte Fragmentierung der chromosomalen DNA in den Linkerregionen zwischen den Nukleosomen zur vollständigen Einstellung der Transkriptionsaktivität. Die enzymatische Spaltung der DNA in Oligonukleosomen-große Fragmente ist das Ergebnis einer erhöhten Aktivität von  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -abhängigen Endonukleasen bei gleichzeitiger Inaktivierung der DNA-Ligase (Counis & Torriglia, 2000; Wyllie, 1998). Charakteristisches Merkmal dieser internukleosomalen DNA-Spaltung ist eine in der Gelelektrophorese sichtbare „DNA-Leiter“ von 180-200 bp-großen Fragmenten und deren Vielfachen. Der Verlust der Zellkernintegrität führt im Endstadium der Apoptose zur Akkumulation dieser DNA-Fragmente im Zytosol. Im klassischen Sinne bleibt auch in der späten Phase die Integrität der Zellmembran unter Abschnürung von *apoptotic bodies* bewahrt (Cohen, 1993). Da diese regulierte Zerstörung der Zellen aber nicht immer gewährleistet werden kann und es wie bei nekrotisch sterbenden Zellen zum Verlust der Membranpermeabilität kommt, spricht man in der letzten Phase der Apoptose auch von einer „sekundären Nekrose“. Wie in Abb. 3 angedeutet, ist eine strikte Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose kaum möglich, da der apoptotische und der nekrotische Zelluntergang lediglich zwei Extreme darstellen. Unter normalen physiologischen Bedingungen ist der Zelltod viel komplexer und umfasst auf molekularer Ebene sowohl Komponenten der einen als auch der anderen Form des Zelluntergangs (Fiers *et al.*, 1999; Majno & Joris, 1995).



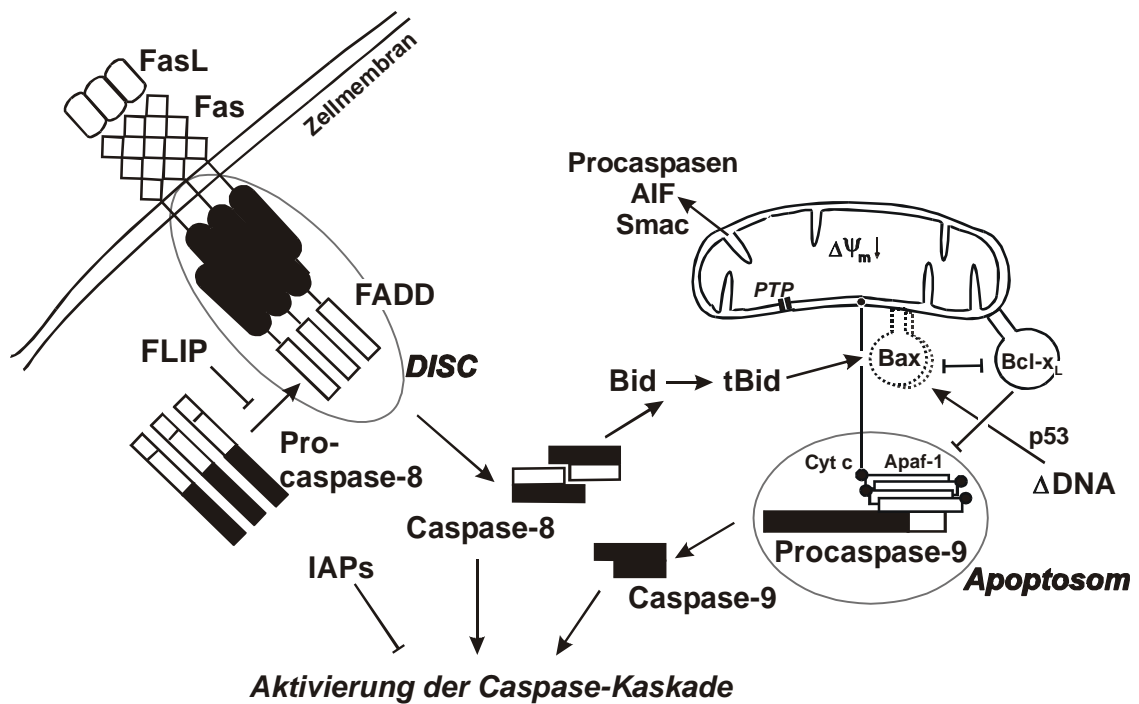
**Abb. 3. Morphologische Veränderungen einer apoptotischen Zelle.** Nach Apoptoseauslösung erfolgen zytoplasmatische und Membranveränderungen, die eine Kondensation und Faltung der Zelle zur Folge haben. Diese gehen in eine regulierte Fragmentierung von Zellkern und Zelle über. Die im Endstadium abgeschnürten „apoptotischen Körperchen“ werden durch Phagozytose beseitigt. *Modifiziert nach Cohen, 1993.*

Der Apoptosemechanismus spielt antagonistisch zur Zellproliferation in der embryonalen Entwicklung und bei der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase eine wichtige Rolle und ist daher zentraler Forschungsschwerpunkt für die Gebiete der Onkologie, Immunologie, Neurologie und Entwicklungsbiologie (Vaux & Korsmeyer, 1999). So ist Apoptose nach einer überstandenen Immunabwehr an der Beseitigung reaktiver T-Lymphozyten beteiligt und eliminiert Zellen, die durch virale Infektion oder Mutation geschädigt sind (Williams, 1994). Durch den apoptotischen Zelluntergang wird eine stabile Balance der zellulären Masse aufrechterhalten, um der Entstehung von Krebs vorzubeugen (Loewe & Lin, 2000). Seine unerwünschte Aktivierung hingegen trägt zur Entstehung vieler Krankheiten, wie Aids, Alzheimer oder den Autoimmunerkrankungen, bei (Barr & Tomei, 1994; Whyte & Evan, 1995). Pathologisch wird Apoptose darüber hinaus in Reaktion auf eine Vielzahl von physiologischen und toxischen Signalen ausgelöst. Dazu gehören sowohl Hitzeschock, UV-Strahlung oder Chemotherapeutika (Barr & Tomei, 1994) als auch Hypertonie (Hamet *et al.*, 1995), Hypoxie (Shimizu *et al.*, 1996a; Tanaka *et al.*, 1994), Ischämie (Hill *et al.*, 1995; Kajstura *et al.*, 1996) und Reperfusion (Freude *et al.*, 2000; Gottlieb *et al.*, 1994).

#### ***Die Aktivierung zytosolischer Caspasen führt zur Apoptose***

Die Zelle hat in Abhängigkeit vom Zelltyp und proapoptotischen Stimulus zwei verschiedene Möglichkeiten, den Apoptosemechanismus zu initiieren (Abb. 4). So wird sowohl extrinsisch durch die Aktivierung von Zelloberflächenrezeptoren (Rezeptor-Weg) als auch intrinsisch durch die Freisetzung von Apoptose-auslösenden Faktoren aus den Mitochondrien (mitochondrialer Weg) der Zelluntergang durch Apoptose hervorgerufen (Hengartner, 2000). Die Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion wird durch sogenannte Todes- (*death*) Rezeptoren ausgelöst, die Mitglieder der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- und Nervenwachstums-Faktor (NGF)-Rezeptor-Superfamilie sind (Schulze-Osthoff *et al.*, 1998). Diese Todesrezeptoren sind durch eine konservierte intrazelluläre Region gekennzeichnet, die für die Übertragung des extrazellulären zytotoxischen Signals verantwortlich ist und daher auch als Todes- (*death*) Domäne bezeichnet wird. Gegenwärtig sind 6 verschiedene Todesrezeptoren bekannt, zu denen die Rezeptoren TNF-R1 (CD120a/p55), Fas (CD95/Apo-1) oder LARD (Apo-3) gehören. Unter den Todesrezeptor-vermittelten Signaltransduktionswegen ist der durch den Fas-Rezeptor (Itoh *et al.*, 1991) ausgelöste apoptotische Zelltod der wohl am besten untersuchte. Die Aktivierung des Fas-Rezeptors erfolgt dabei durch Bindung seines trimeren Liganden FasL (Suda *et al.*, 1993) und verursacht die Oligomerisierung von Fas und Bildung eines aktiven Signalkomplexes

(*death-inducing signaling complex*, DISC) (Nagata, 1994). Dabei interagiert die intrazelluläre Todesdomäne des Rezeptors durch homologe Bindung mit der Todesdomäne seines zytosolischen Adaptermoleküls FADD (*Fas-associated death domain*) (Chinnaiyan *et al.*, 1995). FADD kann nun seinerseits durch eine weitere homologe Interaktion die Bindung einer Protease, der Procaspase-8 (MACH/FLICE), über die sogenannte Todeseffektordomäne (*death effector domain*, DED) initiieren (Boldin *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1996). Dieses Proenzym (Zymogen) wird nach Abspaltung seiner Prodomäne ein weiteres Mal autokatalytisch gespalten und am DISC durch Bildung eines Heterotetramers aus je zwei identischen großen und kleinen Untereinheiten in die aktive Caspase-8 überführt (Earnshaw *et al.*, 1999). Caspase-8 ist die erste einer ganzen Kaskade aus Caspasen und wird aus diesem Grund auch als Initiatorcaspase bezeichnet. Die Caspasen (*cystein aspartat-specific proteases*) (Nicholson & Thornberry, 1997; Thornberry & Lazebnik, 1998) gehören zur Gruppe der Cysteinproteasen, die Proteine spezifisch nach einem Aspartatrest spalten. Gegenwärtig sind 14 verschiedene Caspasen bekannt (Earnshaw *et al.*, 1999). Die aktive Caspase-8 kann nun die Caspasekaskade durch proteolytische Spaltung weiterer Caspasen initiieren. Hierzu zählt die Caspase-3 (CPP32) (Nicholson *et al.*, 1995; Tewari *et al.*, 1995), die schließlich zelluläre Todes- (*death*) Substrate spaltet, die zum morphologischen und biochemischen Bild der Apoptose führen. Aus diesem Grund wird die Caspase-3 neben zwei weiteren Caspasen (Caspase-6 und -7) auch als Effektorcaspase bezeichnet (Earnshaw *et al.*, 1999). Zu diesen Todessubstraten gehören viele Proteine, wie Aktin, Gelsolin oder Fodrin, die am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt sind (Brown *et al.*, 1997; Geng *et al.*, 1998; Vanags *et al.*, 1996). Darüber hinaus spalten und inaktivieren die Effektorcaspasen Faktoren, die normalerweise DNA-spaltende Endonukleasen (DFF45/ICAD, PARP) hemmen (Enari *et al.*, 1998; Lazebnik *et al.*, 1994). Dies bewirkt, dass die Endonukleasen im Zellkern die chromosomale DNA in die für die Apoptose charakteristischen Oligonukleosomen-großen Fragmente spalten. Eine ganze Reihe von intrazellulären Determinanten wirken allerdings der Caspaseaktivierung entgegen. Im Fas-vermittelten Apoptoseprozess spielen dabei die FLIP-Moleküle eine entscheidende Rolle (Irmeler *et al.*, 1997), da sie die Rekrutierung der Procaspase-8 in den DISC-Komplex und damit ihre Autoaktivierung verhindern. Darüber hinaus hemmen untereinander homologe Proteine, die zur IAP-Familie (*inhibitors of apoptosis*) gehören, Initiator- und Effektorcaspasen durch direkte Interaktion mit der Pro- aber auch bereits aktivierten Caspase (Deveraux & Reed, 1999).



**Abb. 4. Schematische Darstellung der Apoptosesignalwege.** Apoptose kann extrinsisch über Oberflächenrezeptoren und intrinsisch über die Mitochondrien induziert werden. Während der Rezeptor-vermittelte Signalweg z.B. durch die Aktivierung von Fas unter Bildung eines DISC (*death-inducing signaling complex*) ausgelöst wird, erfolgt die mitochondriale Apoptose nach Cytochrom c-Freisetzung und Bildung eines Apoptosoms. Apoptose kann mit dem Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) verbunden sein, an dem die Bildung von PT- (*permeability transition*) Poren beteiligt ist. Über die Caspase-8-vermittelte Aktivierung von tBid sind Rezeptor- und mitochondrialer Apoptoseweg verbunden. Mitochondrial kann Apoptose aber auch nach Schädigung der chromosomalen DNA ( $\Delta$ DNA) über p53-induzierte Bax-Expression erfolgen. Bax und Bid sind proapoptische Proteine der Bcl-2-Familie, deren Funktion durch antiapoptische Bcl-2-Homologe (z.B. Bcl- $x_L$ ) inhibiert werden kann. Mit FLIP und den IAP-Proteinen können weitere Faktoren den Apoptoseablauf inhibieren. *Modifiziert nach Schulze-Osthoﬀ et al., 1998 und Gottlieb, 2000.*

Im Gegensatz zur Rezeptor-vermittelten Apoptose wird der intrinsische Signaltransduktionsweg über die Mitochondrien ausgelöst. Die mitochondriale Apoptose tritt dabei als Reaktion auf den extrinsischen Apoptoseweg auf (Chauhan *et al.*, 1997; Schulze-Osthoﬀ *et al.*, 1998). Bei diesem Signalweg sind die Bildung des DISC und die Aktivierung der Procaspase-8 nicht ausreichend, um die Caspasekaskade zu aktivieren. Daher wird durch proteolytische Spaltung des Bid-Proteins in tBid (*truncated Bid*) das Apoptosesignal intrazellulär über die Mitochondrien verstärkt. Darüber hinaus kann der mitochondriale Apoptoseweg als Reaktion auf eine Reihe zellulärer Stresssituationen auch direkt ausgelöst werden. Hierbei spielt der Tumorsuppressor p53 eine wichtige Rolle, der z.B. nach Schädigung der chromosomalen DNA (Rich *et al.*, 2000; Sionov & Haupt, 1999) oder unter hypoxischen Bedingungen (Graeber *et al.*, 1994) aktiviert wird. p53 reguliert als Transkriptionsfaktor die Expression von sowohl pro- als auch antiapoptischen Proteinen, die zur Familie der Bcl-2-Proteine gehören und in die mitochondriale Apoptose

regulierend eingreifen. Während p53 die Transkription des Apoptose-inhibierenden Bcl-2 verhindert, aktiviert p53 die Expression des proapoptotischen Bcl-2-Homologen Bax (Miyashita *et al.*, 1994b; Miyashita & Reed, 1995).

In den letzten Jahren haben umfangreiche Studien die Mitochondrien als einen zentralen Bestandteil in der Apoptose identifiziert, da noch vor der Fragmentierung der chromosomalen DNA ein Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials beobachtet werden konnte (Decaudin *et al.*, 1997; Marchetti *et al.*, 1996; Zamzami *et al.*, 1996b). Das mitochondriale Transmembranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) wird unter normalen physiologischen Bedingungen durch den Elektronentransport der Atmungskette über die innere Mitochondrienmembran aufrechterhalten und ist Grundlage für die ATP-Bildung durch die oxidative Phosphorylierung. Ein Verlust dieses Transmembranpotentials wird auch als Permeabilitätstransition (*mitochondrial permeability transition*, MPT) bezeichnet und durch das Öffnen von sogenannten Megaporen (*permeability transition pores*, PTP) verursacht (Crompton, 1999; Zoratti & Szabo, 1995). Diese PT-Poren sind an den Kontaktstellen zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran lokalisiert und für Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 1,5 kDa permeabel. Ihre Zusammensetzung ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Bisherige Studien weisen auf die Beteiligung mehrerer Transmembranproteine hin, wie den spannungsabhängigen Anionenkanal (*voltage-dependent anion channel*, VDAC) (Shimizu *et al.*, 1999) und den Benzodiazepin-Rezeptor (PBR) an der äußeren sowie den ADP/ATP-Translokator (ANT) an der inneren Membran (Bernardi, 1996; Zamzami *et al.*, 1996a). Darüber hinaus sind Assoziationsproteine, wie die Hexokinase HK-II an der zytosolischen Seite, die mitochondriale Kreatinkinase (mtCK) im Intermembranraum und die Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerase Cyclophilin D (Cyp D) in der Matrix an der Bildung und Regulation der PT-Pore beteiligt (Martinou & Green, 2001; Nicolli *et al.*, 1996). Das Öffnen dieser Megaporen hat nun nicht nur den Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials sondern auch die Freisetzung intramitochondrialer Proteine zur Folge, die zur Auslösung des Apoptoseprozesses beitragen. Hierzu gehört mit Cytochrom c ein essentieller Bestandteil der Atmungskette (Kharbanda *et al.*, 1997; Kluck *et al.*, 1997; Krippner *et al.*, 1996). Das im Zytoplasma synthetisierte Apocytochrom c wird in den Mitochondrien zum Holoenzym umgewandelt und ist unter normalen physiologischen Bedingungen elektrostatisch mit der Cytochrom c-Reduktase und der Cytochrom c-Oxidase im mitochondrialen Intermembranraum assoziiert. Nach Auslösung des mitochondrialen Apoptoseweges wird Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt und induziert unter ATP-Verbrauch die

Oligomerisierung von Apaf-1 (Zou *et al.*, 1999). Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor*) (Zou *et al.*, 1997) ist ein Adapterprotein, das über ein CARD-Motiv (*caspase recruitment domain*) die Initiatorcaspase-9 bindet und aktiviert (Hu *et al.*, 1999). Dieser Komplex aus Cytochrom c, Apaf-1 und Procaspase-9 wird auch als Apoptosom bezeichnet und ist ein Multiproteinkomplex von ~700 kDa. Im Gegensatz zu anderen Caspasen, hat nach Abspaltung der Prodomäne eine weitere proteolytische Prozessierung der Caspase-9 aber nur wenig Einfluss auf ihre enzymatische Aktivität (Rodriguez & Lazebnik, 1999). Die Aktivierung der Caspase-9 erfolgt vielmehr durch eine Apaf-1-induzierte Änderung der Proteinkonformation (Stennicke *et al.*, 1999). Caspase-9 kann nun ähnlich wie die Caspase-8 im Rezeptor-vermittelten Apoptoseweg die Effektorcaspase-3 binden und proteolytisch aktivieren (Hu *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1997). Ob dabei der Komplex aus Cytochrom c und Apaf-1 an die Procaspase-9 bindet und diese als aktive Caspase-9 freisetzt (Zou *et al.*, 1999) oder ob er als funktionelle Untereinheit (Cofaktor) zur Bildung einer aktiven Holocaspase-9 dient (Rodriguez & Lazebnik, 1999), ist noch unklar.

Zusätzlich zum Cytochrom c werden noch andere proapoptische Komponenten aus den Mitochondrien freigesetzt, zu denen weitere Procaspasemoleküle (Susin *et al.*, 1999a), das IAP-inhibierende Protein Smac (Du *et al.*, 2000) oder der Apoptose-induzierende Faktor (*apoptosis-inducing factor*, AIF) (Susin *et al.*, 1999b) gehören. AIF wurde als Flavoprotein identifiziert, das in der Lage ist, die Fragmentierung der chromosomalen DNA in ~50 kDa-große Bruchstücke und die Kondensation des Chromatins zu verursachen. Darüber hinaus induziert es den Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials und veranlasst die Translokation von Phosphatidylserinresten an die extrazelluläre Seite der Zelle (Daugas *et al.*, 2000). Mit AIF konnte daher ein weiterer apoptotischer Signalweg, der zur Apoptose im Zellkern führt, entdeckt werden, dessen Bedeutung aber noch nicht aufgeklärt ist.

### ***Apoptose und mitochondriales Transmembranpotential***

Der Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) durch die Permeabilitäts-transition (PT) wurde zunächst im Zusammenhang mit dem Zelluntergang durch Nekrose beschrieben. So tritt durch Sauerstoffradikale und Kalziumüberladung der Zellen, aber auch durch Veränderungen des zellulären pH-Wertes, ADP-Gehaltes, Oxidation von Thiolgruppen oder durch verschiedene Metabolite (langkettige Fettsäuren, Ceramide) eine plötzliche Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran auf (Crompton, 1999; Zoratti & Szabo, 1995). Dieses Phänomen konnte auch unter physiologischen Bedingungen im Myokard nach Ischämie und Reperfusion sowie in anderen experimentellen Modellen beobachtet werden (Ferrari, 1996; Saris & Eriksson, 1995). Dabei führt das

Öffnen der PT-Poren zunächst zur Entkopplung der Atmungskette von der oxidativen Phosphorylierung und dem Abbruch der ATP-Synthese. Aufgrund inaktiver ATP-abhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle ist die zytosolische Kalziumakkumulation die Folge (Ferrari *et al.*, 1986; Janczewski *et al.*, 1992; Marban *et al.*, 1989). Zusätzlich werden vermehrt Sauerstoffradikale gebildet. Diese und andere zelluläre Konsequenzen führen zum Abfall des elektrochemischen Gradienten ( $\Delta\Psi_m$ ) an der inneren Mitochondrienmembran (Demaison *et al.*, 1996). Durch den gleichzeitigen Zusammenbruch der Osmoseregulation treten morphologischen Veränderungen auf, wie das Anschwellen der Mitochondrien und Zerreißen der mitochondrialen Außenmembran (Petit *et al.*, 1998). Diese veränderte Struktur der Mitochondrien wurde in vielen experimentellen Modellen beobachtet, die sich mit dem Zelluntergang beschäftigt haben (Feldmann, 2000; Marchetti *et al.*, 1996; Petit *et al.*, 1998). Im Gegensatz zum nekrotischen Zelltod ist das Absterben der Zelle durch Apoptose von der Aufrechterhaltung der ATP-Bildung jedoch maßgebend abhängig (Hu *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1997). Das hat zu der Vorstellung geführt, dass nur eine Subpopulation von Mitochondrien an der mitochondrialen Apoptoseauslösung beteiligt ist (Martinou & Green, 2001). Der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und die osmotisch bedingte Zerstörung der Mitochondrienmembran sind jedoch keine allgemein gültigen Beobachtungen (Eskes *et al.*, 2000; von Ahsen *et al.*, 2000). Daher weisen diese Studien auf alternative Möglichkeiten hin, wie es auch ohne Depolarisation zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und nachfolgend zur Freisetzung von Cytochrom c und anderen proapoptotischen Faktoren aus dem Intermembranraum kommt (Gottlieb, 2000; Martinou & Green, 2001; Zamzami & Kroemer, 2001). In diesem Zusammenhang spielen Proteine, die zur Familie der Bcl-2-Proteine gerechnet werden, eine entscheidende Rolle.

### **1.3. Apoptoseregulation durch Proteine der Bcl-2-Familie**

Die Familie der Bcl-2-Proteine besteht aus pro- und antiapoptotisch wirkenden Mitgliedern, die die Induktion des mitochondrialen Apoptoseweges regulieren. Charakteristisch für alle Mitglieder dieser Genfamilie ist das Auftreten von maximal vier Domänen hoher Sequenzhomologie (*Bcl-2 homology*, BH) BH1-4 (Tsujiimoto & Shimizu, 2000). Entsprechend ihrer Struktur und Funktion werden sie in mehrere Gruppen unterteilt (Abb. 5). Hauptmitglied und Namensgeber dieser Proteinfamilie ist das Protoonkogen Bcl-2 (*B cell lymphoma gene*) (Tsujiimoto & Croce, 1989), das als Folge einer chromosomalen Translokation in folliculären B-Zell-Lymphomen überexprimiert ist. Im Gegensatz





*al.*, 1994). Beide Isoformen antagonisieren die antiapoptotische Funktion von Bcl-x<sub>L</sub> (Minn *et al.*, 1996; Shiraiwa *et al.*, 1996). Bcl-x<sub>L</sub> weist gegenüber Bcl-2 eine hohe Sequenzhomologie auf und ist über seinen hydrophoben C-Terminus ebenfalls mitochondrial verankert (Gonzalez-Garcia *et al.*, 1994). An den Mitochondrien inhibieren Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-2 sowohl den apoptotischen (Boise & Thompson, 1997; Decaudin *et al.*, 1997; Jaattela *et al.*, 1995) als auch den nekrotischen Zelltod unter Stabilisierung des mitochondrialen Transmembranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) (Shimizu *et al.*, 1996a; Shimizu *et al.*, 1996b; Vander Heiden *et al.*, 1997). Unabhängig von Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-2 sind weitere antiapoptotische Bcl-2-Homologe bekannt. Dazu gehört neben dem Bcl-w (Gibson *et al.*, 1996) und A1/Bfl-1 (Choi *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1993) auch das im Skelett- und Herzmuskel besonders stark exprimierte Mcl-1 (Sedlak *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1995b). Auffallendes Strukturmerkmal der meisten antiapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie ist, dass sie über alle vier Homologiedomänen BH1-4 verfügen (Gruppe I, Abb. 5).

Diese konservierten Bereiche spielen bei der Funktion der Bcl-2-ähnlichen Proteine eine wichtige Rolle und sind Voraussetzung für die Interaktion und Ausbildung von Homo- und Heterodimeren unter den Bcl-2-Homologen. Durch Heterodimerenbildung von anti- mit proapoptotischen Proteinen können sich die Mitgliedern der Bcl-2-Familie in ihrer Funktion gegenseitig beeinflussen (Reed, 1996, 1997). Zu den heterodimeren Partnermolekülen von Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> werden Proteine gezählt, die in BH1, 2 und 3 eine hohe Sequenzhomologie aufweisen (Gruppe II, Abb. 5) und Apoptose-induzierend wirken. Dieser Gruppe von proapoptotischen Bcl-2-Homologen gehören Proteine wie Bax (Oltvai *et al.*, 1993), Bad (Yang *et al.*, 1995a), Bok (Hsu *et al.*, 1997) und Bak (Chittenden *et al.*, 1995; Farrow *et al.*, 1995; Simonian *et al.*, 1997) an. Für Bak sind gegenwärtig drei verschiedene Gene bekannt, aber nur das auf Chromosom 6 ist biologisch aktiv (Kiefer *et al.*, 1995). Die Expression von Bak erfolgt in vielen Geweben und ist besonders im Herz- und Skelettmuskel sowie in allen Gehirnregionen sehr hoch. Bak ist wie Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> über seinen hydrophoben C-Terminus in der Mitochondrienmembran verankert (Farrow *et al.*, 1995). Eine ähnliche Struktur zeigt auch das Apoptose-induzierende Bax, das unter normalen Bedingungen frei im Zytosol vorliegt. Durch einen Apoptose-auslösenden Stimulus wird eine Zusammenlagerung zweier Bax-Moleküle und die Translokation des Homodimers zu den Mitochondrien induziert (Wolter *et al.*, 1997). Die Bildung des Bax-Homodimers kann dabei durch Heterodimerisierung mit Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> und weiteren antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie (Abb. 5) verhindert werden (Oltvai *et al.*, 1993; Sedlak *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu verhält sich Bax sehr selektiv in seiner

Fähigkeit, die antiapoptotische Funktion von Bcl-2 aufzuheben, und beeinflusst Bcl-x<sub>L</sub> nur wenig in seiner Wirkung (Cheng *et al.*, 1996).

Nicht alle Proteine der Bcl-2-Familie verfügen wie Bcl-2 oder Bax über eine C-terminale Transmembrandomäne zur Lokalisation an den Mitochondrien oder anderen Zellorganellen. Dazu gehört neben Bad auch das Bcl-2-Homologe Bid (Cif) (Han *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1996), das Caspase-gespalten als tBid zur Apoptoseverstärkung über die Mitochondrien beiträgt (vgl. Abb. 4). Bid und weitere proapoptotische Bcl-2-homologe Proteine (Bim, Bik, Hrk) zeigen lediglich in BH3 eine Sequenzhomologie und werden daher auch als BH3-*only*-Proteine bezeichnet (Antonsson & Martinou, 2000) (Abb. 5).

Anhand der NMR-Strukturaufklärung von Bcl-x<sub>L</sub> und seinem Heterodimerkomplex mit dem antagonistischen Bak ergab sich ein generelles Bild für die Proteinkonformation der Bcl-2-Homologen und ihre Dimerenbildung (Muchmore *et al.*, 1996; Sattler *et al.*, 1997). Die Proteine der Bcl-2-Familie besitzen die zwei zentralen  $\alpha$ -Helices  $\alpha$ 5 und  $\alpha$ 6. Die Helices  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 5 und  $\alpha$ 7 tragen die Homologiedomänen BH1-3 und bilden mit dem N-Terminus eine hydrophobe Wechselwirkung zur Proteinstabilisierung aus. Zwischen BH4 und BH1 liegt eine mobile (Loop-) Region mit stark basischen Resten. Die Loopregion ist bei den antiapoptotischen Proteinen am stärksten ausgeprägt und entspricht einem Bereich variabler Länge und einer Sequenz mit geringster Homologie unter den Mitgliedern der Bcl-2-Familie. In diesem N-terminalen Bereich unterliegen die Proteine der Bcl-2-Familie einer posttranslationalen Kontrolle. Dazu sind vor allem die Phosphorylierung und Inaktivierung von Bcl-2 durch die Serin-Threonin-Kinase p72 Raf-1 nach BH4-vermittelter Komplexbildung mit Raf-1 und dem Aktivator der Serin-Threonin-Kaskade p23 r-Ras zu zählen (Blagosklonny *et al.*, 1996; Chen & Faller, 1996). Da auch das proapoptotische Bad durch eine Akt-Kinase-vermittelte Phosphorylierung inaktiviert wird (Datta *et al.*, 1997), scheinen zumindest einige Bcl-2-homologe Proteine unter Kontrolle Zellzyklus-spezifischer Faktoren zu stehen. Darüber hinaus konnte auch eine BH4-abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B durch Inhibierung seines zytosolischen Inhibitorproteins I- $\kappa$ B $\alpha$  und somit eine Beziehung zwischen den Bcl-2-Proteinen und dem NF- $\kappa$ B-Signalweg gezeigt werden (de Moissac *et al.*, 1999). Des Weiteren ist die mobile Region zwischen BH4 und BH1 Angriffspunkt für proteolytische Spaltungen durch Caspasen, die so Bcl-x<sub>L</sub> inaktivieren (Clem *et al.*, 1998), aber das proapoptotische Bid aktivieren (Li *et al.*, 1998b) und dadurch den Apoptosemechanismus verstärken. Im Gegensatz zu den antiapoptotischen enthalten die proapoptotische Proteine

Bak und Bax keine Loopregion. Die Homologiedomänen BH1, 2 und 3 liegen dicht benachbart und formen eine verlängerte hydrophobe Spalte, die der Heterodimerisierung der anti- mit den proapoptotischen Bcl-2-Homologen durch Insertion der BH3-Region dient. Diese Dimerisierungsdomäne enthält mit  $\alpha 5$  und  $\alpha 6$  zwei apolare Helices, die von drei amphiphatischen Helices ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ) umgeben sind. Sie ist außerdem Grundlage dafür, dass einige Bcl-2-Homologe asymmetrisch oligomerisieren und in Abhängigkeit von Spannung und pH-Wert in synthetischen Lipidmembranen Poren ausbilden (Antonsson *et al.*, 2000; Schendel *et al.*, 1998). Diese Kanal-bildende Eigenschaft konnte für das Apoptose-induzierende Bax (Antonsson *et al.*, 1997), aber auch für die antiapoptotischen Proteine Bcl-x<sub>L</sub> (Minn *et al.*, 1997) und Bcl-2 (Schendel *et al.*, 1997) nachgewiesen werden. Obwohl die BH3-only-Proteine wie Bid nur wenig Sequenzhomologie zu Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2 oder Bax zeigen, ist ihre frei vorliegende Struktur sehr ähnlich (Chou *et al.*, 1999). So ist Bid ebenfalls in der Lage in synthetischen Membranen einen Ionenkanal zu formen (Schendel *et al.*, 1999). Dennoch bleibt bisher ungewiss, ob die Proteine der Bcl-2-Familie Membranporen oder Ionenkanäle auch *in vivo* ausbilden.

#### ***Proteine der Bcl-2-Familie beeinflussen die mitochondriale Cytochrom c-Freisetzung***

Pro- und antiapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie regulieren die apoptotische Cytochrom c-Freisetzung aus dem Intermembranraum der Mitochondrien und den Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) (Tsujimoto & Shimizu, 2000). Die genauen molekularen Grundlagen dafür sind aber noch spekulativ, und mehrere Modelle werden gegenwärtig diskutiert.

Anhand der Poren-bildenden Eigenschaft von Bax könnten Bax-Oligomere in der äußeren Mitochondrienmembran eine Pore formen (Antonsson *et al.*, 1997) durch die Cytochrom c freigesetzt wird oder einen Ionenkanal, der zur Destabilisierung des mitochondrialen Transmembranpotentials beiträgt (Antonsson *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 1996). Darüber hinaus sind Bax-Oligomere in der Lage, an den spannungsabhängigen Anionenkanal VDAC zu binden (Shimizu *et al.*, 2000a). Beide Proteine bilden zusammen einen ausreichend großen Kanal zur Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran und Freisetzung von Cytochrom c sowie anderen Apoptose-auslösenden Faktoren aus dem mitochondrialen Intermembranraum. Dabei unterliegt die Oligomerisierung von Bax der negativen Kontrolle durch eine Heterodimerenbildung mit Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> (Shimizu *et al.*, 1999). In diesem Zusammenhang wird ferner vorgeschlagen, dass die Proteine der Bcl-2-Familie als Assoziationsproteine die *permeability transition* (PT)-Pore regulieren. Sowohl pro- als

auch antiapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie sind in der Lage, über den Anionenkanal VDAC der äußeren und den ADP/ATP-Translokator der inneren Mitochondrienmembran mit der PT-Pore zu interagieren (Brenner *et al.*, 2000; Marzo *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 2000b; Shimizu *et al.*, 1999). Dieser Vorschlag wird ferner dadurch unterstützt, dass Bcl-2 (Krajewski *et al.*, 1993; Motoyama & al, 1998) und Bax (Eskes *et al.*, 2000; Gilbert & al, 1999) an der inneren und äußeren Mitochondrienmembran nachgewiesen werden konnten und eine Anreicherung an den Kontaktstellen beider Membranen auftritt. So haben eine ganze Reihe von Untersuchungen die Bedeutung der Bcl-2-Proteinfamilie für die Regulation des mitochondrialen Membranpotentials und ihren Einfluss auch auf den nekrotischen Zelltod herausgestellt (Kane *et al.*, 1995; Shimizu *et al.*, 1996a). Während proapoptotische Bcl-2-Homologe (Bax, Bak) zur Permeabilitätstransition an den Mitochondrien beitragen, wird das mitochondriale Transmembranpotential durch antiapoptotische Mitglieder (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>) der Proteinfamilie stabilisiert (Kroemer & Reed, 2000; Martinou & Green, 2001; Tsujimoto & Shimizu, 2000). Dabei scheint die Eigenschaft der BH4-Domäne, die nur in der Gruppe der antiapoptotischen Bcl-2-Homologen vorkommt, den Anionenkanal VDAC zu schließen, eine entscheidende Rolle zu spielen (Shimizu *et al.*, 2000b).

Die Freisetzung von Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum ist jedoch nicht bei allen Apoptoseabläufen mit einer Depolarisation und dem Anschwellen der Mitochondrien verbunden (Finucane *et al.*, 1999; Kluck *et al.*, 1997). Darüber hinaus können proapoptotische BH3-*only*-Proteine, wie tBid und Bik, die Freisetzung von Cytochrom c auch ohne den Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials auslösen (Shimizu & Tsujimoto, 2000; von Ahsen *et al.*, 2000). Dabei induziert das Caspase-aktivierte tBid die Oligomerisierung und Membranverankerung von Bax in den Mitochondrien (Eskes *et al.*, 2000) und ist unabhängig von seiner Bax-aktivierenden Funktion an der Destabilisierung der Mitochondrienmembran und Cytochrom c-Dissoziation aus dem Intermembranraum beteiligt (Kim *et al.*, 2000; Kudla *et al.*, 2000). Bcl-2 und seine membrangebundenen Homologen sind allerdings nicht nur mit den Mitochondrien sondern auch mit Zellkern oder Endoplasmatischem Retikulum assoziiert, über die sie den nukleären p53-Import (Beham *et al.*, 1997) sowie die zytosolische und nukleäre Kalziumhomöostase (Lam *et al.*, 1994; Marin *et al.*, 1996; Tagami *et al.*, 2000) kontrollieren.

#### **1.4. Fragestellung der Arbeit: Bedeutung von Proteine der Bcl-2-Familie im kardiovaskulären System?**

Die Herzmuskelzellen sind unter pathologischen Bedingungen des Herz-Kreislaufsystems, zu denen mechanische und neurohumorale Überbeanspruchung der Kardiomyozyten, Ischämie, Reperfusion und endotheliale Dysfunktionen zählen, physiologischen Stimuli unterworfen, die zu ihrer Schädigung und zur Auslösung der Zellapoptose beitragen. Da die Proteine der Bcl-2-Familie in die Regulation der Apoptoseauslösung eingreifen und darüber hinaus den nekrotischen Zelltod verzögern können, stellt sich die Frage nach ihrem Expressionsverhalten im kardiovaskulären System. Dazu wurde das Myokard von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz sowie der regional hypoperfundierte Herzmuskel in tierexperimentellen Studien am Schwein analysiert. Darüber hinaus wurde in einem Zellkulturmodell der Einfluss der durch den Blutstrom induzierten laminaren Schubspannung auf humanen Endothelzellen untersucht.

## **2. Expression von Proteinen der Bcl-2-Familie im Myokard von Patienten mit terminaler Herzerkrankung**

### **2.1. Ausmaß der myokardialen Apoptose in der terminalen Herzinsuffizienz**

Bei schwerer Herzinsuffizienz liegt eine erhöhte ventrikuläre Wandspannung und mechanische Dehnung der Kardiomyozyten vor. Diese hämodynamische Überlastung der Herzmuskelzellen resultiert in einer reduzierten Förderleistung des Herzens, die neurohumoral nicht mehr ausgeglichen werden kann. Ein kontinuierlicher Verlust von Kardiomyozyten durch eine Überlast-induzierte Apoptose wird dabei für das Fortschreiten der Herzerkrankung verantwortlich gemacht (Kang & Izumo, 2000). Obwohl der apoptotische Zelltod von Kardiomyozyten auch bei der Initiation der Herzinsuffizienz infolge einer regionalen Myokardischämie eine Rolle spielt und maßgebend an der Entwicklung des Herzinfarktes beteiligt ist (James, 1997; Saraste *et al.*, 1997), führt die hämodynamische Überbeanspruchung des Myokards bereits während der kompensatorischen Myokardhypertrophie zur Apoptose von Kardiomyozyten (Hamet *et al.*, 1995). Daher scheint der apoptotische Zelltod von Herzmuskelzellen direkt am Übergang von der Kompensations- in die Dekompensationsphase beteiligt zu sein (Bing, 1994). So wurden Kardiomyozyten mit apoptotischen Anzeichen in nichtischämischen

Myokardbereichen des explantierten Myokards von Patienten sowohl mit dilatativer (DCM) als auch ischämisch bedingter Kardiomyopathie (ICD) nachgewiesen (Narula *et al.*, 1996; Olivetti *et al.*, 1997). Experimentelle Modelle konnten zudem bestätigen, dass die mechanische Überdehnung und Überbeanspruchung der Herzmuskelzellen zur Apoptose führen (Cheng *et al.*, 1995; Leri *et al.*, 1998b; Sharov *et al.*, 1996).

Zur histologischen Apoptosequantifizierung wird in Kombination mit elektronenmikroskopischen Studien die terminale Desoxynukleotidtransferase-vermittelte dUTP-Markierung (TUNEL) der freien 3'-OH-Enden herangezogen, um im Zellkern die apoptotische Fragmentierung der chromosomalen DNA zellspezifisch zu untersuchen. In einer Studie am explantierten Myokard von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz konnte dabei gezeigt werden, dass eine erhöhte Anzahl TUNEL-positiver Kardiomyozyten mit der verschlechterten hämodynamischen Funktion des Herzens übereinstimmt (Saraste *et al.*, 1999). Da Aussagen zu apoptotischen Veränderungen des Zellkerns, die mittels der *in situ* TUNEL-Technik getroffen werden können, aber aufgrund unspezifischer Bindungen von DNA und nukleärem (*nuclear*) Antigen (Kano *et al.*, 1999) sowie unspezifischer Markierungen von Kalziumvesikeln und RNA-Spleißfaktoren limitierend sind (Labat-Moleur *et al.*, 1998), haben Untersuchungen des explantierten Myokards zu sehr großen Differenzen in den Ergebnissen geführt. So wurden im terminal insuffizienten Herzen zwischen 0,005 und 18 % apoptotische Kardiomyozytenzellkerne identifiziert (Narula *et al.*, 1996; Schaper *et al.*, 1999). Daher ist gegenwärtig noch unklar, in welchem Ausmaß der apoptotische Zelltod im insuffizienten Myokard vorliegt.

Das zentrale Element des apoptotischen Signalweges ist die Aktivierung der Caspasekaskade aus Initiator- und Effektorcaspasen sowie die Freisetzung von Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum (Hengartner, 2000). Obwohl die TUNEL-Analyse für die Detektion der Zellkernapoptose umstritten ist, konnte dennoch gezeigt werden, dass im insuffizienten Myokard eine erhöhte Sensitivierung gegenüber dem apoptotischen Zelluntergang vorliegt. So wurde eine Aktivierung von Effektorcaspasen in Kardiomyozyten des ischämischen Myokards nachgewiesen (Freude *et al.*, 2000), die auch im Überlastmyokard der Patienten eine Rolle zu spielen scheint (de Boer *et al.*, 2000; Narula *et al.*, 1999). Die Aktivierung des Apoptoseprogramms bei der terminalen Herzerkrankung wird dabei durch eine massive Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien der Kardiomyozyten gestützt (Narula *et al.*, 1999). Da die Herzmuskelzellen im Vergleich zu anderen Zellen sehr mitochondrienreich sind, um die Sauerstoffversorgung für ihre ständige kontraktile Funktion zu gewährleisten, deuten diese Daten auf

das Gewicht des mitochondrialen Apoptoseweges bei der Entwicklung und Manifestation der Herzinsuffizienz hin. Ob und in welchem Ausmaß die Proteine der Bcl-2-Familie daran beteiligt sind, ist jedoch unklar.

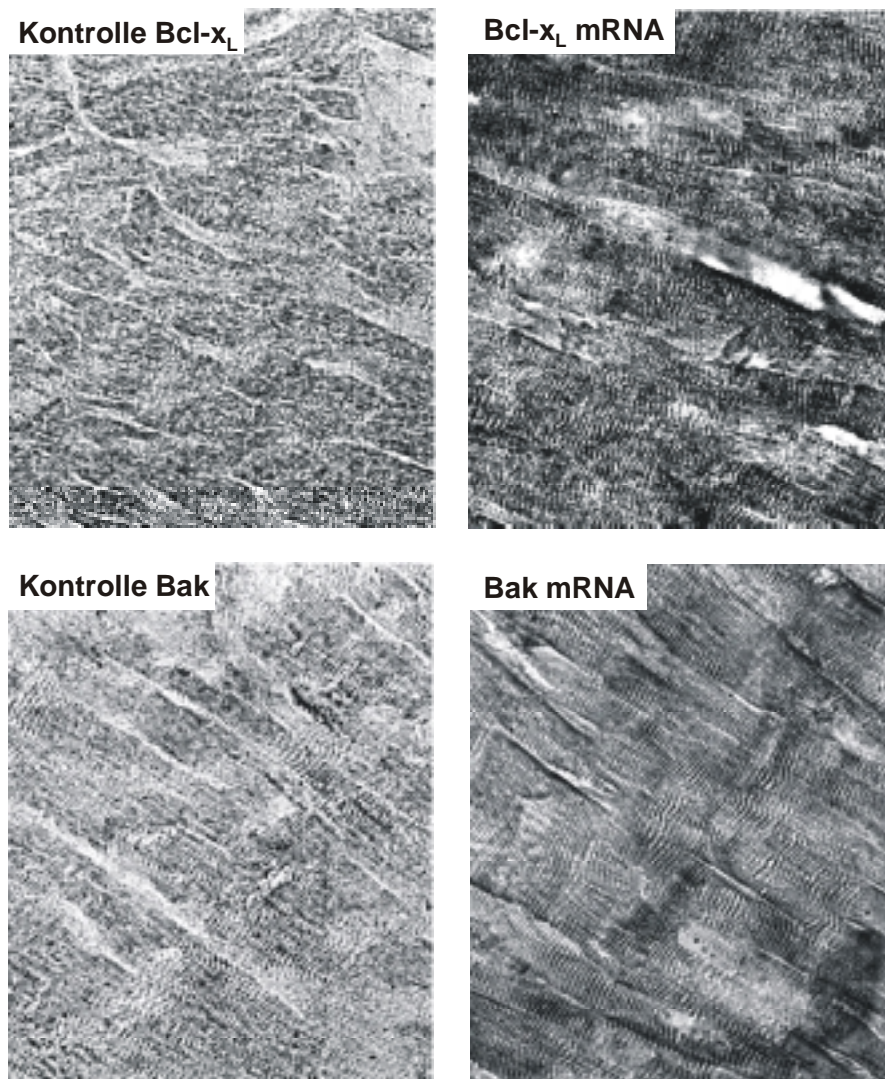
## **2.2. Expression von Proteinen der Bcl-2-Familie im insuffizienten menschlichen Myokard**

Um zu untersuchen, ob pro- und antiapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie an einer erhöhten Sensitivität des insuffizienten, terminal überdehnten Myokards gegenüber Apoptose beteiligt sind, wurde die myokardiale Expression von Bcl-2 und seinen Homologen im menschlichen Myokard analysiert (vgl. 7.1.). Die Analysen wurden am explantierten linksventrikulären Myokard von Patienten mit terminaler Herzerkrankung durchgeführt, die im Rahmen des Transplantationsprogramms der Universität Halle ein neues Herz implantiert bekommen haben. Im Vergleich zum Myokard von Organspendern, das aufgrund einer leichten koronaren Herzerkrankung oder anderer Anzeichen nicht für die Transplantation verwendet werden konnte, zeichnete sich das Myokard der herzinsuffizienten Patienten durch eine erhöhte linksventrikuläre mRNA-Expression des atrialen natriuretischen Faktors (Pro-ANF) aus (vgl. 7.1.), was die erhöhte Wandspannung im linken Ventrikel und Überdehnung der Kardiomyozyten veranschaulicht (Garcia *et al.*, 1992; Knowlton, 1992). Darüber hinaus deutete die erhöhte myokardiale Expression des sarkolemmalen  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers gegenüber der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) auf die veränderte Kalziumhomöostase der Kardiomyozyten in diesen Patienten und die fortgeschrittene Herzinsuffizienz hin (vgl. 7.1.).

Im insuffizienten Myokard konnte eine dreifach verstärkte myokardiale Apoptose anhand der apoptotischen DNA-Fragmentierung in der Gelelektrophorese sowie 0,5 % apoptotische Zellkerne in den Kardiomyozyten mittels der *in situ* TUNEL-Technik gezeigt werden (vgl. 7.1.). Die Zunahme der myokardialen Apoptoseanzeichen ging dabei mit einer deutlichen Abnahme der RNA- und Proteinexpression des antiapoptotischen Bcl- $x_L$  einher. Die mRNA der proapoptotischen Bcl-x-Isoform Bcl- $x_S$  konnte im humanen Myokard nicht detektiert werden. Während Bcl-2 und das ebenfalls antiapoptotische Mcl-1 sowie das proapoptotische Bax in ihrem Expressionsspiegel unverändert blieben, war auch die Expression des Bcl- $x_L$ -Antagonisten Bak erniedrigt. Ob es sich bei der reduzierten Bak-Expression um einen kompensatorischen Effekt gegenüber seinem antagonistischen Heterodimerenpartner Bcl- $x_L$  handelt oder ob Bak unter bestimmten physiologischen Bedingungen seine proapoptotische Funktion nicht ausübt (Kiefer *et al.*, 1995), ist in



Anbetracht einer gleichzeitig erhöhten Apoptose im insuffizienten Myokard noch unklar. Anhand der *in situ* RT-PCR konnte dabei nachgewiesen werden, dass die mRNAs von Bak und Bcl-x<sub>L</sub> in den linksventrikulären Kardiomyozyten des humanen Myokards exprimiert werden (Abb. 6). Im Expressionsverhalten der Proteine der Bcl-2-Familie konnten keine Unterschiede zwischen dem Myokard von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und ischämisch bedingter Herzerkrankung (CAD) identifiziert werden (vgl. 7.1.).



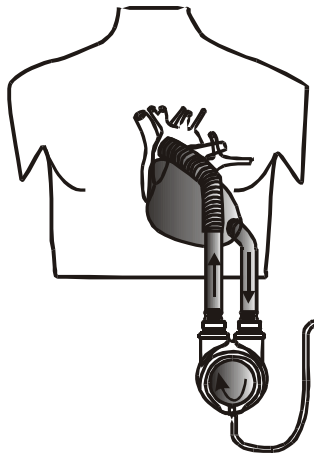
**Abb. 6. mRNA-Nachweis von Bcl-x<sub>L</sub> und Bak durch Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (*in situ* RT-PCR) in humanen Kardiomyozyten eines linksventrikulären Spendermyokards.** Die *in situ* RT-PCR wurde nach einem Protokoll des Pathologischen Institutes der Universität Kiel durchgeführt (Krams *et al.*, 2000). Dabei werden im letzten Schritt der PCR Digoxigenin-markierte Oligonukleotide eingebaut, so dass der Farbnachweis mittels eines Alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Digoxigenin-Antikörpers durch Umschlag des NBT/BCIP-Substrates und Fällung eines blauen Niederschlages erfolgt (60fache Vergrößerung).

### **2.3. Einfluss von therapeutischer Behandlung auf die Abnahme der ventrikulären Überlast und die myokardiale Expression der Bcl-2-ähnlichen Proteine**

In der Behandlung der Herzinsuffizienz werden neben den  $\beta$ -Rezeptorenblockern Inhibitoren des Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) eingesetzt, um die ventrikuläre Wandspannung zu reduzieren (Booz & Baker, 1996). Anhand des Einflusses einer chronischen Therapie mit ACE-Hemmern auf die Expression der antiapoptotischen Proteine Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-2 (vgl. 7.1.) zeichnet sich eine direkte Beziehung zwischen der ventrikulären Überlast des insuffizienten menschlichen Myokards und der linksventrikulären Expression von Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-2 ab. Während Patienten ohne ACE-Hemmerbehandlung durch eine sehr niedrige Expression der beiden antiapoptotischen Faktoren gekennzeichnet sind, ist die Bcl-x<sub>L</sub>- und Bcl-x<sub>L</sub>/Bak-Expression in Patienten mit ACE-Hemmertherapie signifikant erhöht und erreicht im Fall von Bcl-2 sogar den myokardialen Wert im Spendermyokard. Dabei liegt bei Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-2 eine positive Korrelation zwischen der mRNA- und Proteinexpression im humanen Myokard vor (vgl. 7.1.). Die Behandlung mit  $\beta$ -Rezeptorenblockern zeigt dagegen keinen Einfluss auf die Expression Bcl-2-homologer Proteine.

Sind jedoch Patienten mit einem terminal erkrankten Herzen pharmakologisch nicht mehr stabilisierbar, wird ihnen zur Überbrückung der Zeitspanne, bis ein geeignetes Spenderherz für die Transplantation zur Verfügung steht, ein ventrikuläres Unterstützungssystem (VAD) implantiert. Die VAD-Systeme können dabei über Wochen und Monate die Pumpfunktion eines oder beider Ventrikel übernehmen und so für eine ausreichende Perfusion der peripheren Organe sorgen (Abb. 7). Durch die mechanische Entlastung des Myokards verringert sich die ventrikuläre Wandspannung und die Überlast-induzierte mRNA-Expression von Pro-ANF sinkt im ventrikulären Myokard und erreicht annähernd die Pro-ANF-Expression im Spenderventrikel (vgl. 7.1.). Da der Überlast-induzierte strukturelle Umbau des Herzens mit einer starken Dilatation der Herzkammern entscheidend zur Verschlechterung der Herzfunktion beiträgt (Katz, 1990), kann die hämodynamische Entlastung des erkrankten Herzens zu einer Verbesserung der Herzfähigkeit führen. So konnte in einigen klinischen Studien gezeigt werden, dass die VAD-vermittelte Reduktion der ventrikulären Vor- und Nachlast zum partiellen Rückgang der Kardiomyozytenhypertrophie (Zafeiridis *et al.*, 1998), Anstieg des Herzzeitvolumens und Abnahme der ventrikulären Kammerdilatation geführt hatte (Levin *et al.*, 1995; McCarthy *et al.*, 1997). Ferner resultiert aus der VAD-Unterstützung nicht nur eine verbesserte Durchblutung der peripheren Organe sondern auch eine Normalisierung des

neurohumoralen Status (Noradrenalin-, Aldosteron-, Reninspiegel) (Levin *et al.*, 1994), so dass VAD-Patienten verglichen mit Patienten ohne vorherige VAD-Entlastung eine spätere Herztransplantation besser verarbeiten (Frazier *et al.*, 1996). In einigen Fällen konnte das VAD-System aufgrund einer deutlichen Funktionsverbesserung des Myokards sogar ohne eine anschließende Transplantation wieder explantiert werden (Müller *et al.*, 1997). Der Einbau eines VADs führt aber nicht in allen Fällen zur Stabilisierung des Patienten bis zur Herztransplantation, wenn das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz mit irreversiblen Schädigungen des Myokards und dem schlechten Allgemeinzustand des Patienten zu weit fortgeschritten ist. Darüber hinaus stellt trotz starker Heparinisierung des Blutes die Thrombenbildung eine erhöhte Gefährdung dar, so dass die Erfolgsrate der Überbrückung bis zur Transplantation im allgemeinen zwischen 60 und 70 % liegt (Levin *et al.*, 1995; McCarthy *et al.*, 1997).



**Abb. 7. Schematische Darstellung eines Ventrikulären Unterstützungssystem (VAD) zur mechanischen Entlastung des insuffizienten Ventrikels.** Das VAD kann sowohl im linken oder rechten als auch beiden Ventrikeln implantiert werden (LVAD, RVAD bzw. BVAD). VAD-Systeme sind parallel zum Herzen geschaltet und werden während der Diastole infolge der Ventrikelfüllung passiv gefüllt und pumpen während der Systole das aufgenommene Blut über die Aorta wieder in den Blutkreislauf. Neben den Elektrokardiogramm- (EKG-) gesteuerten VAD-Systemen gibt es auch VADs, die mit einem konstanten Rhythmus arbeiten.

Bei Patienten, denen aufgrund eines terminal insuffizienten, überdehnten Herzens mit maximaler neuroendokriner Aktivierung ein VAD implantiert wird, fallen sowohl während des Einbaus als auch nach der VAD-Explantation mit anschließender Herztransplantation ventrikuläre Gewebeproben an. In Kooperation mit dem Herzzentrum Bad Oeynhausen konnten diese beiden Gewebe von ein und dem selben Patienten vergleichend untersucht werden. Durch diese vergleichende Analyse wurde es möglich herauszufinden, ob durch die anhaltende hämodynamische Entlastung Herzinsuffizienz-typische Veränderungen im Myokard rückgängig gemacht werden können. In den untersuchten linksventrikulären Myokardprobenpaaren wurde so durch die mechanische Entlastung des Herzens und den Rückgang des pulmonal-kapillären Verschlussdrucks nicht nur eine sofortige Normalisierung der mRNA-Expression des Überlastmarkers Pro-ANF, sondern auch ein Rückgang

der apoptotischen DNA-Fragmentierung im unterstützten Ventrikel beobachtet (vgl. 7.1.). Die verminderte Myokardapoptose geht dabei mit einer partiellen Normalisierung der Bcl-x<sub>L</sub>-mRNA-Expression einher, die in Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie zudem abhängig von der VAD-Unterstützungszeit ist. Zusätzlich zur allmählichen Normalisierung der Bcl-x<sub>L</sub>-mRNA-Expression und seiner Expression im Verhältnis zum antagonistischen Heterodimerenpartner Bak steigt auch die ventrikuläre Expression des antiapoptotischen Bcl-2-Homologen Mcl-1 unter VAD-Entlastung an, was möglicherweise auf den VAD-vermittelten Rückgang des ANF-Spiegels zurückzuführen ist (Wu *et al.*, 1997).

In der Studie konnten allerdings keine klinischen Parameter zur Ventrikelfunktion unter VAD-Entlastung erhoben und mit den Expressionsdaten verglichen werden, da für solche funktionellen Messungen das Abschalten des VAD-Systems mit einem unkalkulierbaren Risiko für den Patienten notwendig gewesen wäre. Daher wurde die funktionelle Erholung indirekt über die mRNA-Expression von Determinanten der myozytären Kalziumhomöostase untersucht, da eine verminderte mRNA- und Proteinexpression der SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) zur reduzierten Kalziumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum (Meyer *et al.*, 1995), kontraktilen Dysfunktion (Schmidt *et al.*, 1998) und kompensatorisch erhöhten Expression des Na<sup>+</sup>Ca<sup>2+</sup>-Austauschers an der Plasmamembran führt (Studer *et al.*, 1994). Jedoch konnte im gesamten Patientenkollektiv keine partielle Normalisierung der mRNA-Expression von SERCA per Na<sup>+</sup>Ca<sup>2+</sup>-Austauscher festgestellt werden, aber interessanterweise in der Subgruppe von Patienten, die durch eine verbesserte mRNA-Expression des antiapoptotischen Bcl-x<sub>L</sub>/Bak und Mcl-1 unter VAD gekennzeichnet waren. Darüber hinaus zeigten diese Patienten eine etwas weniger schlechte Ventrikelfunktion vor der VAD-Implantation durch einen geringeren pulmonal-kapillären Verschlussdruck und einer verminderten Notwendigkeit der positiv inotropen Intensivtherapie (vgl. 7.1.). Anhand dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass unter VAD-Entlastung die Möglichkeit für Myokarderholung und einen Rückgang der myokardialen Apoptose unter Beteiligung von Proteinen der Bcl-2-Familie besteht. Die VAD-bedingten Verbesserungen sind aber bei einzelnen Patienten unterschiedlich und zusätzlich vom Ausmaß der Herzerkrankung vor der VAD-Implantation abhängig.

#### **2.4. Modell zur Beteiligung von Proteinen der Bcl-2-Familie bei der Manifestation der Herzinsuffizienz**

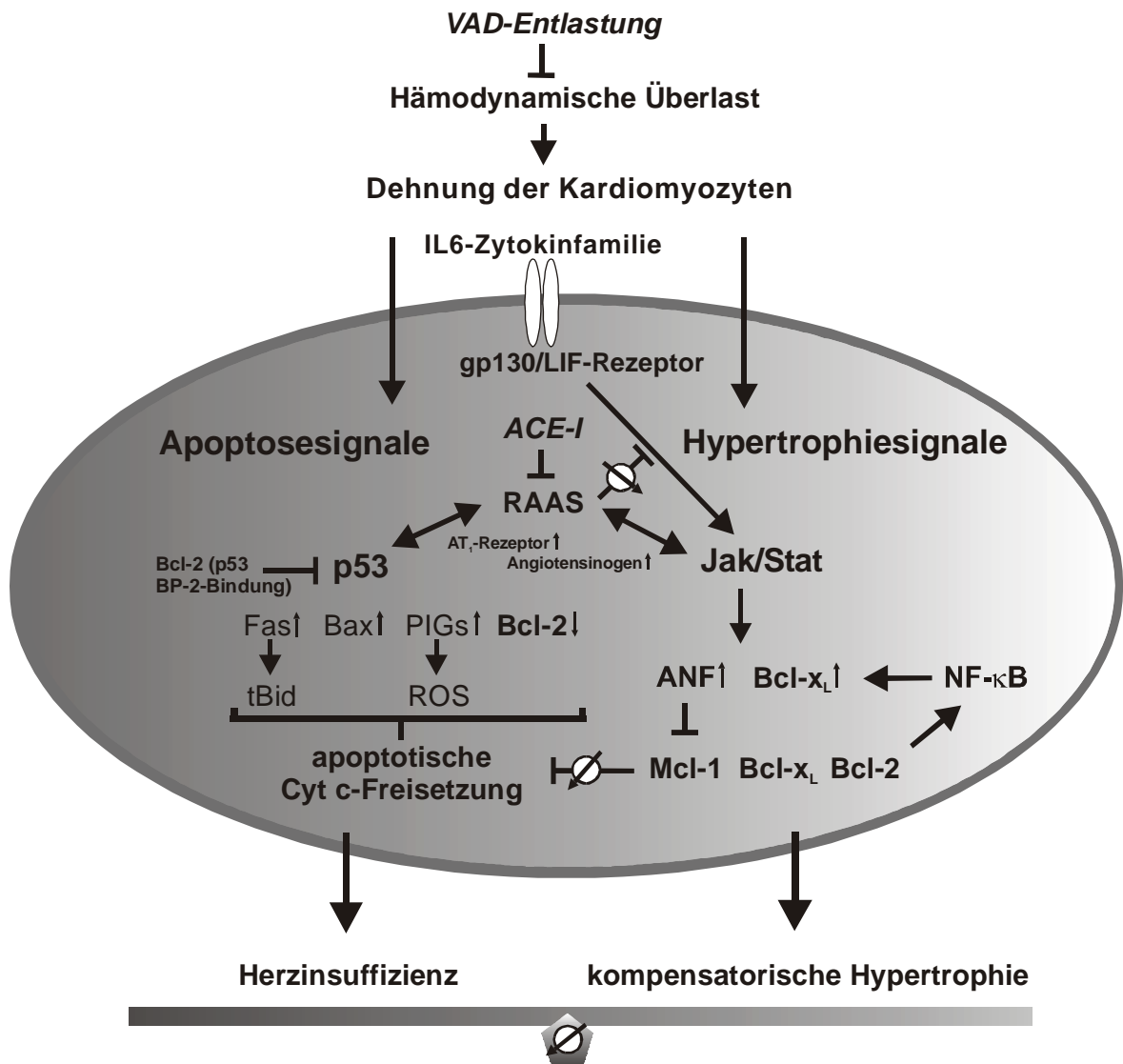
Die Reinduktion der Bcl-x<sub>L</sub>- und Bcl-2-Expression im terminal insuffizienten Myokard durch Behandlung mit ACE-Hemmern oder durch mechanische VAD-Entlastung lassen

auf den Einfluss der hämodynamischen Überlast und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) auf die Myokardapoptose schließen. So konnte bereits in experimentellen Modellen gezeigt werden, dass die mechanische Überdehnung der Kardiomyozyten zur Apoptoseinduktion durch RAAS-Aktivierung und eine durch p53 verminderte Bcl-2- aber erhöhte Expression proapoptotischer Faktoren (Bax, Fas) führt (Leri *et al.*, 1998a; Leri *et al.*, 2000; Pierzchalski *et al.*, 1997). Die p53-kontrollierte Induktion des Promotors von AT<sub>1</sub>-Rezeptor und Angiotensinogen führt zur weiteren Verstärkung der RAAS-induzierten Apoptose (Leri *et al.*, 1998a) (Abb. 8). Darüber hinaus induziert p53 auch sogenannte PIGs (*p53-induced genes*), deren Genprodukte zum oxidativen Stress und zu Dysfunktionen der Mitochondrien beitragen, die den mitochondrialen Apoptoseweg auslösen (Polyak *et al.*, 1997).

Obwohl gut dokumentiert ist, dass die Herzmuskelzellen durch das Renin-Angiotensin-System eine hypertrophe Stimulation erfahren (Weir & Dzau, 1999), treibt Angiotensin II andererseits adulte Kardiomyozyten in den apoptotischen Zelltod (Kajstura *et al.*, 1997). So konnten tierexperimentelle Langzeittherapien mit ACE-Hemmern oder die direkte Blockade des AT<sub>1</sub>-Rezeptors (Fortuno *et al.*, 1998; Goussev *et al.*, 1998) die Reduktion der Myokardapoptose in einem Herzinsuffizienzmodell zeigen und somit die erhöhte Expression der antiapoptotischen Faktoren Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-2 im humanen Myokard unter chronischer ACE-Hemmerbehandlung bekräftigen (vgl. 7.1.).

Da die VAD-Patienten jedoch mit ACE-Inhibitoren behandelt wurden, scheint die mechanische zusätzlich zur pharmakologischen Entlastungstherapie einen Effekt auf die Bcl-x<sub>L</sub>- aber nicht Bcl-2-Expression zu haben. Dies wird trotz der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten zwischen Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-2 anhand ihrer unterschiedlichen transkriptionellen Regulation verständlich (Grad *et al.*, 2000; Miyashita *et al.*, 1994a; Stephanou *et al.*, 2000). Während der Promotor von Bcl-2 und anderen apoptotischen Faktoren unter Kontrolle von p53 stehen, ist die Bcl-x<sub>L</sub>-Transkription Jak/Stat- oder Rel/NF-κB-reguliert (Grad *et al.*, 2000) (Abb. 8). Dabei induziert der Jak/Stat-Signalweg die Bcl-x<sub>L</sub>- aber auch die Mcl-1-Transkription, hat jedoch einen inhibierenden Effekt auf die Bcl-2-mRNA-Expression (Stephanou *et al.*, 2000). Nach Stimulation des gp130/LIF-Rezeptors durch Cardiotrophin-1 und andere Mitglieder der IL-6-Zytokinfamilie ist der Jak/Stat-Signalweg unmittelbar an der kompensatorischen Hypertrophie des erkrankten Myokards mit einer verstärkten Proteinsynthese und erhöhten ANF-Expression beteiligt (Kunisada *et al.*, 1998). Auch die unmittelbare Dehnung der Kardiomyozyten (Pan *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001) und die RAAS-Aktivierung (Kodama *et al.*, 1998) tragen zur

Jak/Stat-induzierten trophischen Reaktion bei, die über eine Stat-abhängige Induktion des Angiotensinogenpromotors weiter aufrechterhalten wird (Mascareno *et al.*, 1998). Jedoch ist die Jak/Stat-Induktion durch Angiotensin II gp130/LIF-unabhängig (Kodama *et al.*, 1998). Dabei besteht eine negative Beziehung zwischen dem Angiotensin II- und dem gp130/LIF-induzierten Jak/Stat-Signalweg (Tone *et al.*, 1998). Während über gp130/LIF die apoptotische DNA-Fragmentierung in den Kardiomyozyten verhindert wird, inhibiert Angiotensin II den gp130/LIF-vermittelten zytoprotektiven Effekt über die Stat-Transkriptionsfaktoren. Dabei induziert Angiotensin II Stat-1 und -2 in der frühen und Stat-3 in der späten Phase (Kodama *et al.*, 1998). Interessanterweise wird aber schon nach kurzer Zeit die Stat-1-Aktivierung durch Angiotensin II wieder aufgehoben. Da auch das antiapoptotische Bcl-x<sub>L</sub> in den Kardiomyozyten unter transkriptioneller Kontrolle von Stat-1 und vermutlich anderen Stat-Proteinen steht (Fujio *et al.*, 1997; Grad *et al.*, 2000), ist dies ein möglicher Grund für die reduzierte myokardiale Expression des protektiven Bcl-x<sub>L</sub> in der Endphase der Herzinsuffizienz. Auch die anhaltende mechanische Belastung von kultivierten Kaninchentrabekeln führte in einem *in vitro*-Langzeitmodell zur kardialen Apoptose und gleichzeitig zur verminderten Bcl-x<sub>L</sub>-mRNA-Expression (Schumann, 2000). Dabei könnte die Zunahme der Myokardapoptose durch Reduktion der Bcl-x<sub>L</sub>-Expression ein entscheidender Faktor beim Übergang von der Kompensations- in die Dekompensationsphase des überlasteten Herzens sein, der durch VAD-Entlastung und Normalisierung des neurohumoralen Spiegels (Levin *et al.*, 1994) wieder aufgehoben wird (Abb. 8). Die Stat-abhängige Bcl-x<sub>L</sub>-Transkription ist jedoch nicht die einzige transkriptionelle Kontrolle, unter der Bcl-x<sub>L</sub> steht. Daneben ist die mRNA-Expression von Bcl-x<sub>L</sub> auch Rel/NF-κB-reguliert (Chen *et al.*, 2000) und könnte zusätzlich eine entscheidende Rolle bei der Apoptoseregulation durch den NF-κB-Transkriptionsfaktor spielen (Barkett & Gilmore, 1999), dessen DNA-Bindungsaktivität in ventrikulären Kardiomyozyten durch Bcl-2 verstärkt wird (Kirshenbaum, 2000).



**Abb. 8. Signaltransduktionswege im Überlastmyokard unter Einbeziehung kardioprotektiver Proteine der Bcl-2-Familie.** Die Druck- und Volumenüberlastung des Myokards führt zum erhöhten ventrikulären „Wandstress“ und gleichzeitigen Aktivierung von Signaltransduktionswegen, die zur kompensatorischen Hypertrophie des Myokards aber auch zur myokardialen Apoptose führen. Dabei ist die Reaktion des Myokards auf die hämodynamische Überlast vom Gleichgewicht zwischen beiden Signalwegen abhängig und entscheidend dafür, ob das Überlastmyokard von der Kompensations- in die Dekompensationsphase (manifeste Herzinsuffizienz) übergeht. Dabei spielt die Aktivierung des antiapoptotischen Bcl-x<sub>L</sub> unter Kontrolle des Jak/Stat-Signalweges und die Aktivierung anderer Bcl-2-Proteine unter Kontrolle der p53-Expression eine zentrale Rolle. *Modifiziert nach Hunter & Chien, 1999, unter Einbeziehung relevanter Referenzen, vgl. Text.*

### **3. Expression von Proteinen der Bcl-2-Familie im regional hypoperfundierten Myokard des Schweins (*Sus scrofa*)**

#### **3.1. Apoptose im hypoperfundierten Myokard und nach Reperfusion**

Nach dem Verschluss einer Koronararterie führt die damit verbundene akute Ischämie zum nekrotischen und apoptotischen Zelluntergang von Kardiomyozyten im zu versorgenden Myokardareal, d.h. zum klinischen Zustand des Herzinfarktes. Während in der ersten Phase des Koronarverschlusses die Zellen zunächst apoptotisch sterben, tritt mit zunehmender Dauer der kardialen Ischämie der Zelltod durch Nekrose ein (Kajstura *et al.*, 1996). In der Folge werden beim Infarktpatienten im Zentrum des Herzinfarkts vorwiegend nekrotisch sterbende Zellen gefunden. Die Kardiomyozyten in den Infarkttrandgebieten unterliegen dagegen eher dem apoptotischen Zelltod (Olivetti *et al.*, 1996). Im tierexperimentellen Modell ist die Zunahme der Ischämie-induzierten Apoptose mit einer verstärkten kardialen Expression des Apoptose-auslösenden Oberflächenrezeptors Fas verbunden (Kajstura *et al.*, 1996). Das Myokard aktiviert aber auch verschiedene kardioprotektive Mechanismen, um der Zellschädigung durch Ischämie zunächst entgegenzuwirken. Dazu zählt neben der Induktion von Hitzeschockproteinen (HSP) (Dillmann *et al.*, 1986; Mehta *et al.*, 1988) die erhöhte Expression des antiapoptotischen Bcl-2 (Kajstura *et al.*, 1996), dessen Überexpression zur Einschränkung des ischämischen Zellverlustes führt (Martinou *et al.*, 1994; Shimizu *et al.*, 1995). Analog bewirkt auch die experimentelle Hyperthermie mit Stimulation der Hitzeschockproteinexpression (Currie *et al.*, 1988) oder die Überexpression von Hsp70 (Mestril *et al.*, 1994) eine Verminderung der ultrastrukturellen Zerstörung des Myokards und der Zellyse durch Ischämie sowie eine bessere kontraktile Erholung nach der Reperfusion. Im Myokard konnte dabei eine direkte Beziehung zwischen der induzierten Hsp70-Expression und dem Grad der Myokardprotektion gezeigt werden (Marber *et al.*, 1994). Die induzierbare Hsp70-Form vermittelt die korrekte Proteinfaltung unter zellulären Stressbedingungen und gehört neben dem konstitutiv exprimierten Hsc70 zu den 70-kDa-Hitzeschockproteinen, welche die am häufigsten exprimierte Familie der Hsp-Chaperone in eukaryotischen Zellen bildet (Feldmann & Frydman, 2000; Harrison *et al.*, 1987). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Hitzeschockproteine an der Beeinflussung des mitochondrialen Apoptoseweges beteiligt sind. So kann sowohl Hsp70 als auch Hsp90 die Formation des Apoptose-auslösenden Apoptosomkomplexes und die Aktivierung der Caspase-9 verhindern (Pandey *et al.*, 2000; Saleh *et al.*, 2000).



Obwohl die Expression dieser kardioprotektiven Faktoren unter ischämischen Bedingungen ausgelöst wird, ist ihre Induktion nicht ausreichend, um während einer akuten Ischämie den Verlust an Kardiomyozyten im Infarktzentrum aufzuhalten. Darüber hinaus führt die Reperfusion des ischämischen Myokards zu einer weiteren Gewebeverletzung und zum apoptotischen Zelluntergang (Gottlieb *et al.*, 1994). Nicht selten wird dabei erst durch die Reperfusion und nicht die Ischämie eine akute Zellschädigung mit Apoptose hervorgerufen (Freude *et al.*, 2000). Dennoch könnte eine erhöhte Expression kardioprotektiver Proteine in den gefährdeten Infarkttrandgebieten oder im *hibernating* Myokard mit moderater Mangel durchblutung zum kardialen Schutz gegenüber Hypoperfusion und nachfolgender Reperfusion beitragen. Daher wurde an einem tierexperimentellen Modell mit einer definierten Reduktion der myokardialen Durchblutung untersucht, ob kardioprotektive Faktoren im *hibernating* Myokard induziert werden und somit zum Schutz gegenüber Hypoperfusion und Reperfusion beitragen. Als kardioprotektive Determinante wurde neben Hsp70 das antiapoptotische Bcl-2-Homolog Bcl-x<sub>L</sub> analysiert, das überexprimiert, wie Bcl-2, den Ischämie-induzierten Zelltod von Kardiomyozyten verhindert (Shimizu *et al.*, 1995), aber im Myokard 10<sup>3</sup>-fach höher transkribiert wird als Bcl-2 (vgl. 7.1). Um die pathophysiologische Gefährdung des Myokards durch die verminderte Durchblutung einzuschätzen, wurde vergleichend die Expression des antagonistischen Heterodimerenpartners von Bcl-x<sub>L</sub>, dem proapoptotischen Bak (Holinger *et al.*, 1999), charakterisiert.

### ***Kurzzeit-Hibernation und Stunning im Myokard des Schweins***

Als experimentelles Tiermodell für die Versuche zur Myokardhypoperfusion diente das Schwein, weil es analog dem Menschen über keinen ausgeprägten myokardialen Kollateralenkreislauf verfügt und deshalb die Entwicklung des Herzinfarkts ähnlich ist (Schulz & Heusch, 1995). Die Untersuchungen fanden in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Pathophysiologie des Universitätsklinikums Essen an Göttinger Minischweinen statt (vgl. 7.2.). Durch Abbinden der *proximal* links *anterior* hervorgehenden Koronararterie (LAD) wurde über 90 Minuten eine regionale Mangel durchblutung im linken Ventrikel erzeugt, die den transmural myokardialen Blutfluss um annähernd 50 % von  $0,77 \pm 0,14$  auf  $0,38 \pm 0,09$  ml·min<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup> (p<0,05) reduzierte. Die Entnahme der linksventrikulären Gewebeproben erfolgte transmural aus dem Perfusionsbett der LAD nach verschiedenen Zeiten der Hypoperfusion im *hibernating* und nach 30 Minuten Reperfusion im *stunned* Myokard. Die Kontrollbiopsien wurden aus dem nichthypoperfundierten Ventrikelbereich der linken Circumflexarterie entnommen. Die Charakteri-

sierung von *Kurzzeit-Hibernation* und myokardialem *Stunning* erfolgte anhand kardiologischer und biochemischer Parameter.

Durch das Abbinden der LAD wurde nach 5 Minuten Hypoperfusion besonders im subendokardialen Bereich der Blutfluss um mehr als 50 % vermindert (vgl. 7.2.). Das *hibernating* Myokard zeichnete sich dabei durch eine gleichzeitige Reduktion von kontraktile Funktion und Sauerstoffverbrauch aus. Die zellulären Speicher an Kreatinphosphat wurden zunächst aufgebraucht, aber das Myokard zeigte trotz Laktatanstieg keine Anzeichen von nekrotischen Zelluntergängen. Die in diesem frühen Stadium auftretenden metabolischen Veränderungen erholten sich durch die parallele Abnahme der kardialen Funktion im Verlauf der anhaltenden Hypoperfusion wieder und passten sich dem verminderten Bedarf an. So erreichte nach 90 Minuten Mangeldurchblutung der Kreatinphosphatgehalt des Myokards annähernd die Kontrollwerte, und der Laktatanstieg wurde vermindert. Der physiologische Zustand des myokardialen *Hibernation* hatte sich eingestellt. Auch 30 Minuten nach der Reperfusion des *Kurzzeit-hibernating* Myokards blieben die kontraktile Funktion und der Sauerstoffverbrauch reduziert, obwohl der transmurale und subendokardiale Blutfluss bereits normalisiert waren. Das Myokard befand sich im *Stunning*-Zustand.

### **3.2. Charakterisierung der *Sus scrofa* cDNA-Sequenzen von Bcl-x<sub>L</sub> und Bak**

Die mRNA-Expressionsanalysen Bcl-2-homologer Proteine im *hibernating* und *stunned* Myokard des Schweins machten die Klonierung der *Sus scrofa* cDNAs für Bcl-x<sub>L</sub> und Bak erforderlich (vgl. 7.2.). Die Sequenzierung der *bcl-x<sub>L</sub>* cDNA vom Schwein ergab dabei eine sehr hohe Sequenzhomologie (>90 %) im gesamten kodierenden Bereich sowohl zur humanen (Boise *et al.*, 1993) als auch zur cDNA-Sequenz von Maus (Gonzalez-Garcia *et al.*, 1994) und Ratte (Shiraiwa *et al.*, 1996). Nach Ableitung der Aminosäuresequenz konnte besonders innerhalb der Bcl-2-Homologiedomänen (BH) und im C-terminalen Transmembranbereich eine starke Konservierung der Aminosäuresequenzen mit vollständiger Übereinstimmung zwischen den Spezies festgestellt werden. Anhand der cDNA-Sequenzen beider *bcl-x*-Isoformen *bcl-x<sub>S</sub>* und *bcl-x<sub>β</sub>* von Mensch, Maus oder Ratte konnten die Speißstellen innerhalb der *Sus scrofa bcl-x<sub>L</sub>* cDNA zugeordnet werden, um die mRNA-Expressionsanalyse von Bcl-x<sub>L</sub> im Schwein zu ermöglichen. Darüber hinaus zeigte auch die Sequenzierung der *Sus scrofa* cDNA von Bak im kodierenden Bereich eine sehr hohe

Homologie (>90 %) zur humanen cDNA-Sequenz (Farrow *et al.*, 1995), deren Aminosäureableitung wiederum eine vollständige Konservierung in den BH-Domänen ergab.

Die ausgesprochen hohe Konservierung innerhalb der funktionellen Domänen der Bcl-2-homologen Proteine bestätigt dabei die Bedeutung der BH-Regionen für die Funktionen von Bcl-x<sub>L</sub> und Bak an der mitochondrialen Membran und ihr Dimerisierungsverhalten untereinander (Sattler *et al.*, 1997) und mit anderen Proteinen der Bcl-2-Familie (Reed, 1996). Um zu verdeutlichen, wie stark die Homologiedomänen innerhalb der Bcl-2-Proteinfamilie konserviert sind, wurden die BH-Regionen von Bcl-x<sub>L</sub> und Bak vom Schwein miteinander verglichen und ergaben besonders in BH1 mit 80 % für identische und konservierte Aminosäuren eine sehr hohe Aminosäureübereinstimmung.

### **3.3. mRNA-Expression von Proteinen der Bcl-2-Familie im Kurzzeit-*hibernating* und *stunned* Myokard**

Am tierexperimentellen Modell zur myokardialen Hypoperfusion und Reperfusion konnte weder für das antiapoptotische Bcl-2-Homolog Bcl-x<sub>L</sub> noch für das induzierbare Hitzeschockprotein Hsp70 eine erhöhte mRNA-Expression im Kurzzeit-*hibernating* und *stunned* Myokard des Schweins festgestellt werden (vgl. 7.2.). Darüber hinaus war auch die mRNA-Expression des proapoptotischen Bcl-x<sub>L</sub>-Antagonisten Bak unverändert. Obwohl aufgrund der begrenzt entnehmbaren Gewebemengen keine Untersuchungen zur apoptotischen DNA-Fragmentierung möglich waren, deuten die Analysen zur mRNA-Expression darauf hin, dass im *hibernating* Myokard der Apoptosemechanismus trotz der anhaltenden Mangeldurchblutung nicht induziert wird. Im Gegensatz dazu wird unter akuter kardialer Ischämie in den Kardiomyozyten die Expression von Hsp70 (Knowlton *et al.*, 1991) aber auch vom antiapoptotischen Bcl-2 (Kajstura *et al.*, 1996) unmittelbar ausgelöst. Demzufolge ist insbesondere die unveränderte mRNA-Expression des induzierbaren Hsp70 konträr zur unter starker Mangeldurchblutung und nach Reperfusion (Plumier *et al.*, 1996) beobachteten schnellen Hsp70-Induktion. Die Ergebnisse am moderat hypoperfundierten Herzen weisen daher darauf hin, dass im Myokard mit einer 50%igen Restdurchblutung die funktionelle und metabolische Anpassung des Gewebes durch *Hibernation* ausreichend ist, um sowohl während der Hypoperfusion als auch nach Reperfusion im *stunned* Myokard den apoptotischen Zelluntergang zu verhindern. Obgleich die experimentelle Überexpression der Hitzeschock- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteine zur Verminderung der Ischämie-induzierten Zellschädigung beiträgt (Mestril *et al.*, 1994; Shimizu *et al.*, 1995), ist bisher unklar, ob ihre pathophysiologische

Induktion den Verlust von Kardiomyozyten durch Ischämie und Reperfusion verhindern kann. Dennoch deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass im hypoperfundierten Myokard, das sich funktionell und metabolisch durch *Hibernation* noch an die Mangel durchblutung anpasst, die zelluläre Adaptation an die verminderte Perfusion nicht durch eine gleichzeitige Induktion der untersuchten Zellschutzproteine vermittelt wird. Die unveränderte Expression kardioprotektiver Faktoren, wie Hsp70 und Bcl-x<sub>L</sub>, konnte darüber hinaus nicht nur im Zustand des Kurzzeit-*Hibernation* sondern auch unter Langzeitbedingungen (24 h) am gleichen Tiermodell bestätigt werden.

Das tierexperimentelle Modell zur Analyse von *Hibernation* und *Stunning* am Schweinemyokard schließt ungeachtet dessen nicht aus, dass unter physiologischen Umständen im hypoperfundierten Myokard des Patienten mit einer eingeschränkten Koronarreserve zwar verschiedene kardioprotektive Faktoren, aber auch der apoptotische Zelluntergang induziert werden. In Abhängigkeit von der Belastung des Herzens (Herzfrequenz-, Blutdruckveränderungen) wechseln sich im Myokard des Patienten Phasen der Hypoperfusion (Kurzzeit-*Hibernation*) mit Phasen der Reperfusion (*Stunning*) ab. Kommt es zum repetitiven *Stunning*, bei dem die Funktionsgenesung zwischen den Phasen der Mangel durchblutung nicht mehr ausreichend ist, kann das Myokard auch in den chronischen Zustand des *Hibernation* mit dem Verlust kontraktile Elemente übergehen (Heyndrickx, 1995). So konnten besonders bei Patienten mit einem hohem Schweregrad des myokardialen *Hibernation* (Elsässer *et al.*, 1997), aber auch unter ähnlichen Bedingungen im Schweinmodell mit einer 50%igen Langzeithypoperfusion (Chen *et al.*, 1997), apoptotisch sterbende Kardiomyozyten nach 24 h nachgewiesen werden. Ob der apoptotische Zelluntergang unter diesen Bedingungen auch mit der Induktion kardioprotektiver Gene einher geht, ist jedoch ungewiss.

#### **4. Einfluss der laminaren Schubspannung auf die Apoptoseinduktion in humanen Endothelzellen**

##### **4.1. Bedeutung des Gefäßendothels bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen**

Die Endothelzellen der Gefäßwand spielen in der Vasomotorik der Gefäße und somit in der Blutdruckregulation und Organdurchblutung eine entscheidende Rolle. In gesunden Blutgefäßen findet dabei ein geringer *turnover* an endothelialen Zellen statt. Die

Beschädigung des Endothels hingegen trägt zur Pathogenese der Atherosklerose aber auch zum Fortschreiten entzündlicher Prozesse oder zur Entstehung von Koronarspasmen bei (Ross, 1993, 1999). Dabei zeichnen sich vor allem die Prädilektionsstellen, an denen sich atherosklerotische Plaques bevorzugt entwickeln, durch einen erhöhten *turnover* der Endothelzellen aus (Caplan & Schwartz, 1973). Dieser erhöhte *turnover* endothelialer Zellen scheint dabei auf eine gesteigerte Apoptoserate der Endothelzellen mit verstärkter Sensitivität der Gefäßregion gegenüber der Entwicklung atherosklerotischer Plaques zu basieren (Dimmeler *et al.*, 1998), da atherogene Risikofaktoren, wie oxidativ modifiziertes *low density*-Lipoprotein (oxLDL) (Li *et al.*, 1998a), ein erhöhter Zuckerspiegel (Du *et al.*, 1998), oxidativer Stress (Hermann *et al.*, 1997) oder Angiotensin II (Dimmeler *et al.*, 1997c), den apoptotischen Zelluntergang in Endothelzellen auslösen können.

Unter nichtpathologischen Umständen schützen sich die Endothelzellen der Gefäßwand dabei selbst vor Apoptose. Hierbei spielt die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) durch die Endothelzellen eine wichtige Rolle (Furchgott *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987). Bei einem niedrigen NO-Spiegel, der durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) aufrechterhalten wird, schützen sich die Endothelzellen über einen cGMP-abhängigen Mechanismus unter Aktivierung cGMP-abhängiger Proteinkinasen gegenüber dem apoptotischen Zelluntergang (Polte *et al.*, 1997). Darüber hinaus führt die NO-Bildung zur S-Nitrosylierung eines essentiellen Cysteinrestes im aktiven Zentrum der Apoptose-induzierenden Caspasen (Melino *et al.*, 1997). Die endotheliale NO-Freisetzung und nachfolgende S-Nitrosylierung der Caspasen resultiert in ihrer Inaktivierung und dem NO-abhängigen Schutz der Endothelzellen gegenüber verschiedenen apoptotischen Stimuli. In den Gefäßen findet dabei eine kontinuierliche NO-Freisetzung durch die in Richtung des strömenden Blutes wirkende biomechanische Kraft (Schubspannung, *shear stress*) auf die endothelialen Zellen statt (Busse & Fleming, 1998). So konnte durch den Einfluss einer gleichmäßigen, laminaren Schubspannung die potentielle antiapoptotische und anti-atherosklerotische Wirkung auf Endothelzellen nachgewiesen werden (Dimmeler *et al.*, 1996; Traub & Berk, 1998). Darüber hinaus verhindert die Stimulation der Endothelzellen durch laminare Schubspannung nicht nur die endotheliale Apoptose im Vergleich zu stationären Zellen ohne Strömungseinfluss sondern auch den apoptotischen Zelluntergang durch proatherosklerotische und proapoptotische Faktoren (oxLDL, Sauerstoffradikale, Angiotensin II) (Dimmeler *et al.*, 1997c; Hermann *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998a).

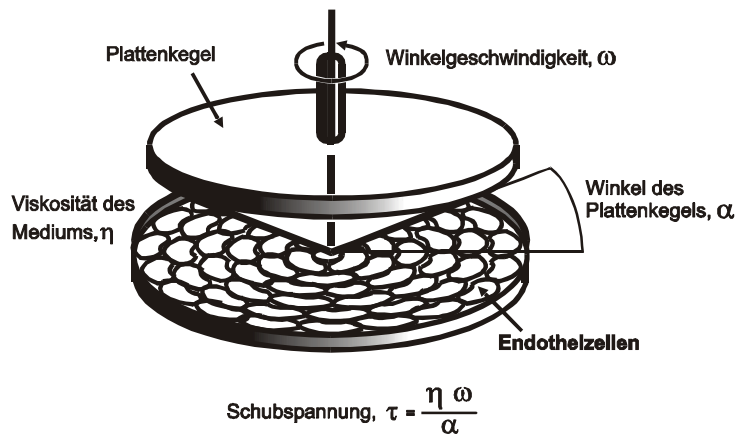
Da sich atherosklerotischen Plaques bevorzugt in Gefäßbereichen mit einer lokal reduzierten oder turbulenten Blutströmungen entwickeln (Virchow, 1860), vermittelt

besonders die laminare Strömung des Blutes die antiapoptotische Wirkung auf Endothelzellen und beeinflusst die Atherogenese (Glagov *et al.*, 1988). Die molekularen Mechanismen der antiapoptotischen und antiatherosklerotischen Wirkung von laminarer Schubspannung sind bisher nur unvollständig verstanden. Darüber hinaus ist unklar, ob an der Vermittlung dieses protektiven Effektes die Proteine der Bcl-2-Familie beteiligt sind und ob ihre Bildung von der endothelialen NO-Freisetzung abhängt.

#### **4.2. Verminderte Apoptoseinduktion und veränderte Expression Bcl-2-ähnlicher Proteine durch laminare Schubspannung in humanen Endothelzellen**

Um den Einfluss des Blutstroms auf die endotheliale Expression von Proteinen der Bcl-2-Familie zu untersuchen, wurden kultivierte, konfluente Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC) in einem *in vitro*-Modell einer laminaren Schubspannung verschiedener physiologischer Werte ausgesetzt. Wie in Abb. 9 schematisch dargestellt, kam als experimentelles Modell zur Expressionsanalyse Bcl-2-homologer Proteine nach Applikation chronischer arterieller und venöser laminarer Schubspannung auf humane Endothelzellen ein nach Sdougos *et al.* (1984) modifiziertes Plattenkegelviskosimeter zum Einsatz. Diese Plattenkegelapparatur wurde in Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) und dem Institut für Biophysik der Universität Halle etabliert. Da das Ausmaß der Schubspannung nicht nur von der Geschwindigkeit des Blutstroms sondern auch vom Durchmesser des Blutgefäßes abhängt, wurde mit  $1 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$  eine Schubspannung des mittleren venösen Blutstroms und mit 15 bzw. 30  $\text{dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$  eine Schubspannung von zwei arteriellen Blutströmungen in den mittleren Arterien bzw. in der Aorta und den Arteriolen appliziert. Eine chronische Applikation hoher laminarer Schubspannung verursacht dabei eine Differenzierung und Ausrichtung der Endothelzellen in Richtung der Strömung (Dewey *et al.*, 1981). Anhand der apoptotischen Freisetzung von Histon-assoziierten DNA-Fragmenten aus dem Zellkern (Cohen, 1993) konnte im Vergleich zu stationären, humanen Endothelzellen ohne Einwirkung von laminarer Schubspannung gezeigt werden, dass durch eine anhaltende hohe Schubspannung arterieller Werte (15, 30  $\text{dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) die endotheliale Apoptose reduziert wird (vgl. 7.3.). Dieser verminderte Untergang der Endothelzellen durch Apoptose geht dabei mit einer erhöhten Expression des antiapoptotischen Bcl-2-Homologen Bcl-x<sub>L</sub> einher, das bei der Aufrechterhaltung der basalen Endothelzellstabilität und -Lebensdauer eine wichtige Rolle in den Endothelzellen zu spielen scheint (Ackermann *et al.*, 1999). Die gleichzeitige Inhibierung der endothelialen NO-Synthase hingegen verringert die basale und Schub-

spannungs-induzierte Expression der Bcl-x<sub>L</sub>-mRNA deutlich und deutet damit auf die Abhängigkeit des antiapoptotischen Effektes von der endothelialen NO-Bildung hin (Dimmeler *et al.*, 1997b).



**Abb. 9. Plattenkegellappatur zur Applikation von laminarer Schubspannung auf Endothelzellen.** Kultivierte humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) wurden einer laminaren Strömung verschiedener physiologischer Level unterworfen: 1 dyn·cm<sup>-2</sup> (mittlere Schubspannung in venösen Blutgefäßen), 15 und 30 dyn·cm<sup>-2</sup> (zwei arterielle Schubspannungswerte). Der Winkel  $\alpha$  des Plattenkegels betrug 0,5°, um in allen Fällen mit  $R(r^2\omega\alpha^2 \cdot 2\eta^{-1}) \ll 4$  (Sdougos *et al.*, 1984) eine laminare Strömung über den Endothelzellen sicherzustellen.

Im Gegensatz zu Bcl-x<sub>L</sub> unterliegt die Expression des antiapoptotischen Bcl-2 nicht der biomechanischen Kraft der arteriellen Schubspannung, und die Mcl-1-mRNA-Expression wird erst bei 30 dyn·cm<sup>-2</sup> geringfügig induziert. Es konnte aber auch eine erhöhte Expression des proapoptotischen Bcl-2-Homologen Bak beobachtet werden. Daher könnte es sich beim Anstieg der Bak-Expression um einen kompetitiven Effekt der ebenso erhöhten Bcl-x<sub>L</sub>-Expression in Endothelzellen unter arteriellen Schubspannungswerten handeln. Jedoch ist die funktionelle Rolle von Bak unter verschiedenen physiologischen Bedingungen noch ungeklärt, da Überexpressionsversuche auch zur Verminderung des apoptotischen Zelluntergangs geführt haben (Kiefer *et al.*, 1995). Darüber hinaus konnte im Vergleich zum insuffizienten am nichtinsuffizienten, humanen Myokard eine erhöhte linksventrikuläre Expression von Bak gezeigt werden, obwohl die apoptotische DNA-Fragmentierung im linken Ventrikel vermindert war (vgl. 7.1.).

Im Gegensatz zur arteriellen Schubspannung bei 15 und 30 dyn·cm<sup>-2</sup> führt der chronische Einfluss einer niedrigen laminaren Schubspannung des mittleren venösen Wertes (1 dyn·cm<sup>-2</sup>) in HUVEC nicht zur Abnahme der endothelialen Apoptose im Vergleich zu stationären Zellen (vgl. 7.3.). Da sich atherosklerotische Plaques bevorzugt in Gefäß-

regionen mit einer geringen Blutströmung oder Strömungsturbulenzen entwickeln (Glagov *et al.*, 1988; Traub & Berk, 1998), bestätigen diese Daten die Annahme, dass der an diesen Prädilektionsstellen beobachtete Anstieg des Endothelzell-*turnover* (Caplan & Schwartz, 1973) auf einer Zunahme der endothelialen Apoptose basiert (Dimmeler *et al.*, 1998). Diese erhöhte Empfindlichkeit der Endothelzellen gegenüber Apoptose geht mit einer Reduktion der Bcl-2-mRNA-Expression unter venöser Schubspannung einher. Darüber hinaus bleibt die Expression der Bcl-x<sub>L</sub>-mRNA bei geringer Schubspannung im Gegensatz zum Anstieg unter hohen Strömungswerten konstant. Diese Ergebnisse unterstreichen ferner, dass die Applikation einer niedrigen laminaren Schubspannung keinen antiapoptotischen Effekt auf die experimentell induzierte Apoptose im Vergleich zu hohen arteriellen Schubspannungswerten in Endothelzellen hat (Dimmeler *et al.*, 1996).

Die Abnahme der Apoptosesensitivität humaner Endothelzellen unter Einfluss der arteriellen Schubspannung bestätigt dabei, dass der antiapoptotische Effekt einer chronischen laminaren Schubspannung von der endothelialen NO-Bildung abhängt (Dimmeler *et al.*, 1997b). So führt die Inhibierung der endothelialen NO-Synthase durch L-NNA nicht nur zur Reduktion der basalen und Schubspannungs-induzierten mRNA-Expression des antiapoptotischen Bcl-x<sub>L</sub> sondern auch des antiapoptotischen Bcl-2, während die mRNA-Expression des proapoptotischen Bax induziert wird (vgl. 7.3.). Parallel wird auch die Schubspannungs-induzierte endotheliale Bak-mRNA-Expression durch die Inhibierung der NO-Synthase reduziert. Anhand der Inhibitorstudien konnte der Einfluss der endothelialen Stickstoffmonoxidbildung bei der Vermittlung des antiapoptotischen Effektes bestätigt werden. So geht der NO-abhängige Effekt nicht nur mit einer Caspaseinaktivierung durch S-Nitrosylierung in humanen Endothelzellen (Dimmeler *et al.*, 1997b) sondern auch mit einer erhöhten Expression des antiapoptotischen Bcl-x<sub>L</sub> durch den chronischen Einfluss einer laminaren Schubspannung arterieller Strömungswerte einher.

Diese Ergebnisse unterstützen die Ansicht, dass in gesunden Blutgefäßen die NO-Bildung einen protektiven Effekt auf die Zellen der Gefäßwand und somit die Endothelzellen ausübt. In atherosklerotischen Plaques ist die Situation jedoch grundlegend anders, da die induzierbare NO-Synthase (iNOS) durch die Makrophagen in der Umgebung der Plaques mit einem erhöhten oxidativen Stress verstärkt exprimiert wird (Buttery *et al.*, 1996). Dieser pathologisch erhöhte Stickstoffmonoxidlevel und die nachfolgende Bildung von Peroxynitriten können die Endothelzellapoptose und in den atherosklerotischen Läsionen den apoptotischen Zelltod von Makrophagen und glatten Muskelzellen auslösen (Wang *et*



*al.*, 1999). Damit trägt die Apoptose zur Destabilisierung der atherosklerotischen Plaques (Bjorkerud & Bjorkerud, 1996; Kockx *et al.*, 1998) und im Fall der Ruptur zu lebensbedrohlichen Komplikationen, wie dem Herzinfarkt, bei.

## **5. Zusammenfassung**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Beteiligung von Proteinen der Bcl-2-Familie an Apoptosevorgängen im kardiovaskulären System anhand von Expressionsanalysen zu untersuchen. Dazu wurden Apoptose und Genexpression im hämodynamisch überlasteten Myokard von Patienten mit terminaler Herzerkrankung, im regional mangel durchbluteten Herzmuskel am experimentellen Modell des Schweins sowie in humanen Endothelzellen unter Einwirkung der durch den Blutstrom initiierten Schubspannung in einem Zellkulturmodell analysiert. Darüber hinaus wurde in retrospektiven Studien der Einfluss einer Entlastungstherapie mit Inhibitoren des Angiotensin-Konversionsenzym (ACE-Hemmer) sowie einer mechanischen Entlastung des terminal erkrankten Herzens durch chirurgische Implantation von Ventrikulären Unterstützungssystemen (VAD) auf die Expression von Bcl-2 und seiner homologen Proteine untersucht.

### **5.1. Klinische Studien**

Zunächst wurde in einer klinischen Studie analysiert, ob im Endstadium der Herzinsuffizienz eine veränderte Expression von pro- im Vergleich zu antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie zur erhöhten Sensitivität von Kardiomyozyten gegenüber dem apoptotischen Zelluntergang beiträgt.

Das terminal erkrankte Myokard ist durch eine erhöhte Apoptosehäufigkeit im Vergleich zum nichttransplantierten Spendermyokard gekennzeichnet (vermehrte apoptotische DNA-Fragmentierung und *in situ* TUNEL-Färbung), die mit einer verminderten Expression des antiapoptotischen Bcl-x<sub>L</sub> einhergeht. Während andere Proteine der Bcl-2-Familie (Bcl-2, Mcl-1, Bax) in ihrer Expression unbeeinflusst bleiben, ist auch die Expression des proapoptotischen Bak bei Herzinsuffizienz reduziert. Die mRNAs von Bcl-x<sub>L</sub> und Bak wurden anhand der *in situ* RT-PCR in den Kardiomyozyten nachgewiesen.

Eine medikamentöse Behandlung mit ACE-Hemmern führt dabei zu einer teilweisen Normalisierung der Bcl-x<sub>L</sub>- und vollständigen Angleichung der Bcl-2-Expression im

Vergleich zum Spendermyokard. Sowohl für Bcl-x<sub>L</sub> als auch für Bcl-2 konnte eine positive Korrelation zwischen der mRNA- und der Proteinexpression nachgewiesen werden. Zwischen Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie oder ischämisch bedingten Herzerkrankung liegen im Endstadium der Herzinsuffizienz keine Expressionsunterschiede vor.

Darüber hinaus konnte durch die mechanische Entlastung mit einem ventrikulären Unterstützungssystem (VAD) eine partielle Normalisierung der bei Herzinsuffizienz verminderten linksventrikulären Bcl-x<sub>L</sub>- sowie ein Anstieg der Mcl-1-mRNA gezeigt werden. Die Reinduktion der Bcl-x<sub>L</sub>-Expression ist zudem abhängig von der Unterstützungszeit durch das VAD. Die hämodynamische Entlastung des terminal insuffizienten, überdehnten Herzens mit maximaler neuroendokriner Aktivierung konnte durch einen deutlichen Rückgang der Pro-ANF-mRNA unter VAD nachgewiesen werden.

Obwohl auch die myokardiale Apoptose durch VAD-Entlastung reduziert ist, konnte für die funktionellen Determinanten der myozytären Kalziumhomöostase (Na<sup>+</sup>Ca<sup>2+</sup>-Ionenaustauscher, SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase) im gesamten Patientenkollektiv keine signifikante Normalisierung des mRNA-Expressionsverhältnisses von SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase zu Na<sup>+</sup>Ca<sup>2+</sup>-Ionenaustauscher beobachtet werden, wohl aber in der Subgruppe von Patienten, die durch eine verbesserte Expression von Bcl-x<sub>L</sub>/Bak und Mcl-1 unter VAD und durch eine klinisch weniger schlechte Ventrikelfunktion vor der VAD-Implantation gekennzeichnet waren.

## 5.2. Experimentelle Studien

Die eingeschränkte Durchblutung des Myokards (Hypoperfusion) bis hin zur vollständigen Ischämie ist die häufigste Ursache für die Entstehung und Manifestation von Herzerkrankungen. Bei einer langanhaltenden aber, weniger schweren myokardialen Ischämie, bei der eine gewisse Restdurchblutung noch vorhanden ist, kann sich das Myokard durch *Hibernation* an diese Mangelversorgung anpassen.

Im Modell zur Kurzzeit-*Hibernation* am Myokard des Schweins konnte durch eine regionale Hypoperfusion und nachfolgende Reperfusion weder für das antiapoptotische Bcl-x<sub>L</sub> noch für die induzierbare Hsp70-Form eine veränderte mRNA-Expression beider kardioprotektiver Faktoren beobachtet werden. Da auch das proapoptotische Bak unter diesen Bedingungen nicht induziert wird, deuten die Ergebnisse auf eine ausreichende funktionelle und metabolische Anpassung des Myokards durch *Hibernation* hin, um den Ischämie-bedingten Zelluntergang von Kardiomyozyten zu verhindern.

Die für die tierexperimentellen Studien erforderliche Klonierung der Bcl-x<sub>L</sub> und Bak cDNAs vom Schwein ergab nach Sequenzanalysen im Vergleich mit anderen Spezies eine sehr hohe Konservierung.

Die ausreichende Durchblutung des Myokards ist unmittelbar mit der Funktion eines intakten Gefäßendothels und der durch den Blutstrom Schubspannungs-induzierten Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) durch die endotheliale NO-Synthase verbunden.

Die Regulation der endothelialen Expression von Proteinen der Bcl-2-Familie durch Applikation von chronischer Schubspannung wurde an humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) am Modell des Plattenkegelviskometers analysiert. Arterielle laminare Schubspannung verringert dabei im Vergleich zu stationären Endothelzellen die Apoptoserate unter gleichzeitiger Induktion der Expression antiapoptotischer Bcl-2-homologer Gene, wie Bcl-x<sub>L</sub> und Mcl-1. Daneben wird auch das potenziell proapoptotische Bak durch arterielle Schubspannung induziert.

Die basale und Schubspannungs-abhängige Expression von Proteinen der Bcl-2-Familie ist in humanen Endothelzellen teilweise von der NO-Bildung abhängig. Die Applikation von venöser laminarer Schubspannung hat keinen Effekt auf die Verminderung der Apoptoseanfälligkeit humaner Endothelzellen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Ackermann, E.J., Taylor, J.K., Narayana, R., Bennett, C.F. The role of antiapoptotic Bcl-2 family members in endothelial apoptosis elucidated with antisense oligonucleotides. *J. Biol. Chem.* 274, 11245-11252, 1999
- Andersson, B., Waagstein, F. Spectrum and outcome of congestive heart failure in a hospitalized population. *Am. Heart J.* 126, 632-640, 1993
- Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermod, J.J., Mazzei, G., Maundrell, K., Gambale, F., Sadoul, R., Martinou, J.C. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 277, 370-372, 1997
- Antonsson, B., Martinou, J.C. The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.* 256, 50-57, 2000
- Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R., Martinou, J. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem. J.* 345, 271-278, 2000
- Anversa, P., Kajstura, J. Myocyte cell death in the diseased heart. *Circ. Res.* 82, 1231-1233, 1998
- Arai, M., Alpert, N., MacLennan, D., Barton, P., Periasamy, M. Alterations in sarcoplasmic reticulum gene expression in human heart failure. *Circ. Res.* 72, 463-469, 1993
- Barkett, M., Gilmore, T. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factor. *Oncogene* 18, 6910-6924, 1999
- Barr, P.J., Tomei, L.D. Apoptosis and its role in human disease. *Biotechnology (N.Y.)* 12, 487-493, 1994
- Bauer, J., Reams, G. The angiotensin-II type 1 receptor antagonists - A new class of anti-hypertensive drugs. *Arch. Intern. Med.* 155, 1361-1368, 1995
- Beham, A., Marin, M.C., Fernandez, A., Herrmann, J., Brisbay, S., Tari, A.M., Lopez-Berestein, G., Lozano, G., Sarkiss, M., McDonnell, T.J. Bcl-2 inhibits p53 nuclear import following DNA damage. *Oncogene* 15, 2767-2772, 1997
- Bernardi, P. The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. *Biochim. Biophys. Acta* 1275, 5-9, 1996
- Bing, O.H. Hypothesis: apoptosis may be a mechanism for the transition to heart failure with chronic pressure overload. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 26, 943-948, 1994
- Bjorkerud, S., Bjorkerud, B. Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells) and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am. J. Pathol.* 147, 267-277, 1996
- Blagosklonny, M.V., Schulte, T., Nguyen, P., Trepel, J., Neckers, L.M. Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway. *Cancer Res.* 56, 1851-1854, 1996
- Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G., Thompson, C.B. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597-608, 1993
- Boise, L.H., Thompson, C.B. Bcl-x(L) can inhibit apoptosis in cells that have undergone Fas-induced protease activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 3759-3764, 1997
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., Wallach, D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815, 1996
- Booz, G.W., Baker, K.M. The role of the renin-angiotensin system in the pathophysiology of cardiac remodeling. *Blood Press. Suppl.* 2, 10-18, 1996
- Borgers, M., Ausma, J. Structural aspects of the chronic hibernating myocardium in man. *Basic Res. Cardiol.* 90, 44-46, 1995
- Brenner, C., Cadiou, H., Vieira, H., Zamzami, N., Marzo, I., Xie, Z., Leber, B., Andrews, D., Duclohier, H., Reed, J., Kroemer, G. Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 19, 329-336, 2000
- Bristow, M. The adrenergic nervous system in heart failure. *N. Engl. J. Med.* 311, 850-851, 1984
- Brodde, O., Michel, M., Zerkowski, H.-R. Signal transduction mechanisms controlling cardiac contractility and their alterations in chronic heart failure. *Cardiovasc. Res.* 30, 570-584, 1995
- Brown, S.B., Bailey, K., Savill, J. Actin is cleaved during constitutive apoptosis. *Biochem. J.* 323, 233-237, 1997

- Busse, R., Fleming, I. Pulsatile stretch and shear stress: physical stimuli determining the production of endothelium-derived relaxing factors. *J. Vasc. Res.* 35, 73-84, 1998
- Buttery, L., Springall, D., Chester, A. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab. Invest.* 75, 77-85, 1996
- Caplan, B.A., Schwartz, C.J. Increased endothelial cell turnover in areas of in vivo Evans Blue uptake in the pig aorta. *Atherosclerosis* 17, 401-417, 1973
- Chauhan, D., Pandey, P., Ogata, A., Teoh, G., Krett, N., Halgren, R., Rosen, S., Kufe, D., Kharbanda, S., Anderson, K. Cytochrome c-dependent and -independent induction of apoptosis in multiple myeloma cells. *J. Biol. Chem.* 272, 29995-29997, 1997
- Chen, C., Edelstein, L.C., Gelinas, C. The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol. Cell. Biol.* 20, 2687-2695, 2000
- Chen, C., Ma, L., Linfert, D., Lai, T., Fallon, J., Gillmann, L., Waters, D., Tsongalis, G. Myocardial cell death and apoptosis in hibernating myocardium. *J. Am. Coll. Cardiol.* 30, 1407-1412, 1997
- Chen, C.Y., Faller, D.V. Phosphorylation of Bcl-2 protein and association with p21Ras in Ras-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271, 2376-2379, 1996
- Cheng, E.H., Levine, B., Boise, L.H., Thompson, C.B., Hardwick, J.M. Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature* 379, 554-556, 1996
- Cheng, W., Li, B., Kajstura, J., Li, P., Wolin, M.S., Sonnenblick, E.H., Hintze, T.H., Olivetti, G., Anversa, P. Stretch-induced programmed myocyte cell death. *J. Clin. Invest.* 96, 2247-2259, 1995
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., Dixit, V.M. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505-512, 1995
- Chittenden, T., Flemington, C., Houghton, A.B., Ebb, R.G., Gallo, G.J., Elangovan, B., Chinnadurai, G., Lutz, R.J. A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J.* 14, 5589-5596, 1995
- Choi, S.S., Park, I.C., Yun, J.W., Sung, Y.C., Hong, S.I., Shin, H.S. A novel Bcl-2 related gene Bfl-1 is over-expressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow. *Oncogene* 11, 1693-1698, 1995
- Chou, J., Honglin, L., Salvesen, G., Yuan, J., Wagner, G. Solution structure of Bid, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell* 96, 615-624, 1999
- Clem, R.J., Cheng, E.H., Karp, C.L., Kirsch, D.G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M.B., Griffin, D.E., Earnshaw, W.C., Veluona, M.A., Hardwick, J.M. Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 554-559, 1998
- Cohen, J.J. Apoptosis. *Immunol. Today* 44, 126-129, 1993
- Counis, M.F., Torriglia, A. DNases and apoptosis. *Biochem. Cell Biol.* 78, 405-414, 2000
- Cowie, M., Mosterd, A., Wood, D., Deckers, J., Poole-Wilson, P., Shotton, G., Grobbee, D. The epidemiology of heart failure. *Eur. Heart J.* 18, 208-225, 1997
- Crompton, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* 341, 233-249, 1999
- Currie, R., Karmazyn, M., Kloc, M., Mailer, K. Heat shock response is associated with enhanced post-ischemic ventricular recovery. *Circ. Res.* 63, 543-549, 1988
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., Greenberg, M.E. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241, 1997
- Daugas, E., Nochy, D., Ravagnan, L., Loeffler, M., Susin, S.A., Zamzami, N., Kroemer, G. Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett.* 476, 118-123, 2000
- de Boer, R.A., van Veldhuisen, D.J., van der Wijk, J., Brouwer, R.M., de Jonge, N., Cole, G.M., Suurmeijer, A.J. Additional use of immunostaining for active caspase 3 and cleaved actin and PARP fragments to detect apoptosis in patients with chronic heart failure. *J. Card. Fail.* 6, 330-337, 2000
- de Moissac, D., Zheng, H., Kirshenbaum, L.A. Linkage of the BH4 domain of Bcl-2 and the nuclear factor kappaB signaling pathway for suppression of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274, 29505-29509, 1999
- Decaudin, D., Geley, S., Hirsch, T., Castedo, M., Marchetti, P., Macho, A., Kofler, R., Kroemer, G. Bcl-2 and Bcl-XL antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Res.* 57, 62-67, 1997
- Demaison, L., Moreau, D., Martine, L., Chaudron, I., Grynberg, A. Myocardial ischemia and in vitro mitochondrial metabolic efficiency. *Mol. Cell. Biochem.* 158, 161-169, 1996

- Denolin, H., Kuhn, H., Krayenbuehl, H., Loogen, F., Reale, A. The definition of heart failure. *Eur. Heart J.* 4, 445, 1983
- Deveraux, Q.L., Reed, J.C. IAP family proteins - suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13, 239-252, 1999
- Dewey, C.J., Bussolari, S., Gimbrone, M.J., Davies, P. The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J. Biomech. Eng.* 103, 177-185, 1981
- Dillmann, W., Mehta, H., Barrieux, A., Guth, B. Ischemia of the dog heart induces the appearance of a cardiac mRNA coding for a protein with migration characteristics similar to heat shock/stress protein. *Circ. Res.* 59, 110-114, 1986
- Dimmeler, S., Haendeler, J., Galle, J., Zeiher, A.M. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A mechanistic clue to the 'response to injury' hypothesis. *Circulation* 95, 1760-1763, 1997a
- Dimmeler, S., Haendeler, J., Nehls, M., Zeiher, A.M. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J. Exp. Med.* 185, 601-607, 1997b
- Dimmeler, S., Haendeler, J., Rippmann, V., Nehls, M., Zeiher, A.M. Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *FEBS Lett.* 399, 71-74, 1996
- Dimmeler, S., Hermann, C., Zeiher, A. Apoptosis of endothelial cells. Contribution to the pathophysiology of atherosclerosis? *Eur. Cytokine Netw.* 9, 697-698, 1998
- Dimmeler, S., Rippmann, V., Weiland, U., Haendeler, J., Zeiher, A.M. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ. Res.* 81, 970-976, 1997c
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42, 2000
- Du, X., Sui, G., Stockklauser-Farber, K. Introduction of apoptosis by high pro-insulin and glucose in cultured human umbilical vein endothelial cells is mediated by reactive oxygen species. *Diabetologia* 41, 249-256, 1998
- Dzau, V. Tissue angiotensin system in cardiovascular medicine. A paradigm shift. *Circulation* 89, 493-498, 1994
- Dzau, V., Colucci, W., Hollenberg, N., Williams, G. Relation of the renin-angiotensin-aldosterone system to clinical state in congestive heart failure. *Circulation* 63, 645-651, 1981
- Earnshaw, W., Martins, L., Kaufmann, S. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 383-424, 1999
- Eisenhofer, G., Friberg, P., Rundqvist, B., Quyyumi, A., Lambert, G., Kaye, D., Kopin, I., Goldstein, D., Esler, M. Cardiac sympathetic nerve function in congestive heart failure. *Circulation* 93, 1677-1676, 1996
- Elsässer, A., Schlepper, M., Klovekorn, W.P., Cai, W.J., Zimmermann, R., Müller, K.D., Strasser, R., Kostin, S., Gagel, C., Munkel, B., Schaper, W., Schaper, J. Hibernating myocardium: an incomplete adaptation to ischemia. *Circulation* 96, 2920-2931, 1997
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50, 1998
- Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., Martinou, J.C. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell. Biol.* 20, 929-935, 2000
- Farrow, S.N., White, J.H., Martinou, I., Raven, T., Pun, K.T., Grinham, C.J., Martinou, J.C., Brown, R. Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* 374, 731-733, 1995
- Feldmann, D., Frydman, J. Protein folding *in vivo*: the importance of molecular chaperones. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 26-33, 2000
- Feldmann, G. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and outer membrane rupture in Fas-mediated hepatic apoptosis in mice. *Hepatology* 31, 674-683, 2000
- Ferrari, R. The role of mitochondria in ischemic heart disease. *J. Cardiovasc. Pharm.* 28, S1-S19, 1996
- Ferrari, R., Agnoletti, L., Comini, L., Gaia, G., Bachetti, T., Cargnoni, A., Ceconi, C., Curello, S., Visioli, O. Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Eur. Heart J.* 19 (Suppl. B), B2-11, 1998
- Ferrari, R., Ceconi, C., Curello, S., Guarnieri, C., Caldarera, C., Albertini, A., Visioli, O. Intracellular effects of myocardial ischemia and reperfusion: role of calcium and oxygen. *Eur. Heart J.* 7, A3-A12, 1986
- Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W., Vandenabeele, P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 18, 7719-7730, 1999
- Finucane, D., Waterhouse, N., Amarante-Mendes, G., Cotter, T., Green, D. Collapse of the inner mitochondrial transmembrane potential is not required for apoptosis of HL60 cells. *Exp. Cell Res.* 251, 166-174, 1999

- Force, W.I.T. Report of the WHO/ISFC Task Force on the definition and classification of cardiomyopathy. *Circulation* 93, 841-842, 1996
- Fortuno, M.A., Ravassa, S., Etayo, J.C., Diez, J. Overexpression of Bax protein and enhanced apoptosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats: effects of AT1 blockade with losartan. *Hypertension* 32, 280-286, 1998
- Franciosa, J., Wilen, M., Ziesche, S., Cohn, J. Survival in men with severe chronic left ventricular failure due to either coronary heart disease or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.* 52, 831-836, 1983
- Frazier, O.H., Benedict, C.R., Radovancevic, B., Bick, R.J., Capek, P., Springer, W.E., Macris, M.P., Delgado, R., Buja, L.M. Improved left ventricular function after chronic left ventricular unloading. *Ann. Thorac. Surg.* 62, 675-681, 1996
- Freude, B., Masters, T.N., 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, 197-208, 2000
- Fujio, Y., Kunisada, K., Hirota, H., Yamauchi-Takahara, K., Kishimoto, T. Signals through gp130 upregulate bcl-x expression via STAT1-binding cis-element in cardiac myocytes. *J. Clin. Invest.* 99, 2898-2905, 1997
- Furchgott, R., Khan, M., Jothianandan, D. Evidence supporting the proposal that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. *Thromb. Res. Suppl.* IV, 5, 1987
- Furchgott, R., Zawadzki, J. The obligatory role of endothelial cell in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376, 1980
- Garcia, R., Bonhomme, M.C., Schiffrin, E.L. Divergent regulation of atrial natriuretic factor receptors in high-output heart failure. *Am. J. Physiol.* 263, H1790-1797, 1992
- Garlick, P., Davies, M., Hearse, D., Salter, T. Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance electroscopy. *Circ. Res.* 61, 757-760, 1987
- Geng, Y.J., Azuma, T., Tang, J.X., Hartwig, J.H., Muszynski, M., Wu, Q., Libby, P., Kwiatkowski, D.J. Caspase-3-induced gelsolin fragmentation contributes to actin cytoskeletal collapse, nucleolysis, and apoptosis of vascular smooth muscle cells exposed to proinflammatory cytokines. *Eur. J. Cell. Biol.* 77, 294-302, 1998
- Gibson, L., Holmgren, S.P., Huang, D.C., Bernard, O., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sutherland, G.R., Baker, E., Adams, J.M., Cory, S. bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene* 13, 665-675, 1996
- Gilbert, R., Jimenez, J.L., Chen, S., Tickle, I.J., Rossjohn, J., Parker, M., Andrew, P.W., Saibil, H.R. Two structural transitions in membrane pore formation by pneumolysin, the pore-forming toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Cell* 97, 647-655, 1999
- Givertz, M., Colucci, W. New targets for heart-failure therapy: endothelin, inflammatory cytokines, and oxidative stress. *Lancet* 352 (Suppl. 1), SI34-SI38, 1998
- Glagov, S., Zarinz, C., Giddens, D., Ku, D. Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 112, 1018-1031, 1988
- Gonzalez-Garcia, M., Perez-Ballesteros, R., Ding, L., Duan, L., Boise, L.H., Thompson, C.B., Nunez, G. bcl-xL is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria. *Development* 120, 3033-3042, 1994
- Gottlieb, R.A. Mitochondria: execution central. *FEBS Lett.* 482, 6-12, 2000
- Gottlieb, R.A., Burleson, K.O., Kloner, R.A., Babior, B.M., Engler, R.L. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.* 94, 1621-1628, 1994
- Goussev, A., Sharov, V.G., Shimoyama, H., Tanimura, M., Lesch, M., Goldstein, S., Sabbah, H.N. Effects of ACE inhibition on cardiomyocyte apoptosis in dogs with heart failure. *Am. J. Physiol.* 275, H626-H631, 1998
- Grad, J.M., Zeng, X.R., Boise, L.H. Regulation of Bcl-xL: a little bit of this and a little bit of STAT. *Curr. Opin. Oncol.* 12, 543-549, 2000
- Graeber, T., Peterson, J., Tsai, M., Monica, K., Fornace, J., Giaccia, A. Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Mol. Cell. Biol.* 14, 6264-6277, 1994
- Haendeler, J., Messmer, U.K., Brune, B., Neugebauer, E., Dimmeler, S. Endotoxic shock leads to apoptosis in vivo and reduces Bcl-2. *Shock* 6, 405-409, 1996
- Hall, S., Cigarroa, C., Marcoux, L., Risser, R., Grayburn, P., Eichhorn, E. Time course of improvement in left ventricular function, mass and geometry in patients with congestive heart failure treated with beta-adrenergic blockade. *J. Am. Coll. Cardiol.* 25, 1154-1161, 1995

- Hamet, P., Richard, L., Dam, T.V., Teiger, E., Orlov, S.N., Gaboury, L., Gossard, F., Tremblay, J. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension* 26, 642-648, 1995
- Han, Z., Bhalla, K., Pantazis, P., Hendrickson, E.A., Wyche, J.H. Cif (Cytochrome c efflux-inducing factor) activity is regulated by Bcl-2 and caspases and correlates with the activation of Bid. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1381-1389, 1999
- Harrison, G., Drabkin, T., Kao, F., Hartz, J., Hart, T., Chu, E., Wu, B., Morimoto, R. Chromosomal localization of human genes encoding major heat shock protein HSP70. *Som. Cell. Mol. Gen.* 13, 119-130, 1987
- Hengartner, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776, 2000
- Hermann, C., Zeiher, A.M., Dimmeler, S. Shear stress inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis of human endothelial cells by modulation of the glutathione redox cycle and nitric oxide synthase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 3588-3592, 1997
- Heyndrickx, G. Hibernating myocardium. *Basic Res. Cardiol.* 90, 35-37, 1995
- Heyndrickx, G., Baig, H., Nelkins, P., Leusen, K., Fishbein, M., Vatner, S. Depression of regional blood flow and wall thickening after brief coronary occlusions. *Am. J. Physiol.* 234, H 653-H659, 1978
- Hill, I.E., MacManus, J.P., Rasquinha, I., Tuor, U.I. DNA fragmentation indicative of apoptosis following unilateral cerebral hypoxia-ischemia in the neonatal rat. *Brain Res.* 676, 398-403, 1995
- Hiroie, M., Hirata, Y., Fujita, N., Umezawa, S., Itoh, H., Tsujino, M., Koike, A., Nogami, A., Takamoto, T., Marumo, F. Plasma endothelin-1 level in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.* 68, 1114-1115, 1991
- Ho, K., Pinsky, J., Kannel, W., Levy, D. Part II: New insights into the epidemiology and pathophysiology of heart failure. The epidemiology of heart failure: The Framingham Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 22, 5A-13A, 1993
- Hockenbery, D., Nunez, G., Millman, C., Schreiber, R.D., Korsmeyer, S.J. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348, 334-336, 1990
- Holinger, E.P., Chittenden, T., Lutz, R.J. Bak BH3 peptides antagonize Bcl-xL function and induce apoptosis through cytochrome c-independent activation of caspases. *J. Biol. Chem.* 274, 13298-13304, 1999
- Hsu, S.Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M., Hsueh, A.J. Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 12401-12406, 1997
- Hu, Y., Benedict, M.A., Ding, L., Nunez, G. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J.* 18, 3586-3595, 1999
- Hunter, J.J., Chien, K.R. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N. Engl. J. Med.* 341, 1276-1283, 1999
- Ichihara, K., Abiko, Y. Rebound recovery of myocardial creatine phosphate with reperfusion after ischemia. *Am. Heart J.* 108, 1594-1597, 1984
- Irmler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E., Tschopp, J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195, 1997
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, I., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., Nagata, S. The polypeptide encoded by the cDNA for human surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66, 233-243, 1991
- Jaattela, M., Benedict, M., Tewari, M., Shayman, J.A., Dixit, V.M. Bcl-x and Bcl-2 inhibit TNF and Fas-induced apoptosis and activation of phospholipase A2 in breast carcinoma cells. *Oncogene* 10, 2297-2305, 1995
- James, T.N. Complex causes of fatal myocardial infarction. *Circulation* 96, 1696-1700, 1997
- Janczewski, A., Sollot, S., Spurgeon, H., Lakatta, E. Mitochondrial free Ca<sup>2+</sup> in single ventricular myocytes rapidly responds to changes in cytosolic Ca<sup>2+</sup>. *Circulation* 86, 1-35, 1992
- Kagan, V.E., Fabisiak, J.P., Shvedova, A.A., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Schor, N.F., Kawai, K. Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis. *FEBS Lett.* 477, 1-7, 2000
- Kajstura, J., Cheng, W., Reiss, K., Clark, W.A., Sonnenblick, E.H., Krajewski, S., Reed, J.C., Olivetti, G., Anversa, P. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab. Invest.* 74, 86-107, 1996
- Kajstura, J., Cigola, E., Malhotra, A., Li, P., Cheng, W., Meggs, L.G., Anversa, P. Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29, 859-870, 1997



- Kane, D., Ord, T., Anton, R., Bredesen, D. Expression of Bcl-2 inhibits necrotic neuronal cell death. *J. Neurosci. Res.* 40, 269-275, 1995
- Kang, P., Izumo, S. Apoptosis and heart failure: A critical review of the literature. *Circ. Res.* 86, 1107-1113, 2000
- Kanoh, M., Takemura, G., Misao, J., Hayakawa, Y., Aoyama, T., Nishigaki, K., Noda, T., Fujiwara, T., Fukuda, K., Minatoguchi, S., Fujiwara, H. Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair. *Circulation* 99, 2757-2764, 1999
- Kapadia, S., Oral, H., Lee, J., Nakano, M., Taffet, G., Mann, D. Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium. *Circ. Res.* 81, 187-195, 1997
- Katz, A. Cardiomyopathy of overload. A major determinant of prognosis in congestive heart failure. *N. Engl. J. Med.* 322, 100-110, 1990
- Kerr, J., Wyllie, A., Currie, A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257, 1972
- Kharbanda, S., Pandey, P., Schofield, L., Israels, S., Roncinske, R., Yoshida, K., Bharti, A., Yuan, Z.M., Saxena, S., Weichselbaum, R., Nalin, C., Kufe, D. Role for Bcl-xL as an inhibitor of cytosolic cytochrome C accumulation in DNA damage-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 6939-6942, 1997
- Kiefer, M.C., Brauer, M.J., Powers, V.C., Wu, J.J., Umansky, S.R., Tomei, L.D., Barr, P.J. Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374, 736-739, 1995
- Kim, T.H., Zhao, Y., Barber, M.J., Kuharsky, D.K., Yin, X.M. Bid-induced cytochrome c release is mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and Bax. *J. Biol. Chem.* 275, 39474-39481, 2000
- Kirshenbaum, L.A. Bcl-2 intersects the NFkappaB signalling pathway and suppresses apoptosis in ventricular myocytes. *Clin. Invest. Med.* 23, 322-330, 2000
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., Newmeyer, D.D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-1136, 1997
- Knowlton, A., Brecher, P., Apstein, C. Rapid expression of heat shock proteins in the rabbit after brief cardiac ischemia. *J. Clin. Invest.* 87, 139-147, 1991
- Knowlton, K. Atrial natriuretic factor: a molecular marker for cardiac specific, embryonic, and inducible gene expression. *Heart Failure* 8, 121-128, 1992
- Kockx, M.M., De Meyer, G.R., Muhring, J., Jacob, W., Bult, H., Herman, A.G. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 97, 2307-2315., 1998
- Kodama, H., Fukuda, K., Pan, J., Makino, S., Sano, M., Takahashi, T., Hori, S., Ogawa, S. Biphasic activation of the JAK/STAT pathway by angiotensin II in rat cardiomyocytes. *Circ. Res.* 82, 244-250, 1998
- Korsmeyer, S.J. Bcl-2: a repressor of lymphocyte death. *Immunol. Today* 13, 285-288, 1992
- Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M., Fenton, W., Reed, J. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum and outer mitochondrial membran. *Cancer Res.* 53, 4701-4714, 1993
- Krams, M., Peters, J., Boeckel, F., Raether, A., Ambros, P.F., Parwaresch, R., Harms, D. *In situ* reverse transcriptase polymerase chain reaction demonstration of the EWS/FLI-1 fusion transcript in Ewing's sarcomas and primitive neuroectodermal tumors. *Virchow Arch.* 437, 234-240, 2000
- Krippner, A., Matsuno-Yagi, A., Gottlieb, R.A., Babior, B.M. Loss of function of cytochrome c in Jurkat cells undergoing fas-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271, 21629-21636, 1996
- Kroemer, G., Reed, J. Mitochondrial control of cell death. *Nature Med.* 6, 513-519, 2000
- Kudla, G., Montessuit, S., Eskes, R., Berrier, C., Martinou, J.C., Ghazi, A., Antonsson, B. The destabilization of lipid membranes induced by the C-terminal fragment of caspase 8-cleaved bid is inhibited by the N-terminal fragment. *J. Biol. Chem.* 275, 22713-22718, 2000
- Kunisada, K., Tone, E., Fujio, Y., Matsui, H., Yamauchi-Takahara, K., Kishimoto, T. Activation of gp130 transduces signals via STAT3 in cardiac myocytes. *Circulation* 83, 346-352, 1998
- Labat-Moleur, F., Guillermet, C., Lorimier, P., Robert, C., Lantuejoul, S., Brambilla, E., Negoescu, A. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement critical evaluation and improvement. *J. Histochem. Cytochem.* 46, 327-334, 1998
- Lam, M., DUBYAK, G., Chen, L., Nunez, G., Miesfeld, R.L., Distelhorst, C.W. Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca<sup>2+</sup> fluxes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 6569-6573, 1994

- Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., Earnshaw, W.C. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371, 346-347, 1994
- Leri, A., Claudio, P.P., Li, Q., Wang, X., Reiss, K., Wang, S., Malhotra, A., Kajstura, J., Anversa, P. Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell. *J. Clin. Invest.* 101, 1326-1342, 1998a
- Leri, A., Fiordaliso, F., Setoguchi, M., Limana, F., Bishopric, N.H., Kajstura, J., Webster, K., Anversa, P. Inhibition of p53 function prevents renin-angiotensin system activation and stretch-mediated myocyte apoptosis. *Am. J. Pathol.* 157, 843-857, 2000
- Leri, A., Liu, Y., Malhotra, A., Li, Q., Stiegler, P., Claudio, P.P., Giordano, A., Kajstura, J., Hintze, T.H., Anversa, P. Pacing-induced heart failure in dogs enhances the expression of p53 and p53-dependent genes in ventricular myocytes. *Circulation* 97, 194-203, 1998b
- Levin, H.R., Chen, J.M., Oz, M.C., Catanese, K.A., Krum, H., Goldsmith, R.L., Packer, M., Rose, E.A. Potential of left ventricular assist devices as outpatient therapy while awaiting transplantation. *Ann. Thorac. Surg.* 58, 1515-1520, 1994
- Levin, H.R., Oz, M.C., Chen, J.M., Packer, M., Rose, E.A., Burkhoff, D. Reversal of chronic ventricular dilation in patients with end-stage cardiomyopathy by prolonged mechanical unloading. *Circulation* 91, 2717-2720, 1995
- Li, D., Yang, B., Mehta, J.L. Ox-LDL induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells: role of PKC, PTK, bcl-2, and Fas. *Am. J. Physiol.* 275, H568-576, 1998a
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501, 1998b
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489, 1997
- Lin, E.Y., Orlofsky, A., Berger, M.S., Prystowsky, M.B. Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *J. Immunol.* 151, 1979-1988, 1993
- Liu, X., Kim, C., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157, 1996
- Loewe, S.W., Lin, A.W. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21, 485-495, 2000
- Majno, G., Joris, I. Apoptosis, oncosis and necrosis: an overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 146, 3-15, 1995
- Mann, D.L. Mechanisms and models in heart failure: A combinatorial approach. *Circulation* 100, 999-1008, 1999
- Marban, E., Koretsune, Y., Corretti, M., Chacko, V., Kusuoka, H. Calcium and its role in myocardial cell injury during ischemia and reperfusion. *Circulation* 80, IV17-IV22, 1989
- Marber, M., Walker, J., Latchman, D., Yellon, D. Myocardial protection after whole body heat stress in the rabbit is dependent on metabolic substrate and is related to the amount of the inducible 70kD heat stress protein. *J. Clin. Invest.* 93, 1087-1094, 1994
- Marchetti, P., Castedo, M., Susin, S.A., Zamzami, N., Hirsch, T., Macho, A., Haeffner, A., Hirsch, F., Geuskens, M., Kroemer, G. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J. Exp. Med.* 184, 1155-1160, 1996
- Marin, M.C., Fernandez, A., Bick, R.J., Brisbay, S., Buja, L.M., Snuggs, M., McConkey, D.J., von Eschenbach, A.C., Keating, M.J., McDonnell, T.J. Apoptosis suppression by bcl-2 is correlated with the regulation of nuclear and cytosolic Ca<sup>2+</sup>. *Oncogene* 12, 2259-2266, 1996
- Maron, B., Bonow, R., Cannon, R., Leon, M., Epstein, S. Hypertrophic cardiomyopathy: interrelations of clinical manifestation, pathophysiology, and therapy. *N. Engl. J. Med.* 316, 780-789, 844-852, 1987
- Martinou, J., Dubois-Dauphin, M., Staple, J., Rodriguez, I., Frankowski, H., Missotten, M., Albertini, P., Talabot, D., Catsicas, S., Pietra, C. Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 13, 1017-1030, 1994
- Martinou, J., Green, D. Breaking the mitochondrial barrier. *Nature Rev.* 2, 63-67, 2001
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S.A., Beutner, G., Brdiczka, D., Remy, R., Xie, Z.H., Reed, J.C., Kroemer, G. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J. Exp. Med.* 187, 1261-1271, 1998
- Mascareno, E., Dhar, M., Siddiqui, M.A. Signal transduction and activator of transcription (STAT) protein-dependent activation of angiotensinogen promoter: a cellular signal for hypertrophy in cardiac muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 5590-5594, 1998

- Matsuzaki, M., Gallagher, K., Kemper, W., White, F., Ross, J.J. Sustained regional dysfunction, produced by prolonged coronary stenosis: Gradual recovery after reperfusion. *Circulation* 68, 170-182, 1983
- McCarthy, P.M., Young, J.B., Smedira, N.G., Hobbs, R.E., Vargo, R.L., Starling, R.C. Permanent mechanical circulatory support with an implantable left ventricular assist device. *Ann. Thorac. Surg.* 63, 1458-1461, 1997
- Mehta, H., Popovich, B., Dillmann, W. Ischemia induces changes in the level of mRNAs coding for stress protein 71 and creatine kinase M. *Circ. Res.* 63, 512-517, 1988
- Melino, G., Bernassola, F., Knight, R., Corasaniti, M., Nistico, G., Finazzi-Agro, A. S-Nitrosylation regulates apoptosis. *Nature* 388, 432-433, 1997
- Mestril, R., Chi, S., Sayen, M., O'Reilly, K., Dillmann, W. Expression of inducible stress protein 70 in rat heart myogenic cells confers protection against simulated ischemia-induced injury. *J. Clin. Invest.* 93, 759-767, 1994
- Meyer, M., Schillinger, W., Pieske, B., Holubarsch, C., Heilmann, C., Posival, H., Kuwajima, G., Mikoshiba, K., Just, H., Hasenfuss, G. Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 92, 778-784, 1995
- Minn, A.J., Boise, L.H., Thompson, C.B. Bcl-x(S) antagonizes the protective effects of Bcl-x(L). *J. Biol. Chem.* 271, 6306-6312, 1996
- Minn, A.J., Velez, P., Schendel, S.L., Liang, H., Muchmore, S.W., Fesik, S.W., Fill, M., Thompson, C.B. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 385, 353-357, 1997
- Miyashita, T., Harigai, M., Hanada, M., Reed, J.C. Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res.* 54, 3131-3135, 1994a
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B., Reed, J.C. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799-1805, 1994b
- Miyashita, T., Reed, J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299, 1995
- Motoyama, S., et al. Bcl-2 is located predominantly in the inner membrane and cristae of mitochondria in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249, 628-636, 1998
- Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L., Ng, S.L., Fesik, S.W. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381, 335-341, 1996
- Müller, J., Wallukat, G., Weng, Y.G., Dandel, M., Spiegelsberger, S., Semrau, S., Brandes, K., Theodoridis, V., Loebe, M., Meyer, R., Hetzer, R. Weaning from mechanical cardiac support in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 96, 542-549, 1997
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., Dixit, V.M. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-827, 1996
- Nagata, S. Fas and Fas ligand: a death factor and its receptor. *Adv. Immunol* 57, 129-144, 1994
- Narula, J., Haider, N., Virmani, R., DiSalvo, T.G., Kolodgie, F.D., Hajjar, R.J., Schmidt, U., Semigran, M.J., Dec, G.W., Khaw, B.A. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N. Engl. J. Med.* 335, 1182-1189, 1996
- Narula, J., Pandey, P., Arbustini, E., Haider, N., Narula, N., Kolodgie, F.D., Dal Bello, B., Semigran, M.J., Bielsa-Masdeu, A., Dec, G.W., 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. U.S.A.* 96, 8144-8149, 1999
- Nayler, W., Panagiotopoulos, G., Elz, J., Daly, M. Calcium mediated damage during post ischemic reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 20, 41-45, 1988
- Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376, 37-43, 1995
- Nicholson, D.W., Thornberry, N.A. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* 22, 299-306, 1997
- Nicolli, A., Basso, E., Petronilli, V., Wenger, R.M., Bernardi, P. Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, and cyclosporin A-sensitive channel. *J. Biol. Chem.* 271, 2185-2192, 1996

- Noris, M., Morigi, M., Donadelli, R., S, A., Foppolo, M., Todeschini, M., Orisio, S., Remuzzi, G., Remuzzi, A. Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. *Circ. Res.* 76, 536-543, 1995
- Olivetti, G., Abbi, R., Quaini, F., Kajstura, J., Cheng, W., Nitahara, J.A., Quaini, E., Di Loreto, C., Beltrami, C.A., Krajewski, S., Reed, J.C., Anversa, P. Apoptosis in the failing human heart. *N. Engl. J. Med.* 336, 1131-1141, 1997
- Olivetti, G., Quaini, F., Sala, R., Lagrasta, C., Corradi, D., Bonacina, E., Gambert, S.R., Cigola, E., Anversa, P. Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28, 2005-2016, 1996
- Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619, 1993
- Packer, M., Bristow, M., Cohn, J., Colucci, W., Fowler, M., Gilbert, E., Shusterman, N. The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. *N. Engl. J. Med.* 334, 1350-1355, 1996
- Palmer, R., Ferrige, A., Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526, 1987
- Pan, J., Fukuda, K., Saito, M., Matsuzaki, J., Kodama, H., Sano, M., Takahashi, T., Kato, T., Ogawa, S. Mechanical stretch activates the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes. *Circ. Res.* 84, 1127-1136, 1999
- Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., Kumar, S., Srinivasula, S.M., Kumar, V., Weichselbaum, R., Nalin, C., Alnemri, E.S., Kufe, D., Kharbanda, S. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J.* 19, 4310-4322, 2000
- Petit, P.X., Gubern, M., Diolez, P., Susin, S.A., Zamzami, N., Kroemer, G. Disruption of the outer mitochondrial membrane as a result of large amplitude swelling: the impact of irreversible permeability transition. *FEBS Lett.* 426, 111-116, 1998
- Pierzchalski, P., Reiss, K., Cheng, W., Cirielli, C., Kajstura, J., Nitahara, J.A., Rizk, M., Capogrossi, M.C., Anversa, P. p53 Induces myocyte apoptosis via the activation of the renin-angiotensin system. *Exp. Cell Res.* 234, 57-65, 1997
- Pirillo, A., Zhu, W., Norata, G.D., Zanelli, T., Barberi, L., Roma, P., Catapano, A.L. Oxidized lipoproteins and endothelium. *Clin. Chem. Lab. Med.* 38, 155-160, 2000
- Pitt, B., Segal, R., Martinez, F., Meurers, G., Cowley, A., Thomas, I., Deedwania, P., Ney, D., Snively, D., Chang, P. Randomised trial of losartan versus captopril in patients over 65 with heart failure (evaluation of losartan in the elderly study, ELITE). *Lancet* 349, 747-752, 1997
- Plumier, J.C., Robertson, H.A., Currie, R.W. Differential accumulation of mRNA for immediate early genes and heat shock genes in heart after ischaemic injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28, 1251-1260, 1996
- Pohl, U., Holtz, J., Busse, R., Bassenge, E. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* 8, 37-44, 1986
- Polte, T., Oberle, S., Schröder, H. Nitric oxide protects endothelial cell from tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced cytotoxicity: a possible involvement of cyclic GMP. *FEBS Lett.* 409, 46-48, 1997
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389, 300-305, 1997
- Radomski, M., Palmer, R., Moncada, S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148, 1482-1489, 1987
- Rahimtoola, S. The hibernating myocardium. *Am. Heart J.* 117, 211-221, 1989
- Reed, J.C. Mechanisms of Bcl-2 family protein function and dysfunction in health and disease. *Behring Inst. Mitt.*, 72-100, 1996
- Reed, J.C. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387, 773-776, 1997
- Rich, T., Allen, R., Wyllie, A. Defying death after DNA damage. *Nature* 407, 777-783, 2000
- Rodriguez, J., Lazebnik, Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* 13, 3179-3184, 1999
- Ross, J. Mechanism of cardiac contraction. What roles for preload, afterload and inotropic state in heart failure. *Eur. Heart J.* 4, A19-A28, 1983
- Ross, J., Jr. Myocardial perfusion-contraction matching - Implications for coronary heart disease and hibernation. *Circulation* 83, 1076-1083, 1991
- Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362, 101-109, 1993
- Ross, R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340, 115-126, 1999

- Sadoshima, J., Xu, Y., Slayter, H., Izumo, S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 75, 977-984, 1993
- Saleh, A., Srinivasula, S.M., Balkir, L., Robbins, P.D., Alnemri, E.S. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by HSP70. *Nature Cell Biol.* 2, 476-483, 2000
- Saraste, A., Pulkki, K., Kallajoki, M., al, e. Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation. *Eur. J. Clin. Invest.* 20, 380-386, 1999
- Saraste, A., Pulkki, K., Kallajoki, M., Henriksen, K., Parvinen, M., Voipio-Pulkki, L.M. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 95, 320-323, 1997
- Saris, N.E., Eriksson, K.O. Mitochondrial dysfunction in ischaemia-reperfusion. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 107, 171-176, 1995
- Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Eberstadt, M., Yoon, H.S., Shuker, S.B., Chang, B.S., Minn, A.J., Thompson, C.B., Fesik, S.W. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 275, 983-986, 1997
- Schaper, J., Lorenz-Meyer, S., Suzuki, K. The role of apoptosis in dilated cardiomyopathy. *Herz* 24, 219-224, 1999
- Schendel, S., Azimov, R., Pawlowski, K., Godzik, A., Kagan, B., Reed, J. Ion channel activity of the BH3 only bcl-2 family members. *J. Biol. Chem.* 274, 21932-21936, 1999
- Schendel, S.L., Montal, M., Reed, J.C. Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ.* 5, 372-380, 1998
- Schendel, S.L., Xie, Z., Montal, M.O., Matsuyama, S., Montal, M., Reed, J.C. Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 5113-5118, 1997
- Schmidt, U., Hajjar, R.J., Helm, P.A., Kim, C.S., Doye, A.A., Gwathmey, J.K. Contribution of abnormal sarcoplasmic reticulum ATPase activity to systolic and diastolic dysfunction in human heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30, 1929-1937, 1998
- Schulz, R., Heusch, G. Acute adaptation to ischemia: short-term hibernating myocardium. *Basic Res. Cardiol.* 90, 29-31, 1995
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., Peter, M.E. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* 254, 439-459, 1998
- Schumann, H. Mechanische Dehnung als Ursache der Überlast-assoziierten Apoptose im terminal insuffizienten Myokard: Potentielle klinische Bedeutung. *Institute of Pathophysiology, Univ., Math.-Nat.-Tech. Fak., Diss., Halle, 2000*
- Sedlak, T.W., Oltvai, Z.N., Yang, E., Wang, K., Boise, L.H., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 7834-7838, 1995
- Segrest, J., Anantharamaiah, G. Pathogenesis of atherosclerosis. *Curr. Opinion Cardiol.* 9, 404-410, 1994
- Seidmann, C., Seidmann, J. Molecular genetics of inherited cardiomyopathies. In: K. Chien (ed) *Molecular basis of cardiovascular disease: a companion to Braunwald's Heart Disease.* W.B. Saunders, Philadelphia, 302-312, 1999
- Shannon, R., Komamura, K., Shen, Y., Bishop, S., Vatner, S. Impaired regional subendocardial coronary flow reverse in conscious dogs with pacing-induced heart failure. *Am. J. Physiol.* 265, H801-H809, 1993
- Sharov, V.G., Sabbah, H.N., Shimoyama, H., Goussev, A.V., Lesch, M., Goldstein, S. Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Am. J. Pathol.* 148, 141-149, 1996
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Itoh, Y., Hasegawa, J., Yamabe, K., Otsuki, Y., Matsuda, H., Tsujimoto, Y. Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL. *Cancer Res.* 56, 2161-2166, 1996a
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Waguri, S., Uchiyama, Y., Matsuda, H., Tsujimoto, Y. Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors. *Oncogene* 13, 21-29, 1996b
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kosaka, H., Kamiike, W., Matsuda, H., Tsujimoto, Y. Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-xL. *Nature* 374, 811-813, 1995
- Shimizu, S., Ide, T., Yanagida, T., Tsujimoto, Y. Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 275, 12321-12325, 2000a
- Shimizu, S., Konishi, A., Kodama, T., Tsujimoto, Y. BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 3100-3105, 2000b

- Shimizu, S., Narita, M., Tsujimoto, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483-487, 1999
- Shimizu, S., Tsujimoto, Y. Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 577-582, 2000
- Shiraiwa, N., Inohara, N., Okada, S., Yuzaki, M., Shoji, S., Ohta, S. An additional form of rat Bcl-x, Bcl-xbeta, generated by an unspliced RNA, promotes apoptosis in promyeloid cells. *J. Biol. Chem.* 271, 13258-13265, 1996
- Simonian, P.L., Grillot, D.A., Nunez, G. Bak can accelerate chemotherapy-induced cell death independently of its heterodimerization with Bcl-XL and Bcl-2. *Oncogene* 15, 1871-1875, 1997
- Sionov, R., Haupt, Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 18, 6145-6157, 1999
- Smith, E., Egan, J., Bugelski, P., Hillegass, L., Hill, D., Griswold, E. Temporal relation between neutrophil accumulation and myocardial reperfusion injury. *Am. J. Physiol.* 255, H1060-H1068, 1988
- Starling, E. The linacre lecture on the law of the heart. *Longmans*, London, England, 1908
- Stennicke, H., Deveraux, Q., Humbke, E., Reed, J., Dixit, V., Salvesen, G. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J. Biol. Chem.* 274, 8359-8362, 1999
- Stephanou, A., Brar, B.K., Knight, R.A., Latchman, D.S. Opposing actions of STAT-1 and STAT-3 on the Bcl-2 and Bcl-x promoters. *Cell Death Differ.* 7, 329-330, 2000
- Studer, R., Reinecke, H., Bilger, J., Eschenhagen, T., Bohm, M., Hasenfuss, G., Just, H., Holtz, J., Drexler, H. Gene expression of the cardiac Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger in end-stage human heart failure. *Circ. Res.* 75, 443-453, 1994
- Suda, T., Takahashi, T., Goldstein, P., Nagata, S. Molecular cloning and expression of the Fas Ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75, 1169-1178, 1993
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M.C., Alzari, P.M., Kroemer, G. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J. Exp. Med.* 189, 381-394, 1999a
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., Kroemer, G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446, 1999b
- Tagami, S., Eguchi, Y., Kinoshita, M., Takeda, M., Tsujimoto, Y. A novel protein, RTN-XS, interacts with both Bcl-XL and Bcl-2 on endoplasmic reticulum and reduces their anti-apoptotic activity. *Oncogene* 19, 5736-5746, 2000
- Tanaka, M., Ito, H., Adachi, S., Akimoto, H., Nishikawa, T., Kasajima, T., Marumo, F., Hiroe, M. Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ. Res.* 75, 426-433, 1994
- Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S., Dixit, V.M. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81, 801-809, 1995
- The SOLVD investigators. Effect of enalapril on survival of patients with reduced left ventricular ejection fraction and congestive heart failure. *N. Engl. J. Med.*, 293-305, 1991
- Thornberry, N.A., Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316, 1998
- Tone, E., Kunisada, K., Fujio, Y., Matsui, H., Negoro, S., Oh, H., Kishimoto, T., Yamauchi-Takahara, K. Angiotensin II interferes with leukemia inhibitory factor-induced STAT3 activation in cardiac myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 147-150, 1998
- Traub, O., Berk, B. Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 18, 677-685, 1998
- Tsujimoto, Y., Croce, C. Analysis of the structure, transcripts and protein structure of bcl-2, the gene involved in follicular lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5214-5218, 1989
- Tsujimoto, Y., Shimizu, S. Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett.* 466, 6-10, 2000
- Vanags, D.M., Porn-Ares, M.I., Coppola, S., Burgess, D.H., Orrenius, S. Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271, 31075-31085, 1996
- Vander Heiden, M.G., Chandel, N.S., Williamson, E.K., Schumacker, P.T., Thompson, C.B. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 91, 627-637, 1997

Vanoverschelde, J.-J., Wijns, W., Depre, C., Essamri, B., Heyndrickx, G., Bogers, M., Boli, A., Melin, J. Mechanisms of chronic regional posts ischemic dysfunction in humans. *Circulation* 87, 1512-1523, 1993

Vaux, D.L., Korsmeyer, S.J. Cell death in development. *Cell* 96, 245-254, 1999

Virchow, R. Cellular pathology as based upon physiological and pathological histology. *Publ. Churchill*, London, England, 1860

von Ahsen, O., Renken, C., Perkins, G., Kluck, R., Bossy-Wetzel, E., Newmeyer, D. Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release. *J. Cell Biol.* 150, 1027-1036, 2000

Walker, P., Weaver, V., Lach, B., Le Blanc, A., Sikorska, M. Endonuclease activities associated with high molecular weight and internucleosomal DNA fragmentation in apoptosis. *Exp. Cell Res.* 213, 100-106, 1994

Wang, B., Ho, H., Lin, P., Schwarzacher, S., Pollmann, M., Gibbons, G., Tsao, P., Cooke, J. Regression of atherosclerosis: role of nitric oxide and apoptosis. *Circulation* 99, 1236-1241, 1999

Wang, F., Seta, Y., Baumgarten, G., Engel, D.J., Sivasubramanian, N., Mann, D.L. Functional significance of hemodynamic overload-induced expression of leukemia-inhibitory factor in the adult mammalian heart. *Circulation* 103, 1296-1302., 2001

Wang, K., Yin, X.M., Chao, D.T., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J. BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev.* 10, 2859-2869, 1996

Weir, M.R., Dzau, V.J. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am. J. Hypertens.* 12, 205S-213S, 1999

Whyte, M., Evan, G. Apoptosis. The last cut is the deepest. *Nature* 376, 17-18, 1995

Williams, G.T. Role of apoptosis in the immune system. *Biochem. Cell Biol.* 72, 447-450, 1994

Wilson, J., Reichel, J., Dunkman, W., Goldberg, S. Effect of diuresis on the performance of the failing left ventricle in men. *Am. J. Med.* 70, 234-239, 1981

Wolny, A., Clozel, J.-P., Rein, J., Mory, P., Vogt, P., Turino, M., Kiowski, W., Fischli, W. Functional and biochemical analysis of angiotensin II-forming pathways in the human heart. *Circ. Res.* 80, 219-227, 1997

Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G., Youle, R.J. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.* 139, 1281-1292, 1997

Wu, C.F., Bishopric, N.H., Pratt, R.E. Atrial natriuretic peptide induces apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 272, 14860-14866, 1997

Wyllie, A. Apoptosis. An endonuclease at last. *Nature* 391, 20-21, 1998

Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80, 285-291, 1995a

Yang, T., Kozopas, K., Craig, R. The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *J. Cell Biol.* 128, 1173-1184, 1995b

Yin, F. Ventricular wall stress. *Circ. Res.* 49, 829-839, 1981

Yusuf, S., Thom, T., Abbott, R. Changes in hypertension treatment and in congestive heart failure mortality in the United States. *Hypertension* 13, 174-179, 1989

Zafeiridis, A., Jeevanandam, V., Houser, S.R., Margulies, K.B. Regression of cellular hypertrophy after left ventricular assist device support. *Circulation* 98, 656-662, 1998

Zamzami, N., Kroemer, G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nature Rev.* 2, 67-71, 2001

Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S.A., Masse, B., Kroemer, G. Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett.* 384, 53-57, 1996a

Zamzami, N., Susin, S.A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M., Kroemer, G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 183, 1533-1544, 1996b

Zhivotovsky, B., Wade, D., Gahm, A., Orrenius, S., Nicotera, P. Formation of 50 kbp chromatin fragments in isolated nuclei is mediated by protease and endonuclease activation. *FEBS Lett.* 351, 150-154, 1994

Zoratti, M., Szabo, I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta* 1241, 139-176, 1995

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., Wang, X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413, 1997

Zou, H., Li, Y., Liu, X., Wang, X. An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 274, 11549-11556, 1999

## **7. Veröffentlichte Originalarbeiten <sup>1)</sup>**

### **7.1. Myocardial gene expression of regulators of myocyte apoptosis and myocyte calcium homeostasis during hemodynamic unloading by ventricular assist devices in patients with end-stage heart failure**

Bartling, B., Milting, H., Schumann, H., Darmer, D., Arusoglu, L., Körner, M.M., El-Banayosy, A., Körfer, R., Holtz, J., Zerkowski, H.-R.  
*Circulation* 100 (Suppl. II), II-216-II-223, 1999

### **7.2. Quantification of cardioprotective gene expression in porcine short-term hibernating myocardium**

Bartling, B., Hoffmann, J., Schulz, R., Heusch, G., Holtz, J., Darmer, D.  
*Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 31, 147-158, 1999

### **7.3. Shear stress-dependent expression of apoptosis-regulating genes in endothelial cells**

Bartling, B., Tostlebe, H., Darmer, D., Holtz, J., Silber, R.E., Morawietz, H.  
*Biochemical and Biophysical Research Communications* 278, 740-746, 2000

<sup>1)</sup> aus urheberrechtlichen Gründen sind die Arbeiten in der veröffentlichten Version der Dissertationsschrift nicht enthalten.



## **Anhang**

### **Danksagung**

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern am Institut für Pathophysiologie der Universität Halle herzlich bedanken, die mir geholfen haben, diese Dissertationsschrift zu verfassen.

Ein besonderer Dank gilt meinem Mentor Herrn Prof. Holtz für die inhaltliche Betreuung, konstruktiven Diskussionen und für die wissenschaftliche Förderung. Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau Dr. Darmer und Herrn Dr. Morawietz für ihre wissenschaftlichen Ratschläge und anregenden Diskussionen bei der Bewältigung der in diese Dissertation einfließenden Forschungsprojekte bedanken.

In diesem Zusammenhang bedanke ich mich auch bei der Arbeitsgruppe in Essen um Herrn Prof. Heusch und Herrn PD Dr. Schulz für die gute Zusammenarbeit im „Schweineprojekt“. Darüber hinaus gilt den Mitarbeitern des ZMG (Herrn Prof. Pauer) sowie Dr. Andreas Schubert ein besonderer Dank, die Pionierarbeit bei der Etablierung der Plattenkegelapparatur geleistet haben.

Für die gemeinsame Lösung vieler Projekt-bezogener und klinischer Fragen möchte ich mich recht herzlich bei Dr. Heike Tostlebe und Dr. Hendrik Milting bedanken. Für die Bearbeitung dieser Fragestellung war hierzu die Kooperation mit der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Universität Halle und der Klinik für Kardiovaskularchirurgie am Herzzentrum Bad Oeynhausen unerlässlich. Aus diesem Grund gilt ebenso den klinischen Koordinatoren Herrn Prof. Zerkowski und Herrn Prof. Körfer sowie dem ärztlichen Personal ein besonderer Dank.

Da wissenschaftliche Kommunikation und Erfahrungsaustausch bei der Lösung und Probleme unentbehrlich sind, möchte ich mich insbesondere bei meinen „alten“ Kollegen Winfried Göttsch, Dr. Uwe Rückschloß, Mike Tostlebe, Nicole Dürrschmidt, Dr. Marten Szibor und Dr. Susanne Rohrbach und meinen „neuen“ Kollegen Dr. Robert Scheubel und PD Dr. Andreas Simm für die diesbezügliche Unterstützung und gute Zusammenarbeit sowie bei Frau Heinze, Frau Gall und Roland Busath für die technische Assistenz bedanken.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die hier vorliegende Dissertationsschrift selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Ein Promotionsverfahren wurde bisher an keiner anderen Universität eröffnet oder beantragt. Frühere Promotionsversuche sind nicht unternommen worden.

Halle/Saale, den 15. Mai 2001

Dipl. Biochem. Babett Bartling

## Lebenslauf

Name: Bartling

Vorname: Babett

Geburtsdatum: 18. 09. 1972

Geburtsort: Wernigerode

Familienstand: ledig

Adresse: Rudolf-Haym-Str. 14, 06110 Halle/Saale

### Ausbildung:

1979 - 1989 Polytechnische Oberschule (POS), Wernigerode

1989 - 1991 Erweiterte Oberschule (EOS), Wernigerode

1991 Abitur

1991 - 1996 Studium der Biochemie, Fachbereich Biochemie/  
Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

1993 Vordiplom

1995-1996 Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Expression von  
Apoptose-assoziierten Genen im regional unterperfundierten  
Myokard“, Institut für Pathophysiologie, Fachbereich  
Medizin, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

1996 Diplom

1996-1999 Dissertation, Institut für Pathophysiologie, Fachbereich  
Medizin, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

seit 1999 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Klinik für Herz- und  
Thoraxchirurgie, Fachbereich Medizin, Martin-Luther-  
Universität Halle/Wittenberg