

Katrin Ackermann

Dr.med.

Charakterisierung der funktionellen Relevanz der intrinsischen und extrinsischen Apoptosewege bei der Ischämie –Reperfusion im transgenen Mausmodell.

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. Stefan Hardt

Ziel dieser Arbeit war die Klärung der Frage, ob in der myokardialen Ischämie eine Aktivierung der Todesrezeptoren stattfindet bzw. ob durch genetische Intervention mittels Überexpression der dominant-negativen Mutante des FADD-Proteins eine Verminderung der Infarktgröße und eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion nach Ischämie erreicht werden kann.

In einem ersten Schritt sollten im Mausmodell Hinweise für die Aktivierung von Todesrezeptoren nach transienter Koronarligatur sowie im Rahmen des Remodeling nach Myokardinfarkt gewonnen werden. Als Parameter für das Ausmaß des apoptotischen Zelluntergangs von Kardiomyozyten wurden die TUNEL-Färbung und der immunhistochemische Nachweis von aktivierter Caspase-3 durchgeführt. In einem weiteren Ansatz wurde schließlich in FADD-DN-transgenen Mäusen überprüft, ob durch Hemmung der FADD-abhängigen proapoptotischen Signaltransduktion eine Verminderung der Zahl apoptotischer Kardiomyozyten erzielt werden kann.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der Apoptoseaktivität in unterschiedlichen Ausmaßen in den transgenen FADD-DN Linien im Vergleich zu Wildtypmäusen erreicht wird.

Weiterhin sollte geklärt werden, welchen Einfluß eine Hemmung der FADD-vermittelten Signaltransduktion auf die Infarktgröße und die myokardiale Funktion nach transienter Ligatur der linken Koronararterie hat. Bekannt ist, dass wesentliche klinische Konsequenzen einer myokardialen Ischämie sich aus der Infarktgröße und sekundär aus der Einschränkung der ventrikulären Funktion ergeben.

Im Ergebnisteil war eine deutliche, jedoch nicht signifikante Verminderung des Infarktareals bei den doppelt transgenen Tierlinien messbar. Entsprechende Troponin Serumwerte bestätigten das Ergebnis. Weiterhin konnte eine Korrelation zwischen Infarktgröße und Troponin T Werten aufgezeigt werden. Einen deutlich sichtbaren günstigen Einfluß auf die Infarktgröße durch die Überexpression des FADD-DN-Transgens gegenüber den Wildtypen konnte nicht gezeigt werden. Insgesamt kam es zur Verkleinerung des Infarkts. Der erwartete positive Effekt blieb jedoch aus. Hier bleibt zu klären, ob nicht durch das Einschlagen eines anderen Signalweges die Hemmung des FADD-DN umgangen wird.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zusätzlich untersucht werden, ob die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose von Kardiomyozyten von der Koaktivierung des mitochondrialen Apoptosewegs abhängig ist.

In Voruntersuchungen konnte in transgenen Mäusen durch Kardiomyozyten-spezifische Überexpression des antiapoptotischen Bcl-2 Protein nach myokardialer Ischämie eine Verminderung der apoptotischen Herzmuskelzellen festgestellt werden. Weiterhin kam es zu einer Reduktion der Infarktgröße, sowie Verbesserung der linksventrikulären Funktion (Chen Z et al, 2001 und Brocheriou Vet al, 2000).

Diese Ergebnisse wurden in dieser Arbeit bestätigt. Die bestehende transgene Mauslinie überexprimierte das antiapoptotische Protein Bcl-2 spezifisch in Kardiomyozyten. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Infarktgröße. Diese korrelierte mit den gemessenen Troponin-Werten. Die Apoptoseaktivität war deutlich verringert.

Unklar war bis zur Durchführung dieses Projekts, ob ein Zusammenspiel des mitochondrialen Wegs und des Todesrezeptorwegs in der Induktion der Apoptose bei Kardiomyozyten erforderlich ist oder ob bereits die Aktivierung eines der beiden Systeme zum apoptotischen Zelltod führt. Im Gegensatz dazu stellte sich die Frage, ob zum Beispiel die Hemmung des extrinsischen und des intrinsischen Signalweges zu einem additiven antiapoptotischen Effekt führt. Denkbar war, dass die Myozytenapoptose über Todesrezeptoren und Mitochondrien parallel, aber unabhängig voneinander initiiert wird. Um entsprechende Interaktion beobachten zu können, wurde die doppelt transgene Tierlinie Bcl-2/FADD-DN bezüglich dem Ausmaß der Myozytenapoptose, Infarktgröße und Myokardfunktion untersucht. Die dabei gewonnenen Ergebnisse ergaben eine deutliche Verminderung der

Infarktgröße, sowie der Myozytenapoptose, insbesondere im Vergleich zu den Wildtyptieren, allerdings auch gegenüber den FADD-DN-transgenen Tieren. Die doppelt transgenen Tiere zeigten gegenüber den Bcl-2 transgenen Tieren keinen Vorteil. Aufgrund der erzielten Werte in Bezug auf die Bcl-2 transgenen Tiere ist zu vermuten, dass der intrinsische Weg bei den doppelt transgenen Tieren ebenfalls gehemmt wird. In wieweit eine Hemmung des extrinsischen Weges der Apoptose besteht, ist nicht verifizierbar. Weiterhin ist unklar ob einer der beiden Wege überwiegend gewählt wird.

Zusammenfassend ist die Myozytenapoptose wahrscheinlich von einer sekundären mitochondrialen Apoptose abhängig. Das wiederum bedeutet, dass eine gleichzeitige Hemmung sowohl des Todesrezeptormechanismus durch FADD-DN und des mitochondrialen Mechanismus durch Bcl-2 zu keinem additiven Effekt führt. Die Ergebnisse dieser Arbeit beweisen sicher, dass der intrinsische Weg bei der Apoptose der Herzmuskelzellen eine entscheidende Rolle spielt. Eine funktionelle Verbesserung der Herzleistung, insbesondere die linksventrikuläre Pumpfunktion, konnte in dieser Arbeit nicht sicher nachgewiesen werden. Welche Bedeutung der extrinsische Weg bei der Myozytenapoptose spielt, kann in dieser Arbeit nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die Unterbrechung des extrinsischen, rezeptorgesteuerten Signalweges der Apoptose durch die dominant-negative Überexpression des FADD-Proteins zeigt jedoch ebenfalls durch eine tendenzielle Infarktgrößenverkleinerung eine Beteiligung dieses Systems am myokardialen Zelluntergang. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Hemmung durch FADD-DN umgangen wird, und so Apoptose ausgelöst wird.

Eine Entwicklung von Medikamenten, die die Apoptose hemmen, könnte dazu beitragen, den Schaden durch ischämischen Zelluntergang am Herzen verringern.