

Kardiale Caspase-1 ist ein proapoptotischer Induktor für Herzinsuffizienz

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Sabine Merkle
aus Füssen

Würzburg 2007

Eingereicht am:

Bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	7
EINLEITUNG	11
I Caspasen und Apoptose	11
1 Apoptose	11
1.1 Definition der Apoptose	11
1.2 Morphologie der Apoptose und Abgrenzung von Nekrose	11
1.2.1 Kontrollierte Elimination von einzelnen Zellen durch Apoptose	11
1.2.2 Unkontrollierte Gewebeerstörung durch Nekrose	12
2 Caspasen	14
2.1 Caspasen als molekulare Regulatoren der Apoptose	14
2.2 Einteilung und Aktivierung der Caspasen	15
2.2.1 Proinflammatorische Caspasen	16
2.2.2 Proapoptotische Caspasen	19
2.2.3 Aktivierung der Caspasen	19
3 Die apoptotische Signaltransduktion	22
3.1 Todesrezeptor-vermittelte Apoptose (extrinsischer Signalweg)	23
3.2 Mitochondrial vermittelte Apoptose (intrinsischer Signalweg)	24
3.3 Endogene Regulationsmechanismen der Apoptose	26
II Herzinsuffizienz	29
1 Herzinsuffizienz als klinisches Syndrom	29
1.1 Definition und Klassifikation der Herzinsuffizienz	29
1.2 Ursachen und Epidemiologie der Herzinsuffizienz	30
2 Therapie der Herzinsuffizienz	31
3 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz	32
3.1 Neurohumorale Kompensationsmechanismen	32
3.2 Mechanische Kompensation durch kardiales Remodeling	33
3.2.1 Apoptose von Herzmuskelzellen	33
3.2.2 Hypertrophes Wachstum von Herzmuskelzellen	34
3.2.3 Veränderte Genexpression der Herzmuskelzellen	36
3.3 Circulus vitiosus und Dekompensation	37
III Ziel dieser Arbeit	38
MATERIALIEN	39
METHODEN	42
I Transgene Mausmodelle	42
1 Caspase-1-transgene Mäuse	42
1.1 Generierung von Mäusen mit kardialer Expression der Caspase-1	42
1.2 Genotypisierung Caspase-1-transgener Mäuse	42
2 Caspase-1-defiziente Mäuse	43
3 Tierhaltung	44

II	Isolierung und Infektion von Kardiomyozyten.....	44
1	Isolierung und Kultur von adulten Mauskardiomyozyten	44
2	Isolierung und Kultur von neonatalen Rattenkardiomyozyten.....	44
3	Generierung von Adenoviren und Infektion von NRCM	46
4	MTT-Versuch	47
III	Quantifizierung der mRNA-Expression mit real-time PCR.....	48
1	Isolierung und Quantifizierung von mRNA	48
2	Reverse Transkription von mRNA.....	49
3	Quantitative real-time PCR	50
3.1	Prinzip und Durchführung	50
3.2	Auswertung.....	51
IV	Quantifizierung der Proteinexpression.....	53
1	Western Blot Analyse	53
1.1	Probengewinnung und Probenvorbereitung	53
1.1.1	Proteinlysate aus murinem Gewebe	53
1.1.2	Proteinlysate aus humanem Gewebe	53
1.1.3	Proteinlysate aus NRCM	54
1.1.4	Quantifizierung der Proteinkonzentration in Lysaten	55
1.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	55
1.3	Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot)	57
1.4	Immundetektion von immobilisierten Proteinen	57
1.5	Proteinfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	59
2	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	59
2.1	Probengewinnung und Probenvorbereitung	59
2.2	Durchführung des Sandwich ELISA	60
V	Histologische Methoden.....	61
1	Anfertigung von Paraffinschnitten	61
2	Anfertigung von Gefrierschnitten	61
3	Histochemische Färbungen.....	61
3.1	Siriusrot-Färbung zur Analyse von Myokardfibrose	61
3.2	Hämatoyxlin/Eosin-Färbung zur Analyse von Kardiomyozytenhypertrophie	62
3.3	DHE-Färbung zur Analyse von reaktiven Sauerstoffspezies	62
3.4	TUNEL-Färbung zur Analyse von Kardiomyozytenapoptose	63
3.4.1	TUNEL-Färbung von Gewebeschnitten	63
3.4.2	TUNEL-Färbung von NRCM	64
3.4.3	TUNEL-Färbung von isolierten adulten Mauskardiomyozyten	65
4	Immunhistochemische Färbungen	65
4.1	Proinflammatorische Zytokine und Entzündungszellen	65
4.2	Komplementkomponente C9 zur Analyse nekrotischen Zelltods	67
4.3	8-OHdG-Färbung zur Analyse von DNA-Schäden durch oxidativen Stress.....	68

VI	Physiologische Methoden	68
1	Methoden zur Analyse der Herzfunktion <i>in vivo</i>	68
1.1	Linksherzkatheterisierung	68
1.2	Echokardiographie	69
2	Operative Schädigungsmodelle des Herzens	69
2.1	Myokardinfarkt zur Induktion einer Herzinsuffizienz	69
2.2	Ischämie/Reperfusion zur Induktion von Apoptose	69
VII	Statistische Auswertung der Ergebnisse	70
	ERGEBNISSE	71
I	Verstärkte Expression der Caspase-1 bei Herzinsuffizienz.....	71
1	Verstärkte Expression der Caspase-1 in einem murinen Herzinsuffizienzmodell	71
2	Verstärkte Expression der Caspase-1 bei humaner Herzinsuffizienz ..	72
II	Induktion von Herzinsuffizienz durch kardiale Caspase-1.....	73
1	Generierung von Caspase-1-transgenen Mäusen	73
2	Linksventrikuläres Remodeling und Herzinsuffizienz in Caspase-1-transgenen Mäusen	76
2.1	Progressive Myokardfibrose.....	76
2.2	Progressive Kardiomyozytenhypertrophie	78
2.3	Dilatation des linken Ventrikels	80
2.4	Verminderte linksventrikuläre Herzfunktion	81
3	Verminderte Herzinsuffizienz durch Ausschaltung der endogenen Caspase-1 nach Myokardinfarkt	84
III	Zytokin-unabhängige Induktion von Kardiomyozytenapoptose durch kardiale Caspase-1	86
1	Kardiale Caspase-1 wirkt nicht proinflammatorisch.....	86
1.1	Unveränderte proinflammatorische Zytokine und Entzündungszellen.....	86
1.2	Unveränderter oxidativer Stresstatus	88
1.3	Keine Zunahme an nekrotischem Zelluntergang	89
2	Apoptose von Kardiomyozyten durch kardiale Caspase-1	90
2.1	Erhöhte Kardiomyozytenapoptose in Caspase-1-transgenen Mäusen	90
2.2	Apoptoseinduktion durch adenoviral exprimierte Caspase-1 in NRCM.....	92
2.3	Deutliche Reduktion der Apoptose durch Ausschaltung der endogene Caspase-1 nach Ischämie/Reperfusion	94
IV	Selektive Aktivierung des mitochondrialen Signalweges durch kardiale Caspase-1	96
1	Aktivierung der intrinsischen Caspase-Kaskade	97
2	Unveränderte Apoptoseinduktion bei Inhibition des extrinsischen Signalweges	97

DISKUSSION.....	99
I Organspezifität des Wirkmechanismus der Caspase-1.....	99
1 Induktion einer Herzinsuffizienz durch kardiale Caspase-1	99
2 Abwesenheit einer proinflammatorischen Wirkung durch kardiale Caspase-1	102
3 Induktion von Apoptose durch Caspase-1 im Myokard.....	106
II Inhibition kardialer Apoptose als Therapiestrategie	118
III Kardiale Caspase-1 als ein neues therapeutisches Target?.....	123
1 Möglichkeiten einer Caspase-1 Inhibition	123
1.1 Endogene Caspase-1 Inhibitoren	123
1.2 Synthetische Caspase-1 Inhibitoren	123
1.2.1 Peptidische Caspase-1 Inhibitoren	123
1.2.2 Peptidomimetische Caspase-1 Inhibitoren	126
1.2.3 Nicht-peptidische Caspase-1 Inhibitoren	128
2 Ausblick	129
LITERATURVERZEICHNIS.....	132
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	149

ZUSAMMENFASSUNG

Herzmuskelschwäche (Herzinsuffizienz) ist in industrialisierten Ländern neben malignen Erkrankungen noch immer die zweithäufigste Todesursache. Das Zusammenspiel der zu einer Herzmuskelschwäche führenden, molekularen Signalwege und die zugrunde liegenden Mechanismen sind trotz intensiver Forschung bisher noch weitgehend unverstanden. Ein detaillierteres Verständnis der Entstehung einer Herzinsuffizienz könnte somit entscheidend zur Entwicklung innovativer Therapiestrategien beitragen.

Mit Hilfe eines cDNA Expressions Arrays wurde die differentielle Genexpression in einem murinen Herzinsuffizienzmodell untersucht. Die Cysteinprotease Caspase-1 ist eines der in diesem Array identifizierten Kandidatengene. Die verstärkte Expression der Caspase-1 konnte zunächst sowohl für die murine als auch die humane Herzinsuffizienz verifiziert werden.

Caspasen werden klassischerweise, ihrer Funktion entsprechend, in proinflammatorische und proapoptotische Caspasen unterteilt. In der Literatur ist Caspase-1 als ein über die Generierung von aktivem IL-1 β und IL-18 wirkender, proinflammatorischer Mediator beschrieben. IL-1 β und IL-18 sind proinflammatorische Zytokine und als solche zentrale Mediatoren bei entzündlichen Prozessen. Während die Funktion der proapoptotischen Caspasen bei Herzmuskelschwäche weitgehend bekannt ist, ist unklar, welche Bedeutung der verstärkten kardialen Expression der Caspase-1 bei der Entstehung und Progression der Herzmuskelschwäche zukommt.

Zur funktionellen Analyse der verstärkten Expression der Caspase-1 *in vivo* wurde die Caspase-1 in einem transgenen Mausmodell kardial überexprimiert. Herzen mit verstärkter Expression der Caspase-1 entwickelten ab dem vierten Lebensmonat morphologische und funktionelle Veränderungen, die charakteristisch für eine angehende Herzinsuffizienz sind. Dennoch war, trotz progressiver Kardiomyozytenhypertrophie und Myokardfibrose, zu keinem Zeitpunkt des untersuchten Zeitraumes (ein bis vierzehn Monate alt) eine Zunahme des Ventrikelgewichtes evident. Die funktionelle Analyse der Herzfunktion von neun Monate alten Caspase-1-transgenen Mäusen zeigte eine signifikante Einschränkung der Linksherzkontraktilität. Diese Herzinsuffizienz war schließlich auch makroskopisch an einer starken Linksherzdilatation als auch an einer Reduktion der linksventrikulären Wandstärke erkennbar.

Ist die Induktion einer Herzinsuffizienz durch Caspase-1 als proinflammatorischer Mediator im Herzen zu erklären? In einer Reihe von Versuchen konnten keine Hinweise auf eine Induktion inflammatorischer Prozesse durch kardiale Caspase-1 festgestellt werden. Weder eine verstärkte Bildung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und

IL-18, noch eine vermehrte Infiltration von Entzündungszellen oder eine verstärkte Proteinexpression weiterer Zytokine waren detektierbar. Ferner waren der oxidative Stresstatus und der nekrotische Gewebeuntergang im linksventrikulären Myokard Caspase-1-transgener Mäuse unverändert.

Doch besonders im Herzmuskelgewebe junger Caspase-1-transgener Mäuse zeigte sich eine deutliche, mit fortschreitendem Alter bestehende Zunahme des apoptotischen Zelltods von Herzmuskelzellen. Diese direkte, proapoptotische Wirkung der kardialen Caspase-1 konnte ebenfalls in isolierten Kardiomyozyten von Caspase-1-transgenen Mäusen *ex vivo* und *in vitro*, nach adenoviraler Infektion von neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRCM) mit Caspase-1, demonstriert werden. Durch Infektion von NRCM mit dem Caspase-1-exprimierenden Adenovirus (Adv-Casp-1) konnte eine selektive Aktivierung des intrinsischen apoptotischen Signaltransduktionsweges durch Caspase-1 nachgewiesen werden.

Ist die endogen exprimierte Caspase-1 ein wesentlicher Regulator kardialer Apoptose?

In dem Kardiomyozytenapoptose-induzierenden Schädigungsmodell der Ischämie/Reperfusion waren die Caspase-1-defizienten Mäuse durch eine Reduktion der Kardiomyozytenapoptose um nahezu 75% gegenüber der Kontrollgruppe deutlich begünstigt. Des Weiteren zeigte die Ausschaltung der endogenen Caspase-1 in dem Herzinsuffizienzmodell des operativen Herzinfarkts eine deutliche Verminderung der reaktiven Kardiomyozytenhypertrophie und eine geringere Einschränkung der Herzkontraktilität. Diese Verbesserung des kardialen Phänotyps spiegelte sich ferner in einer reduzierten Sterblichkeit gegenüber der Kontrollgruppe wieder. Eine Inhibition der Caspase-1 stellt somit ein interessantes therapeutisches Target zur Prävention der Entwicklung einer Herzinsuffizienz dar.

SUMMARY

To date, heart failure is still, besides malignant diseases, one of the most frequent causes of death in industrialized countries. Despite intensive research progress, the interplay of molecular signaling pathways and the underlying mechanisms leading to heart failure are still poorly understood. However, more detailed insights in the development of heart failure are essential to develop novel therapeutic strategies.

A cDNA-array was performed to identify differentially expressed genes in a murine heart failure model. Thereby, the cysteine protease caspase-1 was identified as a novel potential target gene for heart failure development. First, the increased expression of caspase-1 was confirmed for murine and human heart failure.

Accordingly to their function, caspases are traditionally divided into proinflammatory and proapoptotic caspases. Due to the generation of active IL-1 β and IL-18, caspase-1 has been described as a potent proinflammatory mediator. The proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 are central mediators during inflammatory processes. While the function of the proapoptotic caspases during heart failure has been intensively studied, the role of caspase-1 during the development and progression of heart failure is unknown.

To study the functional effect of an increased caspase-1 expression *in vivo*, transgenic mice with cardiac specific expression of caspase-1 were generated. From four months onwards, hearts with increased transgenic expression of caspase-1 displayed morphological and functional changes characteristic for heart failure. Despite progressive cardiomyocyte hypertrophy and myocardial fibrosis, the ventricular weight was not increased at any age studied (one to fourteen months old). The analysis of cardiac function revealed a significant impairment of left ventricular contractility at nine months of age. Finally, the manifest heart failure was also seen in a massive dilatation of the left ventricle and a reduced left ventricular wall thickness.

Is the induction of heart failure originating from caspase-1 being a proinflammatory mediator in the heart? In a set of experiments, no indices for a induction of proinflammatory processes via cardiac caspase-1 were seen. Neither increased formation of the proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 nor enhanced infiltration of inflammatory cells nor increased production of other cytokines was detectable. Moreover, there were no signs for a raised oxidative stress and necrotic cell death in left ventricular tissue of caspase-1-transgenic mice.

Heart sections of young caspase-1-transgenic mice in particular, displayed a pronounced and robust increase in cardiomyocyte apoptosis that was persistent at all ages studied. The direct proapoptotic effect of cardiac caspase-1 was corroborated by assessing apoptosis in isolated caspase-1-transgenic cardiomyocytes *ex vivo* and by

further *in vitro* experiments with neonatal rat cardiomyocytes (NRCM). Moreover, adenovirally expressed caspase-1 in NRCM induced a selective activation of the intrinsic apoptotic signaling pathway.

Can the proapoptotic function of overexpressed caspase-1 also be seen for the endogenous caspase-1? Caspase-1-deficient mice were protected from ischemia-reperfusion induced cardiomyocyte apoptosis by almost 75%, as compared to the corresponding wild-type control group. In the setting of heart failure after myocardial infarction, the deletion of endogenous caspase-1 significantly ameliorated reactive hypertrophic growth of cardiac myocytes and partly preserved cardiac contractility. Furthermore, the improved cardiac phenotype was reflected in a reduced mortality of caspase-1-deficient mice after myocardial infarction. To conclude, the inhibition of caspase-1 represents a potential therapeutic strategy to inhibit development and progression of heart failure.

EINLEITUNG

I Caspasen und Apoptose

1 Apoptose

1.1 Definition der Apoptose

Der aus dem Griechischen stammende Begriff Apoptose (Apo+ptosis = Fall welcher Blätter von herbstlichen Bäumen) beschreibt symbolhaft das selbstlose Absterben einzelner Zellen zum Wohle des Gesamtorganismus. Apoptose ist ein aktiver, Energie verbrauchender, biochemischer Prozess, der schematisch nach einem genetisch festgelegten Programm abläuft und schließlich zum kontrollierten Untergang einer einzelnen Zelle führt. Durch dieses, in eukaryontischen Zellen abgelegte Selbstmordprogramm, auch programmierter Zelltod genannt, können gezielt einzelne Zellen eliminiert werden (Gerschenson and Rotello 1992; Hetts 1998; Takemura and Fujiwara 2006).

1.2 Morphologie der Apoptose und Abgrenzung von Nekrose

1.2.1 Kontrollierte Elimination einzelner Zellen durch Apoptose

Obwohl der Embryologe Carl Vogt bereits 1842 das Phänomen des programmierten Zelltodes bei Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*) entdeckt hatte (Clarke and Clarke 1996) wurde der Begriff Apoptose erst in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts maßgeblich von den Pathologen Kerr, Currie und Wyllie geprägt und als eigenständige Form des Zelltodes definiert (Kerr, Wyllie et al. 1972; Wyllie, Kerr et al. 1980). Diese lieferten mittels elektronenoptischer Untersuchungen erstmalig detaillierte Beschreibungen der stereotypen, charakteristischen Abfolge der morphologischen Veränderungen während des apoptotischen Zelltods.

Während der Apoptose beginnt die Zelle durch Umstrukturierung und Volumenabnahme des Zytoplasmas und der Kondensation zytoplasmatischer Proteine zu schrumpfen (Zeiosis). An der Zytoplasmamembran werden Ausstülpungen und Bläschen (membrane blebbing = Vorstufe der später auftretenden apoptotischen Körperchen) sichtbar, es kommt zur Auflösung von Zellkontakten (Ellis, Yuan et al. 1991). Durch die Chromatinkondensation im Zellkern (besonders an die Nukleusmembran) wird die charakteristische apoptotische DNA-Fragmentierung eingeleitet. Die DNA wird durch Endonucleasen intranucleosomal gespalten, wodurch DNA-Fragmente mit einer charakteristischen Größe von ca. 180 Basenpaaren bzw. eines Vielfachen davon

entstehen (DNA-Leiter). Die Morphologie der Mitochondrien bleibt zunächst erhalten. In der Endphase des apoptotischen Zelluntergangs zerfällt die Zelle in kleine, membranumschlossene Partikel (apoptotischen Körperchen) (Fiers, Beyaert et al. 1999), die die Zellorganellen und Teile des Zellkerns enthalten (siehe Abb.1). Während der Ausbildung dieser apoptotischen Körperchen kommt es zu einem Verlust der Membransymmetrie, was zur Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche führt. Über diese werden die apoptotischen Körperchen spezifisch, beispielsweise durch Makrophagen erkannt und durch Phagozytose vollständig eliminiert (Fadok, Voelker et al. 1992). Da durch diese Art des Zelltodes sämtliche intrazellulären Bestandteile bis zur vollständigen Elimination durch Phagozytose membranumschlossen sind, bleiben nachfolgende inflammatorische Reaktionen und die Schädigung des umliegenden Gewebes aus (siehe Tab. 1). Apoptose wird daher auch als die physiologische Form des Zelluntergangs bezeichnet, da sie die kontrollierte Elimination einzelner Zellen auf eine für den Gesamtorganismus unschädliche Weise ermöglicht (Takemura and Fujiwara 2004).

1.2.2. Unkontrollierte Gewebszerstörung durch Nekrose

Im Vergleich zum Zelltod durch apoptotische Prozesse ist der Zelltod durch Nekrose ein pathologischer Vorgang (Edinger and Thompson 2004). Nekrose ist ein irreversibler, passiver, energieunabhängiger Vorgang, der sich keiner geregelten Mechanismen zum Abbau von Proteinen und Nukleinsäuren bedient (siehe Tab. 1). Während bei Apoptose streng kontrollierte und kaskadenförmig angeordnete Signalwege zahlreiche Möglichkeiten einer vielschichtigen endogenen Kontrolle dieses Prozesses bieten, kann Zelltod durch Nekrose nicht durch regulierende Kaskaden beeinflusst werden (Gerschenson and Rotello 1992). Aufgrund ihrer hohen Variabilität sind die zu Nekrose führenden Mechanismen bis heute nur wenig verstanden. Nekrose wird durch starke äußere Noxen ausgelöst. Diese Noxen entstehen bei deutlichen Abweichungen von physiologischen Bedingungen, wie beispielsweise durch Hypoxie und Ischämie, durch Änderungen der Umgebungstemperatur oder durch das Einwirken von Toxinen. Diese Faktoren induzieren eine Erhöhung der zellulären Membranpermeabilität, was zu einem gesteigerten Natrium- und Wasserinflux führt. Morphologisch ist dies an dem charakteristischen Anschwellen der Zelle und deren Organellen (Onkose) sichtbar was letztlich Membranrupturen und die Zerstörung der Zellorganellen induziert (siehe Abb.1). Der Verlust der Membranintegrität bedingt das Ausströmen lysosomaler Enzyme in das extrazelluläre Milieu, was folglich durch Aktivierung des Immunsystems eine starke Involvierung der umliegenden Zellen impliziert. Das Einwandern von Entzündungszellen in das Nekrosegebiet und eine ausgeprägte entzündliche Antwort sind die Folge. Im

Vergleich zur Apoptose sind bei der Nekrose demnach nicht einzelne Zellen betroffen, sondern es kommt zum unkontrollierten Untergang ganzer Zellgruppen, bzw. – verbände. Infolgedessen ist die Ausbildung sogenannter Nekrosenester ein Charakteristikum des nekrotischen Zelltods (Schwartzman and Cidlowski 1993; Best, Hasdai et al. 1999).

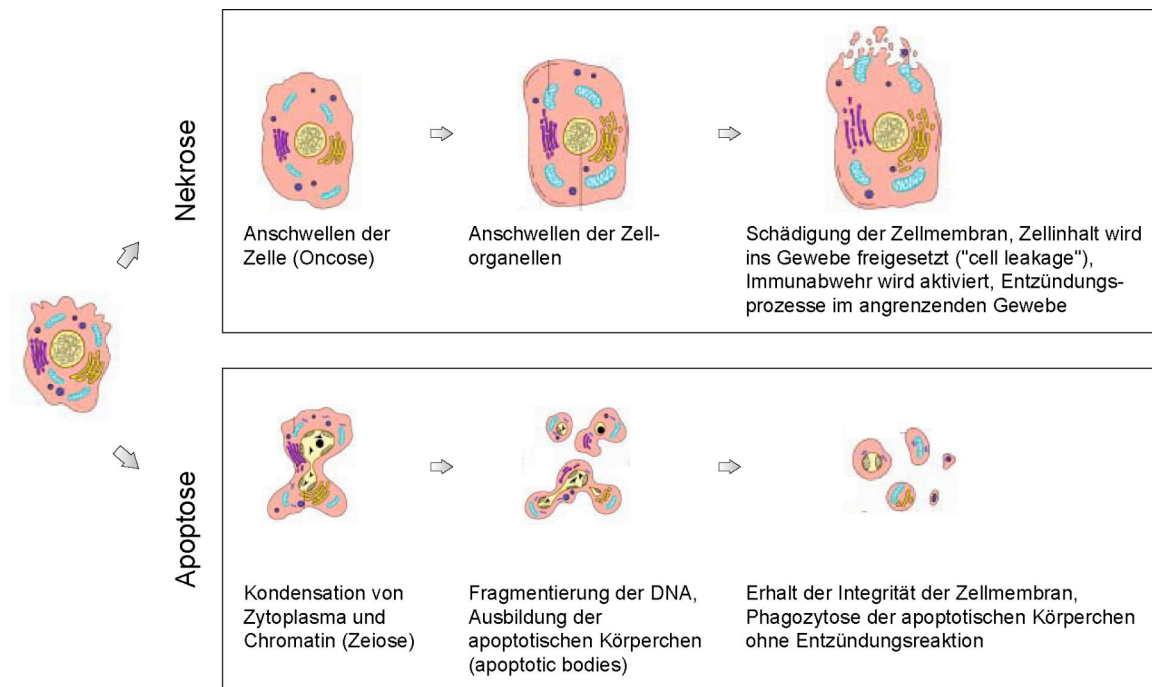


Abbildung 1: Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen im Prozeß der Nekrose (oben) und Apoptose (unten). Bei der Nekrose kommt es durch den Einstrom von Wasser und Natrium zu Zellschwellung und schließlich zum kompletten Verlust der Membranintegrität. Apoptose hingegen ist durch Erhalt der Zellmembranintegrität und Ausbildung apoptotischer Körperchen morphologisch gekennzeichnet. (Modifiziert aus Apoptosis, Cell Death, and Cell Proliferation Manual, Boehringer Mannheim)

Da Apoptose ein Energie-verbrauchender Prozess ist, kann auch der Energiestatus einer Zelle mitentscheidend dafür sein, ob eine Zelle geregelt auf apoptotischem Weg eliminiert wird oder ob sie nekrotisch, zu Lasten des Gesamtorganismus untergeht. Beispielsweise können Stressoren zum Abbau von ATP führen oder durch Reparaturmechanismen (wie beispielsweise durch das DNA-Reparaturenzym PARP) kann übermäßig viel Energie verbraucht werden. Infolgedessen kann die Form des Zelluntergangs von der Apoptose in den passiven Nekroseprozess übergehen (Eguchi, Shimizu et al. 1997; Leist, Single et al. 1997; Fischer, Janicke et al. 2003).

Apoptose	Nekrose
Morphologisch	
Zellschrumpfung (Zeiose) Chromatinkondensation Bildung membranumschlossener Vesikel (apoptotische Körperchen)	Zellschwellung (Oncose) Chromatinverklumpung Verlust der Membranintegrität (Zellyse)
Biochemisch	
Energieabhängig Aktiv Schematischer Ablauf durch Aktivierung der Caspase-Kaskade Schematische DNA-Fragmentierung	Energieunabhängig Passiv Kein schematischer Ablauf Zufälliger Abbau der DNA
Pathophysiologisch	
Betrifft einzelne Zellen Ausgelöst durch physiologische Signale Entsorgung der Zelle durch Phagozytose	Betrifft Zellgruppen Ausgelöst durch unphysiologische Signale (Noxen) Zellyse führt zu Entzündungsreaktion

Tabelle 1: Gegenüberstellung der morphologischen, biochemischen und pathophysiologischen Unterschiede zwischen apoptotischem und nekrotischem Zelltod. (Modifiziert aus Apoptosis, Cell Death, and Cell Proliferation Manual, Boehringer Mannheim; Kunapuli, 2006)

2 Caspasen

Die Familie der Caspasen gehört zu der großen Enzymfamilie der Cysteinproteasen. Caspasen sind evolutionär hochgradig konservierte Enzyme, die in den verschiedensten Entwicklungsstufen, von der Fadenalge Hydra über Nematoden und Insekten bis hin zum Menschen zu finden sind (Cikala, Wilm et al. 1999; Earnshaw, Martins et al. 1999).

2.1 Caspasen als molekulare Regulatoren der Apoptose

Die morphologischen Veränderungen einer Zelle während der Apoptose repräsentieren das finale Stadium des apoptotischen Zelltodes. Effektives Kernstück der apoptotischen Signaltransduktion ist das kaskadenartig aktivierbare System von Caspasen, die die Induktion von Apoptose sowohl extrinsisch, über Todesrezeptoren als auch durch einen intrinsischen, mitochondrialen Signalweg vermitteln können (Bialik, Geenen et al. 1997; Cohen 1997; Thornberry and Lazebnik 1998; Earnshaw, Martins et al. 1999; Grutter 2000). Heute weiß man, dass die proteolytische Prozessierung und Aktivierung der Caspasen (Alnemri, Livingston et al. 1996) ursächlich für die apoptotischen Veränderungen einer Zelle sind. Neben den Caspasen wurde in den letzten Jahren eine

Reihe weiterer Moleküle identifiziert, die an der Regulation des programmierten Zelltodes beteiligt sind. Dabei handelt es sich beispielsweise um die pro- und antiapoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie, um Caspase-Substrate (Fischer, Janicke et al. 2003), sowie um mit diesen Proteinen assoziierte und interagierende Moleküle (Chinnaiyan and Dixit 1996).

Caspasen sind evolutionär hoch konservierte und ubiquitär exprimierte Cysteinproteasen, die bei ihren Substraten spezifisch Peptidbindungen C-terminal von Aspartat spalten (Alnemri 1997; Nicholson and Thornberry 1997; Stennicke and Salvesen 1998). Von diesem Gruppencharakteristikum leitet sich der Name dieser Enzymklasse ab: C-asp-ase (Englisch: cysteinyl-aspartate-celeaving protease). Entdeckt wurde die Familie der Caspasen in der Entwicklungsbiologie bei Studien an dem Fadenwurm *C.elegans*. Dabei wurden drei Gene identifiziert, die maßgeblich an apoptotischen Prozessen im Rahmen der physiologischen Entwicklung von *C.elegans* beteiligt sind: die proapoptotischen Gene *Ced-3* und *Ced-4* und das antiapoptotische Gen *ced-9*. Im Zuge der Evolution haben sich aus diesen drei Genen bei den Wirbeltieren ganze Genfamilien entwickelt, die unmittelbar mit der Regulation der Apoptose in Zusammenhang stehen: Caspasen sind homolog zu *Ced-3* (Thornberry and Lazebnik 1998), Apaf-1 ist ein *Ced-4*-Homolog (Zou, Henzel et al. 1997) und die Bcl-2-Genfamilie steht in enger Beziehung zu *Ced-9* (Yang and Korsmeyer 1996; Nicholson 1999). Die Klonierung des *ced-3*-Gens aus *C.elegans* zeigte eine weitreichende Homologie zu dem die humane Caspase-1 codierenden Gen auf. Die Caspase-1 war damit 1993 als erster Vertreter der Familie der Caspasen definiert (Yuan, Shaham et al. 1993; Cerretti, Hollingsworth et al. 1994; Xue, Shaham et al. 1996).

2.2 Einteilung und Aktivierung der Caspasen

Bis zum heutigen Tag sind für den Menschen elf Caspasen bekannt (Denault and Salvesen 2002). Gemeinsames Charakteristikum aller Caspasen ist, dass sie im aktiven Zentrum ein Cystein innerhalb des konservierten QACXG-Motivs (GluAlaCysXGly) besitzen. Ihre Substratspezifität richtet sich sowohl nach der vorangegangenen Aminosäuresequenz als auch nach der Tertiärstruktur des Substratpolypeptides. So schneidet Caspase-1 beispielsweise nach YVAD-Sequenzen (TyrValAlaAsp), Caspase-3 nach DEVD-Einheiten (AspGluValAsp) (Hara, Friedlander et al. 1997; Rano, Timkey et al. 1997).

Caspasen werden ihrer Funktion entsprechend in proinflammatorische und proapoptotische Caspasen eingeteilt (Nicholson 1999) (siehe Abb. 2).

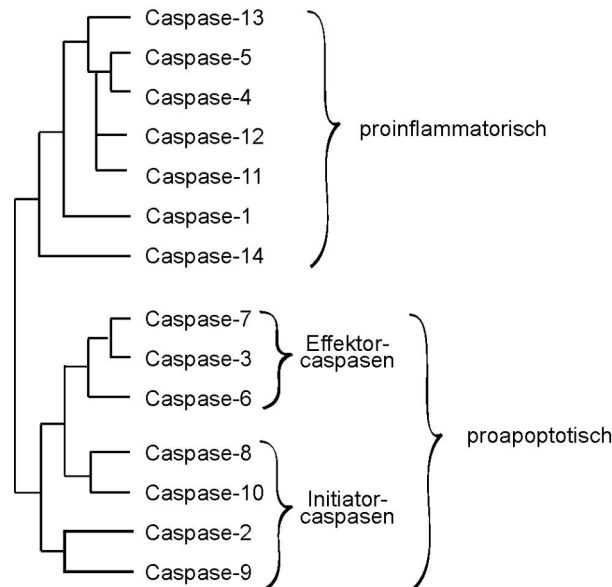


Abbildung 2: Die Familie der Caspasen. Dargestellt sind alle Caspasen der Säuger, Caspasen-11, -12, -14 sind nicht als humane Caspasen bekannt. Phylogenetisch lassen sich die Caspasen in zwei Unterfamilien, die proinflammatorischen und proapoptotischen Caspasen einteilen. Für die proapoptotischen Caspasen wird weiter zwischen Effektor-, und Initiatorcaspasen unterschieden. (Modifiziert aus Nicholson 1999)

2.2.1 Proinflammatorische Caspasen

Ein Synonym für Caspase-1 ist Interleukin-konversions-Enzym (ICE). Die in der Literatur beschriebene Funktion der Caspase-1 ist die Generierung von aktivem Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-18 (IL-18) aus deren inaktiven Vorstufen (Thornberry, Bull et al. 1992; Cerretti, Hollingsworth et al. 1994; Siegmund 2002). Zum Überführen der inaktiven cytosolischen Vorstufe des Zytokins IL-1 β (pro-IL1 β , 31kDa) in das 17kDa große aktive Spaltprodukt muss es spezifisch, durch die ebenfalls cytosolisch lokalisierte Caspase-1 an Aspartat-Resten in den Positionen 27 und 116 geschnitten werden (Howard, Kostura et al. 1991). In Untersuchungen an Makrophagen Caspase-1-defizienter Mäuse wurde gezeigt, dass die LPS-induzierte Sekretion von IL-1 β durch eine Ausschaltung der Caspase-1 unterbunden ist. Während Wildtypiere nach LPS-Stimulation deutlich erhöhte IL-1 β Serumwerte aufweisen, zeigen Caspase-1-defiziente Mäuse keinen Anstieg der Serumspiegel für IL-1 β (Li, Allen et al. 1995; Li, Allen et al. 1997).

Interleukin-1 existiert in zwei Splicevarianten, dem IL-1 α und dem IL-1 β . Beide Zytokine werden im Zytosol als ein inaktives Vorläuferprotein exprimiert. Sie weisen keine Signalsequenz auf, wodurch eine Sekretion durch den klassischen Weg über das

endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat ausgeschlossen ist. Erst nach Aktivierung durch spezifische Prozessierung in ihre aktiven Spaltprodukte im Cytosol, werden sie von der Zelle sezerniert. Auf welchem Weg genau diese Sezernierung erfolgt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Eine unspezifische Freisetzung durch Zellyse oder die Passage durch Plasmamembranporen ist hierbei ebenso beschrieben wie eine spezifische Sekretion durch die Freisetzung von Mikrovesikeln. Die Sekretion von IL-1 β ist ferner von Faktoren wie Zelltyp und Stimulus abhängig (Singer, Scott et al. 1995; Pelegrin, Chaves-Pozo et al. 2004; Brough and Rothwell 2007).

Ihre Wirkungen üben IL-1 α und IL-1 β primär über den IL-1-Rezeptor aus. Auch dieser existiert in zwei homologen Formen, IL-1-Rezeptor Typ I und Typ II. Der Typ II Rezeptor ist funktionell inert, fungiert jedoch als sogenannter „decoy“-Rezeptor und kann auf diesem Weg das Ausmaß der Aktivierung des Typ I Rezeptors kontrollieren (Sims, Giri et al. 1994; Dinarello 2001). Der Typ I Rezeptor ist für die Signalweiterleitung verantwortlich und weist eine 10-fach höhere Affinität für IL-1 α im Vergleich zu IL-1 β auf (Mosley, Urdal et al. 1987; Sims, Gayle et al. 1993). Durch den IL-1-Rezeptor kann der NF κ B-, der JNK/AP-1- und der p38/MAPK-Signalweg aktiviert werden. In der Summe führt die Aktivierung dieser Signalwege zu einer Verstärkung proinflammatorischer Signale in der Zelle, beispielsweise durch eine verstärkte Expression weiterer Zytokine (Dinarello 1997; Loppnow, Werdan et al. 1998; Subramaniam, Stansberg et al. 2004). Während IL-1 α ein primär lokal wirkender Regulator ist, fungiert IL-1 β als ein nach Sekretion systemisch wirkender Hormon-ähnlicher Mediator. IL-1 β ist ein induzierbares Gen und wird hauptsächlich in aktiven Makrophagen und Monozyten gebildet. Die IL-1 β zugeschriebenen Effekte sind zahlreich und weitreichend (siehe Tab. 2). Dennoch lässt sich die Wirkung von IL-1 β als zentraler, sehr potenter inflammatorischer Signalvermittler definieren, der seine Wirkungen über Interaktionen mit zahlreichen Signalwegen und Zytokinen verstärkt. Caspase-1-defiziente Mäuse zeigen beispielsweise nach Stimulation mit LPS neben einer deutlich reduzierten IL-1 β und IL-18 Expression auch eine verminderte IL-6- und TNF- α -Antwort (Kuida, Lippke et al. 1995; Li, Allen et al. 1995). Pathophysiologisch fungiert IL-1 β auf diese Weise als zentraler Mediator bei der Immunantwort auf Infektionen und Verletzungen und triggert Entzündungsreaktionen (Dinarello 1996).

Wirkungen von IL-1β	
Systemisch	Pyrogen, negativ inotrop, hypoglycämisch, hypotensiv
Lokal	Infiltration von Immunzellen und Induktion von Zytokinen
Verstärkte Genexpression von	Cytokine und Cytokin-Rezeptoren (IL-1, TNF α , IL-2,6,12, GM-SCF, TGF β , IFN γ) Proinflammatorische Mediatoren (COX, iNOS, Endothelin-1) Geweberemodelling (Kollagene, MMPs, TIMPs) Wachstumsfaktoren (NGF, IGF, Fibroblasten-Wachstumsfaktor) Komplementsystem Gerinnungsfaktoren

Tabelle 2: Übersicht der biologischen Effekte und Zielgene von IL-1 β . (Modifiziert aus Dinarello 1996)

1997 wurde IL-18 als zweites Zytokin identifiziert, das durch Caspase-1 geschnitten und somit aktiviert wird (Gu, Kuida et al. 1997; Fantuzzi, Puren et al. 1998; Fantuzzi, Reed et al. 1999). Das Zytokin IL-18 kann sowohl von Zellen des Immunsystems als auch in Nicht-Immunzellen exprimiert werden (Dinarello 1999). IL-18 weist gegenüber IL-1 β eine hohe strukturelle Homologie auf. Auch der IL-18-Rezeptor zeigt eine hohe strukturelle Homologie zum IL-1-Rezeptor. IL-18 wird, wie IL-1 β auch, als inaktives Vorläufermolekül (24kDa) ohne Signalsequenz im Cytosol exprimiert, spezifisch durch die Caspase-1 nach den Aspartat-Resten an den Positionen 71 und 76 geschnitten und somit in seine aktive Form (18kDa) überführt. Neben Caspase-1 kann IL-18 auch durch Proteinase 3 (Sugawara, Uehara et al. 2001) und Caspase-3 (Akita, Ohtsuki et al. 1997) gespalten werden, hierbei entstehen jedoch teils inaktive IL-18 Spaltprodukte (Gracie, Robertson et al. 2003). IL-18 wurde als potenter Aktivator von IFN γ identifiziert, weshalb es auch ursprünglich als IFN-inducing factor bezeichnet wurde. Des Weiteren sind die charakteristischen Wirkungen von IL-18 die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B sowie die Induktion der Expression von IL-1 β und TNF α . Ähnlich IL-1 β dient IL-18 somit als genereller Signalvermittler und -verstärker entzündlicher Prozesse (Dinarello 1999). Abgesehen von den proinflammatorischen Wirkungen sind für IL-18 und IL-1 β vereinzelt auch proapoptotische Wirkungen beschrieben worden (Friedlander, Gagliardini et al.

1996; Friedlander, Gagliardini et al. 1997; Suzuki, Murtuza et al. 2001; Wigginton, Lee et al. 2002; Chandrasekar, Vemula et al. 2004; Wang, Wang et al. 2005). Beide proinflammatorischen Cytokine induzieren zudem eine verstärkte Expression an $TNF\alpha$, einem Aktivator des extrinsischen apoptotischen Signalweges.

2.2.2 Proapoptotische Caspasen

Innerhalb der Gruppe der proapoptotischen Caspasen wird zwischen sogenannten Initiatorcaspasen und Effektorcaspasen unterschieden. Die typischerweise langen N-terminalen Prodomänen der Initiatorcaspasen enthalten sogenannte Rekrutierungsmodule wie die DED (death effector domain) der Procaspase-8 oder die CARD (caspase activation and recruitment domain) der Procaspase-9 (Earnshaw, Martins et al. 1999). Diese Bindungsdomänen sind unentbehrlich für deren autokatalytische Aktivierung und damit die Aktivierung der nachgeschalteten Caspase-Kaskade. Die primäre Aufgabe der Initiatorcaspasen ist so gesehen die Weiterleitung des apoptotischen Signals von der Membran zu den Effektorcaspasen. Die am Ende der Caspase-Kaskade angeordneten Effektorcaspasen weisen typischerweise eine kurze Prodomäne auf. Sie bedürfen keiner Rekrutierungsmodule zur Aktivierung, sondern werden direkt durch andere Caspasen, die Initiatorcaspasen, aktiviert (Wang, Miura et al. 1998; Salvesen and Dixit 1999). Die Aufgabe der Effektorcaspasen ist einerseits die Weiterleitung des proapoptotischen Signales in den Zellkern und andererseits die Interaktion mit ihren Caspase-Substraten, wodurch die Endphase des apoptotischen Prozesses eingeleitet wird.

2.2.3 Aktivierung der Caspasen

Für alle bis heute bekannten Caspasen ist beschrieben, dass sie als inaktive Vorstufen, sogenannte Zymogene synthetisiert werden. In der Zelle liegen die Zymogene der Initiatorcaspasen meist als Monomere, die der Effektorcaspasen als Dimere vor (Boatright, Renatus et al. 2003). Diese Zymogene bestehen aus drei Untereinheiten: der N-terminalen Prodomäne, einer großen Untereinheit mit dem aktiven Cystein in dem konservierten QACXG-Motiv und einer C-terminalen kleinen Einheit (Hengartner 2000). Wie alle Caspasen wird Caspase-1 durch Abspaltung der N-terminalen Prodomäne und proteolytischer Spaltung in die Untereinheiten p10 und p20 aktiviert (siehe Abb. 3). Bei der Prozessierung entsteht zunächst ein Intermediat mittlerer Aktivität und schließlich die enzymatisch aktiven p10/p20 Homodimere, bzw. Heterotetramere (Wilson, Black et al. 1994; Gu, Wu et al. 1995; Yamin, Ayala et al. 1996). Durch die Zusammenlagerung der p10 mit der p20 Untereinheit entsteht das aktive Zentrum der Caspase-1, mit dem Histidin (His237) der p20, und dem Cystein (Cys285) der p10 Untereinheit (Chang and

Yang 2000) (Abb. 3). Durch die räumliche Nähe des Histidins wird die Aktivität des Cysteins für den nucleophilen Angriff erhöht.

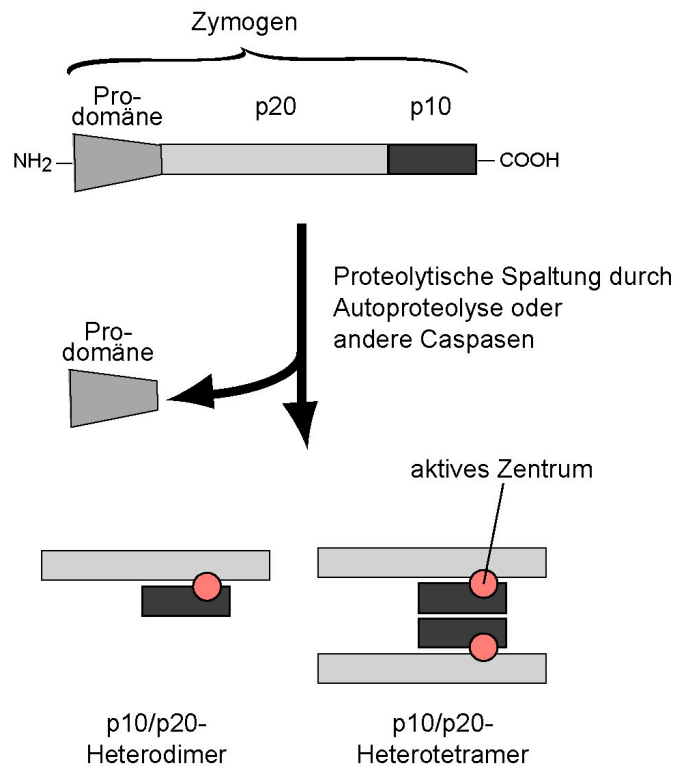


Abbildung 3: Proteolytische Aktivierung der Caspasen. Die proteolytische Spaltung der inaktiven Proform der Caspase (Zymogen) überführt diese, nach Abspaltung der N-terminalen Prodomäne, in ihre aktiven Heterodimere, bzw. Heterotetramere.

Für die Aktivierung selbst sind zwei grundlegende Mechanismen einer Caspase-Aktivierung beschrieben (Nicholson 1999; Hengartner 2000):

1) Die autokatalytische Aktivierung einer Caspase durch Rekrutierung von Cofaktoren in einem Komplex.

Diese Form der Aktivierung ist charakteristisch für die Initiatorcaspasen, beispielsweise die Aktivierung der Caspase-9 im Apoptosom oder die Aktivierung der Caspase-8 im RISC. Durch die Bindung der Caspase in dem Komplex wird eine Konformationsänderung induziert, die die autokatalytische Aktivierung zur Folge hat. Das Model der Proximitäts-induzierten autokatalytische Aktivierung schlägt in diesem Zusammenhang vor, dass die autoproteolytische Spaltung der Procaspase durch Dimerisierung, nach Anlagerung eines zweiten Zymogenmoleküls in unmittelbarer Nähe induziert wird (Muzio, Stockwell et al. 1998; Srinivasula, Ahmad et al. 1998; Chang, Xing et al. 2003). Für die Initiatorcaspasen, speziell die Caspase-9 ist ferner beschrieben,

dass sie für ihre Aktivierung nicht zwingend in ihre Untereinheiten prozessiert werden müssen (Stennicke, Deveraux et al. 1999; Boatright, Renatus et al. 2003).

Auch für Caspase-1 ist die sogenannte Rekrutierungs-Aktivierung beschrieben. Die autokatalytische Aktivierung der Caspase-1 und die Spaltung von pro-IL1 β erfolgen in dem erst kürzlich identifizierten sogenannten Komplex Inflammasome. Dieser besteht aus den beiden Adaptorproteinen ASC (apoptosis-associated speck-like protein) und NALP1 (gehört zur Familie der NBS, nucleotide-binding site family), der Caspase-1 und vermutlich der Caspase-5 (Martinon and Tschopp 2004; Martinon and Tschopp 2007). Das zweiteilige Adaptorprotein ASC weist C-terminal eine CARD-Domäne und N-terminal eine Interaktionsdomäne zu NAPL1 (NACHT, Leucine-rich-repeat and PYD containing protein), die PYD-Domäne (PYD, Pyrin Domäne) auf. Über die Caspasen-Interaktions-Domäne CARD spielt ASC bei der Aktivierung proinflammatorischer Caspasen eine zentrale Rolle. NALP1 gehört zur Familie der NBS-Familie (nucleotide binding site), die ebenfalls bei der Aktivierung von Caspasen und der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B beteiligt sind. Für Caspase-1 ist bekannt, dass das nach Abspaltung der Prodomäne entstehende Intermediat selbst die autokatalytische Prozessierung der Caspase-1 induziert, es weist jedoch keine Zytokin-Prozessierungs Aktivität auf.

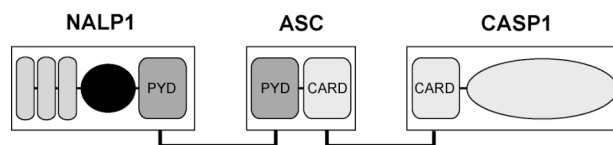


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Caspase-1 aktivierenden Inflammasoms. Durch das Adaptermolekül ASC wird Caspase-1 im Inflammasom rekrutiert und aktiviert. Das Adapterprotein ASC besteht hierbei aus einer CARD-Domäne zur Interaktion mit der Caspase und einer PYD-Domäne, über die sie mit dem NALP-Protein interagiert. (Modifiziert aus Martinon und Tschopp 2007)

2) Die Transaktivierung durch andere Caspasen.

Diese Art der Aktivierung ist charakteristisch für die Transaktivierung der Effektorcaspasen durch die Initiatorcaspasen. Aus diesem Grund weisen die Zymogene der Effektorcaspasen lediglich kurze, keine Interaktionsdomäne enthaltende Prodomänen auf (Aktivierung der Caspase-3, 7, 6 durch Caspase-8,-9). Die Aktivierungs-Schnittstelle der Effektorcaspasen stimmt hierbei mit der Substratspezifität der entsprechenden Initiatorcaspase überein.

3 Die apoptotische Signaltransduktion

Bis heute haben sich zur Induktion der Apoptose im Wesentlichen zwei Caspasen-abhängige Signaltransduktionswege herauskristallisiert (Gustafsson and Gottlieb 2003). Man unterscheidet den Todesrezeptor-vermittelten (extrinsisch, death receptor pathway) und den Rezeptor-unabhängigen, mitochondrialen (intrinsisch, mitochondrial pathway) Signaltransduktionsweg (siehe Abb. 5). Die Aktivierung jedes einzelnen der beiden Signalwege mündet über die Aktivierung der zugehörigen Initiatorcaspasen in einer gemeinsamen Endstrecke, der Aktivierung der Effektorcaspasen (Nunez, Benedict et al. 1998; Nhan, Liles et al. 2006). Durch die Effektorcaspasen werden sogenannte Caspase-Substrate gespalten, was in der Summe zu dem für Apoptose charakteristischen Phänotyp der Zelle führt. Beispielsweise induziert die Aktivierung der DNase CAD, durch Degradierung ihres Inhibitors ICAD durch Caspase-3, die bei apoptotischem Zelltod charakteristische DNA-Fragmentierung.

Abgesehen von diesen beiden Signalwegen sind mittlerweile auch Caspasen-unabhängige Apoptose-induzierende Signaltransduktionswege beschrieben. Das bekannteste Beispiel hierfür ist das proapoptotische Protein AIF (apoptosis inducing factor). Nach Freisetzung von AIF aus dem mitochondrialen Intermembranraum erfolgt seine Translokation in den Nukleus, wo es Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung induziert (Susin, Lorenzo et al. 1999; Nian, Lee et al. 2004). Ferner sind in der Literatur die ebenfalls mitochondrial freigesetzte Nuklease Endo G und die Serinprotease Omi beschrieben (Regula and Kirshenbaum 2005). Da die Caspasen-unabhängigen Signalwege nicht im Fokus dieser Arbeit stehen sollen, wird im Folgenden auf diese nicht weiter eingegangen.

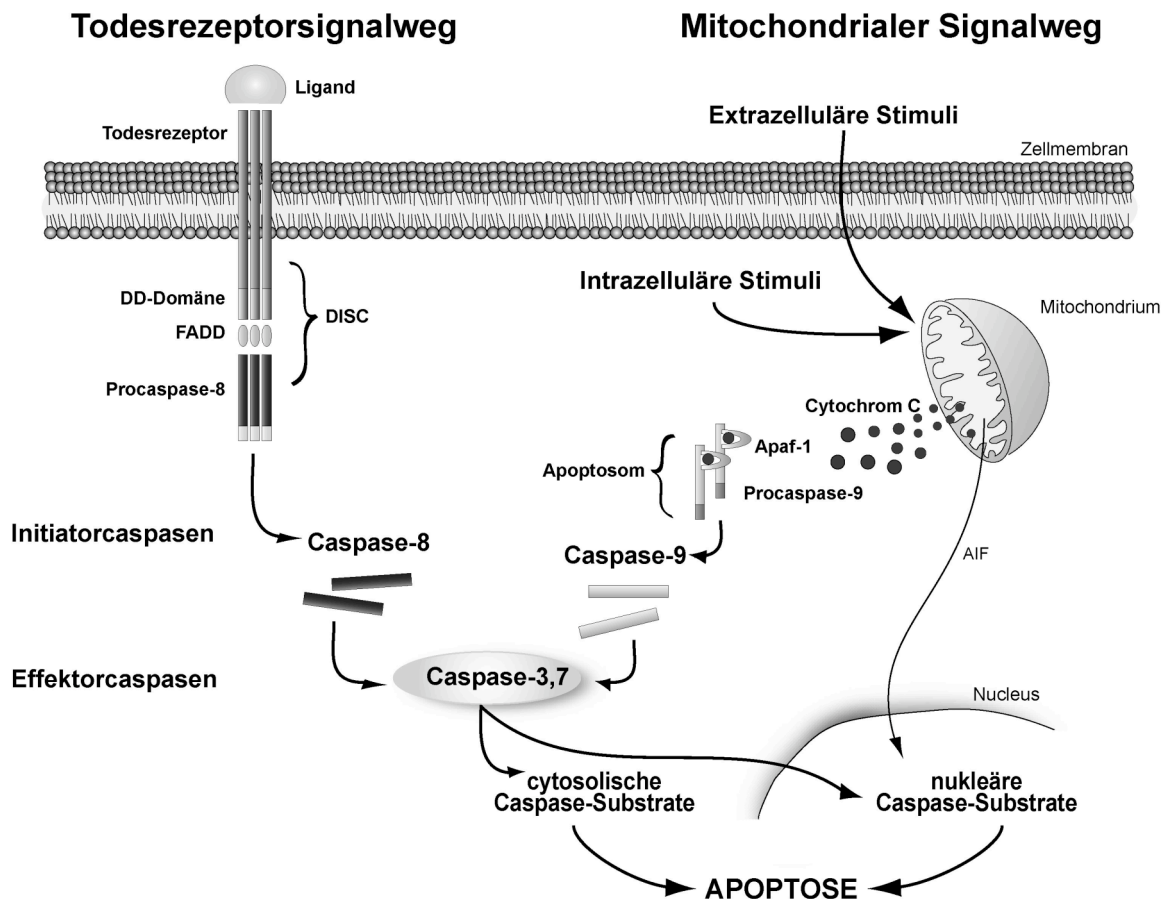


Abbildung 5 : Die Caspasen-vermittelte apoptotische Signaltransduktion. Apoptose kann extrinsisch über sogenannte Todesrezeptoren, oder intrinsisch über die Mitochondrien induziert werden. Der extrinsische Signalweg ist durch eine dem Todesrezeptor nachgeschaltete Aktivierung der Caspase-8 im DISC-Komplex charakterisiert. Die Induktion mitochondrialer Apoptose erfolgt nach Cytochrom c-Freisetzung durch Aktivierung der Caspase-9 im Apoptosom. Der extrinsische und intrinsische Signalweg konvergieren in einer Aktivierung der Effektorcaspasen. Diese leiten dann durch Spaltung der Caspase-Substrate die Endphase der Apoptose ein.

3.1 Todesrezeptor-vermittelte Apoptose (extrinsischer Signalweg)

Die Aktivierung der Caspase-Kaskade kann über eine Aktivierung sogenannter Todesrezeptoren initiiert werden. Die Todesrezeptoren gehören zu den Rezeptorfamilien der Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF) (Budihardjo, Oliver et al. 1999). Das bekannteste Beispiel für ein solches Todesrezeptor/Todesliganden-Paar ist die Bindung von Fas-Ligand (FasL) an den Fas-Rezeptor (CD95). Weitere Liganden sind das Zytokin $TNF\alpha$, TRAIL und Apo-L (Kunapuli, Rosanio et al. 2006). Bislang sind sechs Mitglieder der Todesrezeptorfamilie bekannt (Engels et al., 2001). Sowohl die Liganden als auch die Rezeptoren zeichnen sich durch eine hohe strukturelle Homologie untereinander aus. Die Bindung des Liganden an den Todesrezeptor führt zu einer Trimerisierung des Rezeptors und leitet damit die Bildung des sogenannten Todessignal-Komplexes (DISC, Death Inducing Signaling Complex) ein. Die Todesrezeptoren besitzen in ihrem zytoplasmatischen Teil eine Todesdomäne (DD,

death domain), die für die intrazelluläre Transduktion des apoptotischen Signales unerlässlich ist. Über diese DD wird das Adaptermolekül FADD (Fas-Associated Death Domain) rekrutiert (Chinnaiyan, O'Rourke et al. 1995). FADD-Adaptermoleküle besitzen ihrerseits neben der DD eine DED (Death Effector Domain), die sich mit der analogen Domäne von Procaspase-8 verbindet (Fernandes-Alnemri, Armstrong et al. 1996; Muzio, Chinnaiyan et al. 1996). Die Interaktion zwischen der DD der Todesrezeptors, dem Adaptermolekül FADD und Procaspase-8 führt zur Ausbildung des DISC-Komplexes (Kischkel, Hellbardt et al. 1995; Muzio, Chinnaiyan et al. 1996; Srinivasula, Ahmad et al. 1996). Im DISC erfolgt die autokatalytische Aktivierung der Caspase-8 (Boatright and Salvesen 2003; Gustafsson and Gottlieb 2003).

3.2 Mitochondrial vermittelte Apoptose (intrinsischer Signalweg)

Die Mitochondrien dienen in der Zelle im Rahmen der Atmungskette als Produktionsstätte für ATP. In den letzten Jahrzehnten wurde zusätzlich eine zentrale Rolle der Mitochondrien für die apoptotische Signaltransduktion beschrieben (Kroemer, Dallaporta et al. 1998; Jiang and Wang 2004). Die Auslöser für die mitochondrial vermittelte Apoptose sind primär intrinsische Induktoren wie beispielsweise DNA-Schäden, Stress-induzierte Moleküle, Wachstumsfaktoren, Caspasen und eine Erhöhung der mitochondrialen Kalziumkonzentration. Aber auch extrazelluläre Stimuli, wie Chemotherapeutika und UV-Strahlung können indirekt mitochondrial vermittelte Apoptose induzieren. Die apoptotischen Stimuli führen zu einer Aktivierung der proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie, genauer zu einer Bid-vermittelten Aktivierung von Bax und Bak (Oltvai, Milliman et al. 1993; Wang, Yin et al. 1996) und folglich deren Translokation an die Mitochondrienmembran (Wei, Lindsten et al. 2000; Kunapuli, Rosanio et al. 2006). Der initiale Schritt für eine Aktivierung der mitochondrialen Signalkaskade ist eine Unterbrechung des mitochondrialen Transmembranpotentials (Zamzami, Marchetti et al. 1995). Dies führt zu einer Zunahme der mitochondrialen Membranpermeabilität und ermöglicht die Freisetzung von proapoptotischen Proteinen in das Zytosol. Von besonderer Bedeutung sind hier die Procaspase-9 und Cytochrom c (bekannt als Bestandteil der Atmungskette im Mitochondrium). Auf welchem Mechanismus genau die Freisetzung der mitochondrialen Proteine erfolgt wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Crow, Mani et al. 2004; Regula and Kirshenbaum 2005). Sowohl die Ausbildung von mitochondrialen Membranporen durch Integration der proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie, Bax und Bak, in die äußere Mitochondrienmembran oder deren Interaktion mit Spannungs-abhängigen Ionenkanälen wird in der Literatur diskutiert (Hengartner 2000; Wei, Zong et al. 2001; Ott, Robertson et al. 2002). Ein weiterer Mechanismus schlägt die direkte

Öffnung von Porenkanälen in der Mitochondrienmembran (mPTP, mitochondrial permeability transition pore) vor, was zu einem Anschwellen der Mitochondrien und folglich zu Rupturen in der äußeren Mitochondrienmembran führt (Jacotot, Costantini et al. 1999; Martinou and Green 2001). Die Bindung von Cytochrom c und ATP an Apaf-1 (apoptotic protease activation factor 1) verursacht eine Konformationsänderung von Apaf-1, wodurch dessen Interaktionsdomäne CARD (Caspase-Rekrutierungs-Domäne) zugänglich wird. An diese bindet dann die Procaspase-9. Der Komplex aus Cytochrom c, Apaf-1, ATP und Procaspase-9 wird Apoptosom genannt (Li, Nijhawan et al. 1997; Saleh, Srinivasula et al. 1999; Zou, Li et al. 1999). Die Bildung des Apoptosoms ist die Voraussetzung für die energieverbrauchende, autokatalytische Aktivierung der Caspase-9 (Liu, Kim et al. 1996; Zou, Li et al. 1999; Jiang and Wang 2000). Die aktive Caspase-9 wird aus dem Komplex freigesetzt und aktiviert, analog zur Caspase-8, als Initiatorcaspase die nachfolgenden Effektorcaspasen.

Neben der mitochondrial vermittelten Apoptoseinduktion gibt es ferner Hinweise auf eine Rolle des Endoplasmatischen Retikulums (ER) bei der Induktion von Apoptose. Es ist bekannt, dass die proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie, Bax und Bak durch Translokation an die ER-Membran zu einer Entleerung der Ca^{2+} -Speicher führen können und die im ER lokalisierte Caspase-12 aktivieren (Nakagawa, Zhu et al. 2000; Rao, Hermel et al. 2001; Scorrano, Oakes et al. 2003; Zong, Li et al. 2003).

Die Effektorcaspase-7 dient insbesondere der Signalverstärkung sowohl auf Ebene der Caspase-Kaskade (aktiviert ihrerseits Caspase-9) als auch auf Ebene der Caspase-Substrate. Ebenso kann die Caspase-3 selbst durch Aktivierung der Caspasen-2,-6,-8, -9 und -10 zur Signalverstärkung beitragen (Boatright and Salvesen 2003; Fischer, Janicke et al. 2003; Gustafsson and Gottlieb 2003). Auch die zwischen dem intrinsischen und extrinsischen Signalweg möglichen Interaktionen (im Sinne eines crosstalks) dienen der proapoptotischen Signalverstärkung (Dragovich, Rudin et al. 1998). So spaltet beispielsweise die Caspase-8 das zytosolische Protein Bid (BH3 interacting domain death agonist). Das entstehende C-terminale Spaltprodukt tBid (truncated Bid) vermittelt nach Translokation an die Mitochondrien selbst die Freisetzung von proapoptotischen Faktoren und aktiviert ferner das proapoptotische Bax und Bak (Li, Zhu et al. 1998; Yin 2006). Bid dient somit als zentraler intrazellulärer Sensor für apoptotische Signale (Esposti 2002; Danial and Korsmeyer 2004), und kann neben apoptotischen Stimuli ferner durch Caspase-8 (Quervernetzung der Signalwege) und Caspase-3 (Signalverstärkung) aktiviert werden (Crow, Mani et al. 2004).

3.3 Endogene Regulationsmechanismen der Apoptose

Die endogene Regulation der Apoptose besteht aus einem komplexen und vielschichtigen System, das nun an ausgewählten Beispielen illustriert werden soll.

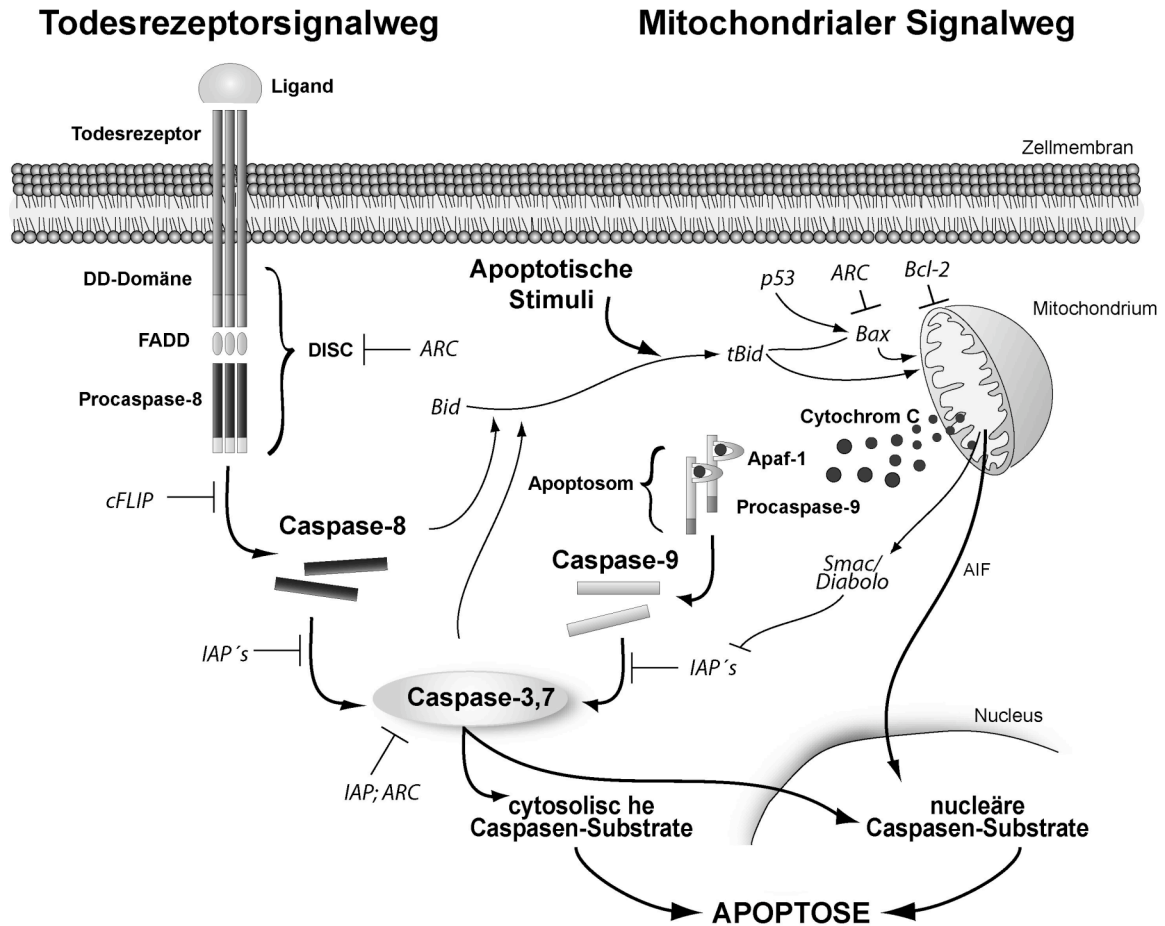


Abbildung 6: Endogene Regulationsmechanismen und Quervernetzung der apoptotischen Signaltransduktionswege. Die Proteinen der Bcl-2 Familie regulieren spezifisch den intrinsischen Signalweg, eine Inhibition des extrinsischen Signalweges erfolgt durch cFLIP. Durch die Familie der IAPs und durch ARC können beide Signalwege in ihrer Aktivierung inhibiert werden. p53 und Smac/Diablo sind Aktivatoren der apoptotischen Signaltransduktion.

Von zentraler Bedeutung für die Regulation des mitochondrialen Signaltransduktionswegs ist die Familie der Bcl-2 Proteine (Dragovich, Rudin et al. 1998). Die Bcl-2 Proteine wurden erstmals in einem B-Zell-Lymphom (*b-cell lymphoma*) isoliert (Vaux, Cory et al. 1988). Die Familie der Bcl-2 Proteine weist 15 Mitglieder auf, wobei diese nach ihrer proapoptischen (z.B. Bid, Bax, Bad) bzw. antiapoptischen (z.B. Bcl-2, Bcl-xl, A1) Wirkung eingeteilt werden. Die meisten Mitglieder der Bcl-2-Familie sind ubiquitär exprimiert und überwiegend an der äußeren Membran des Mitochondriums, ihrem Hauptwirkungsort, lokalisiert. Allen Mitgliedern der Bcl-2-Familie ist gemein, dass sie mindestens eine von vier zu Bcl-2 homologen Domänen (BH1-BH4) besitzen. Über diese Domänen können die Mitglieder der Bcl-2-Familie miteinander interagieren, ihre

funktionell aktiven Homo- und Heterodimere bilden und sich gegenseitig in ihrer Funktion beeinflussen. Für Bcl-2 ist bekannt, dass die Ausbildung von Homodimeren essentiell für seine anti-apoptotische Wirkung ist (Yin, Oltvai et al. 1994). Es wird angenommen, dass die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie der Steuerung der Aktivität der proapoptotischen Bcl-2 Proteine dienen. Durch Bindung an Bid schützt Bcl-2 beispielsweise vor dessen Aktivierung und der nachgeschalteten Freisetzung proapoptotischer Faktoren (Kroemer 1997; Cheng, Wei et al. 2001). Des Weiteren soll Bcl-2 durch Bindung an Cytochrom c oder Apaf-1 die Aktivierung der Caspase-9 inhibieren. Ferner können die Proteine der Bcl-2-Familie über verschiedene Cofaktoren mit Caspasen interagieren. Im Gegenzug kann ihre Aktivität auch durch Phosphorylierungen oder Spaltung durch Caspasen beeinflusst werden (Adams and Cory 1998).

Eine effektive Inhibitionsstrategie der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose ist die Rekrutierung des Proteins cFLIP (cellular FLICE-inhibitory protein, FLICE = Caspase-8) an den DISC-Komplex. cFLIP besitzt eine Struktur, die vergleichbar mit der von Procaspase-8 ist und weist ebenfalls DED-Motive auf. Im Gegensatz zu Caspase-8 ist bei cFLIP im aktiven Zentrum das Cystein durch ein Tyrosin ersetzt. Nach der Rekrutierung von Procaspase-8 und cFLIP in den DISC werden beide Proteine zwar autokatalytisch gespalten, es entstehen jedoch zwei stabile inaktive Intermediate die im DISC gebunden bleiben. Infolgedessen ist die Anlagerung und Aktivierung weiterer Procaspase-8 Moleküle durch das falsche Substrat cFLIP unterbunden (Irmiler, Thome et al. 1997).

ARC (apoptosis repressor with a CARD) ist ein kardial stark exprimiertes Protein das sowohl als Inhibitor des extrinsischen als auch den intrinsischen Signaltransduktionswegesweg fungiert. Abhängig von seiner CARD-Domäne kann ARC die Aktivierung der Caspase-8 (extrinsischer Signalweg) (Koseki, Inohara et al. 1998; Ekhterae, Lin et al. 1999; Neuss, Monticone et al. 2001; Gustafsson, Tsai et al. 2004) verhindern. Außerdem transloziert ARC durch apoptische Stimuli an die Mitochondrien wo es seinen protektiven Effekt speziell durch den Schutz der Mitochondrien ausübt. ARC kann das proapoptotische Bax binden und somit die nachfolgende Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien unterdrücken. Ferner inhibiert ARC die Aktivierung der Effektorcaspase-3. (Ekhterae, Lin et al. 1999; Neuss, Monticone et al. 2001; Li, Li et al. 2002; Gustafsson, Tsai et al. 2004; Nam, Mani et al. 2004; Donath, Li et al. 2006).

Durch die Proteinfamilie der IAP (inhibitor of apoptosis proteins) kann die apoptotische Signaltransduktion primär auf Ebene der Effektorcaspasen gehemmt werden. Zu ihr zählen Caspase-Inhibitoren wie X-IAP, c-IAP und Survivin. Die IAPs wirken als

sogenannte falsche Caspase-Substrate. Nach Bindung an die Effektorcaspasen-3 und -7 bleibt deren proteolytische Aktivierung aus, wodurch die Caspase inaktiviert ist (Deveraux and Reed 1999; Liston, Fong et al. 2003). Im Zuge der apoptotischen Freisetzung von Cytochrom c transloziert ebenfalls das proapoptotische Protein Smac/DIABOLO aus dem Mitochondrium in das Zytosol (Du, Fang et al. 2000; Verhagen, Ekert et al. 2000). Smac/Diablo neutralisiert die IAP induzierte Caspasen-Inhibition und entfaltet so seine proapoptotische Wirkung (Srinivasula, Hegde et al. 2001)

Ein Regulator der Apoptose im Sinne eines Aktivators ist das Tumorsuppressorgen p53 (Polyak, Xia et al. 1997; Dragovich, Rudin et al. 1998). Als ein durch DNA-Schäden aktivierter Transkriptionsfaktor induziert p53 die Expression einer Reihe von proapoptotischen Genen (z.B. das proapoptotische Bcl-2, Bax) deren Produkte letztlich zur Schädigung der Mitochondrien und zu Apoptose führen.

II Herzinsuffizienz

1 Herzinsuffizienz als klinisches Syndrom

1.1 Definition und Klassifikation der Herzinsuffizienz

Bei der Herzinsuffizienz handelt es sich nicht um eine distinkte Erkrankung, sondern der Begriff Herzinsuffizienz steht für ein klinisches Syndrom (Denolin, Kuhn et al. 1983; Weil and Schunkert 2006). Von der Weltgesundheitsorganisation (WHO, 1995) wurde daher das Syndrom Herzinsuffizienz sowohl pathophysiologisch als auch klinisch definiert. Hierbei berücksichtigt die klinische Definition primär die typischen, äußerlich erkennbaren Symptome einer Herzinsuffizienz: „Herzinsuffizienz ist das Syndrom der Luftnot und der Erschöpfbarkeit, das mit einer nachweisbaren Herzerkrankung assoziiert ist. Die klinische Diagnose erfordert also das Vorliegen einer signifikanten Herzerkrankung und dadurch bedingte typische Symptome.“ Die pathophysiologische Definition der Herzinsuffizienz beschreibt die Veränderungen der Physiologie während einer Herzinsuffizienz: „Herzinsuffizienz ist die Unfähigkeit des Herzens, Blut und daher Sauerstoff und Substrate in ausreichender Menge in die Körperperipherie zu transportieren. Daraus entstehen charakteristische neurohumorale, renale und adrenerge Symptome, die mit der schlechten Prognose der Herzinsuffizienz assoziiert sind.“

Die klinischen Symptome einer Herzinsuffizienz sind unspezifisch, sie weisen eine große Bandbreite mit hoher Variabilität auf. Nahezu die Hälfte aller Patienten mit Herzmuskelschwäche zeigen keine der Symptome, die üblicherweise mit einer Herzmuskelschwäche assoziiert sind. Diese lassen sich wie folgt zusammenfassen: Dyspnoe (Luftnot durch Lungenstauung), Zyanose (Blaufärbung der Haut), Müdigkeit, Herzrasen und Flüssigkeitsretention (Wassereinlagerungen: Beinödeme, Gewichtszunahme). Pathophysiologisch ist das wichtigste Symptom der Herzinsuffizienz die mangelhafte Durchblutung peripherer Organe, zusammen mit einem erniedrigten Herzzeitvolumen und systemischer Hypotonie. In diesem Zusammenhang spricht man auch von einem Vorwärtsversagen des Herzens. Die reduzierte Förderleistung des insuffizienten linken Ventrikels führt, über eine Minderperfusion des von ihm abhängigen Kreislaufabschnittes hinaus, auch zu Störungen im vorgeschalteten venösen Gefäßsystem, was mit dem Begriff Rückwärtsversagen beschrieben wird (Ross 1983). Aufgrund der Dominanz des linken Ventrikels für die Aufrechterhaltung des Kreislaufs steht die Beurteilung seiner Funktion im Vordergrund.

Anhand der klinischen Symptome, der sich daraus ableitenden Leistungsfähigkeit des Patienten und wichtiger anamnestischer Kriterien wurde von der New York Heart

Association (NYHA) eine Klassifikation der Herzinsuffizienz nach steigendem Schweregrad definiert. Diese Einteilung reicht von einer leichten Herzinsuffizienz ohne körperliche Einschränkung (Klasse I) bis hin zu einer schweren Herzinsuffizienz mit Beschwerden bereits in Ruhe (Klasse IV).

NYHA-Stadium	Beschwerden
I	keine Luftnot normale Leistungsfähigkeit bei adäquater Belastung kardiologische Untersuchungen zeigen Herzschwäche an
II	keine Beschwerden in Ruhe leichte Luftnot bei normaler Belastung eingeschränkte Leistungsfähigkeit
III	keine Beschwerden in Ruhe starke Luftnot und Erschöpfung bei normaler Belastung erheblich eingeschränkte Leistungsfähigkeit
IV	Luftnot in Ruhe jede körperliche Belastung bereitet Beschwerden meist Bettlägerigkeit

Tabelle 3: Revidierte NYHA-Klassifikation bei Herzinsuffizienz.

1.2 Ursachen und Epidemiologie der Herzinsuffizienz

Koronare Herzerkrankung, Hypertonie und Myokardinfarkt, aber auch Diabetes mellitus sind häufige Erkrankungen, die zu dem Syndrom Herzmuskelschwäche führen können. In der Framingham Studie wurde mit 49% der betroffenen Patienten die Hypertonie als führende Ursache einer Herzinsuffizienz identifiziert (Kannel and Larson 1993). Die neueren großen Herzinsuffizienz-Studien (SOLVD 1991; Vantrimpont, Rouleau et al. 1998) weisen jedoch auch besonders auf die koronare Herzkrankheit als primären Grund für das Entstehen einer Herzinsuffizienz hin. Herzmuskelschwäche ist als ein progressives, klinisches Syndrom bzw. als das Endresultat einer Reihe von kardialen und extrakardialen Störungen zu verstehen.

Die Herzinsuffizienz zählt zu den häufigsten Erkrankungen mit zunehmender Inzidenz und ist in industrialisierten Ländern eine der häufigsten Todesursachen (Cowie, Mosterd et al. 1997; AHA 2005). Die chronische Herzinsuffizienz ist bezüglich ihrer Inzidenz und ihrer schlechten Prognose, besonders bei schwerer Herzmuskelschwäche (NYHA IV), mit der von malignen Erkrankungen vergleichbar (Ho, Pinsky et al. 1993; Towbin and Bowles 2002) Die Häufigkeit einer Herzinsuffizienz nimmt mit dem Alter zu und beträgt bei den 50-jährigen 1-2 Fälle pro Jahr und 1000 Patienten, bei den 70-jährigen bereits 10 Fälle pro Jahr und 1000 Patienten (Pichler 1999). Obwohl eine Vielzahl neuer

medikamentöser Behandlungsstrategien in den letzten Jahren etabliert wurde, liegt die 5-Jahres Mortalitätsrate bei Herzinsuffizienz noch immer bei 50%.

2 Therapie der Herzinsuffizienz

Die bisher verfügbaren Therapieoptionen dienen der symptomatischen Verbesserung der Krankheit und verlangsamen die Progression der Erkrankung, eine kausale Therapie sind sie nicht. Nach den Leitlinien der Kommission für Klinische Kardiologie (Hoppe and Erdmann 2001; Hoppe, Bohm et al. 2005) umfasst die aktuelle Herzinsuffizienz-Therapie den Einsatz von ACE-Hemmern, Aldosteron-Antagonisten, Diuretika, Herzglykoside und β -Rezeptor-Antagonisten. Diese Therapeutika dienen in ihrem Zusammenspiel der neurohumoralen Blockade, der Senkung von Vor- und Nachlast und der Steigerung der Kontraktionskraft.

ACE-Hemmer sind potente Wirkstoffe die die Vor- und Nachlast des Herzens reduzieren. Ihr Wirkmechanismus besteht in der kompetitiven Hemmung des Angiotensin-Konversions-Enzymes (ACE), das die Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II katalysiert (Wolny, Clozel et al. 1997). Dies bewirkt sowohl eine Abschwächung der Wirkung des Vasokonstriktors Angiotensin II als auch eine Verstärkung der Wirkung des Vasodilatators Bradykinin. In der Summe ergibt sich eine Steigerung der kardialen Auswurfraction, ohne einen Anstieg der Herzfrequenz. Darüber hinaus kann durch die Unterdrückung der Angiotensin II-Synthese die, über das Baroreflex-System vermittelte reflektorische Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) vermindert werden. Für die Klasse der ACE-Hemmer ist in zahlreichen Studien gezeigt, dass sie nicht nur die Symptomatik verbessern, sondern auch zu einer Verbesserung der Prognose führen (CONSENSUS 1987; SOLVD 1991; Pfeffer, Braunwald et al. 1992). Da ACE-Inhibitoren die Angiotensin- und Aldosteronsynthese nicht komplett verhindern, wird die Gabe von ACE-Inhibitoren meist durch niedrig dosierte Aldosteron-Antagonisten komplettiert.

Der Einsatz von Diuretika führt über eine vermehrte renale Elektrolyt- und Wasserausscheidung durch Reduktion des zirkulierenden Blutvolumens (Vorlastsenkung) und des arteriellen Mitteldrucks (Nachlastsenkung) unmittelbar zu einer Entlastung des Herzens. Darüber hinaus kann durch die Gabe von Diuretika eine Stauungssymptomatik der Lunge und der Körperperipherien verhindert werden. Herzglykoside bewirken indirekt, über die spezifische Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase und den nachgeschalteten $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels und üben damit einen positiv inotropen Effekt auf den Herzmuskel aus. Durch die resultierende erhöhte Pumpleistung werden reflektorisch Sympathikus-aktivierende

Stimuli unterdrückt, was zu einer Reduktion der Herzfrequenz sowie der Vor- und Nachlast führt. Digitalis-Präparate verbessern über diesen Mechanismus zwar die klinischen Symptome, eine Prognoseverbesserung hinsichtlich der Lebenserwartung ist nach aktueller Datenlage nicht zu erwarten (The Digitalis Investigation Group 1997).

Die Gabe von β -Rezeptorblockern war in der Herzinsuffizienz-Therapie lange umstritten. Schließlich konnte belegt werden, dass für Patienten mit fortgeschrittener Herzmuskelschwäche eine additive, einschleichende Gabe von β -Rezeptorblockern weitgehend sicher ist und entscheidend zur Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion beiträgt. Die pharmokologische Wirkung der β -Rezeptorblocker beruht auf ihrer kompetitiv antagonistischen Wirkung an β -adrenergen Rezeptoren, wodurch die Auswirkungen der Sympathikus-Aktivierung bei Herzinsuffizienz reduziert werden (Hall, Cigarroa et al. 1995; Packer, Bristow et al. 1996; Abraham 2000). Groß angelegte Studien haben in den letzten Jahren gezeigt, dass besonders die lipophilen, selektiv an den β_1 -adrenergen Rezeptor bindenden Blocker Bisoprolol und Metoprolol sowie das unselektive Carvedilol zu einer deutlichen Reduktion der Mortalität führen (Waagstein, Bristow et al. 1993; Packer, Bristow et al. 1996; CIBIS-II 1999; MERIT-HF 1999).

3 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Eine Herzmuskelschwäche kann durch einen konkreten Auslöser (beispielsweise einen Herzinfarkt) abrupt einsetzen, oder durch eine schleichende Verminderung der myokardialen Kontraktilität, beispielsweise aufgrund einer unphysiologischen Erhöhung der Vorlast (Volumenbelastung) oder der Nachlast (Druckbelastung), einen langsamen Beginn nehmen. Die verminderte Leistungsfähigkeit des Herzens aktiviert im gesamten Organismus eine Vielzahl von Kompensationsmechanismen, mit dem Ziel, eine ausreichende Pumpfunktion zur Perfusion lebenswichtiger Organe aufrecht zu erhalten. Dadurch bleibt der Patient zunächst asymptomatisch. Die Kompensationsmechanismen sind primär neurohumoralen, aber auch struktureller Natur.

3.1 Neurohumorale Kompensationsmechanismen

Bereits in einem frühen Stadium der Entwicklung einer Herzinsuffizienz kommt es zu einer Erhöhung der basalen Sympathikusaktivität (Bristow 1984; Brodde, Michel et al. 1995; Eisenhofer, Friberg et al. 1996; Francis 2001; Lohse, Engelhardt et al. 2003). Kurzfristig stellt die Aktivierung des Sympathikus einen physiologisch sinnvollen Mechanismus zur Zunahme der Kontraktilität und der Herzfrequenz dar. Diese positiv ino-, chrono- und dromotropen Wirkungen des sympatho-adrenergen Systems sind durch den Anstieg an intrazellulärem Ca^{2+} induziert (Cohn 1990). Langfristig trägt die

dauerhafte Überstimulation der kardiovaskulären sympathischen Rezeptoren, beispielsweise durch Induktion von Kardiomyozytenapoptose (Communal, Singh et al. 1998), zum Voranschreiten der Krankheit bei (Abraham 2000; Communal, Sumandea et al. 2002; Lohse, Engelhardt et al. 2003). Die verstärkte kardiale Expression des β_1 -adrenergen Rezeptors induziert im murinen Tiermodell klinisch manifeste Herzinsuffizienz, und ist so als etabliertes murines Herzinsuffizienzmodell in der Forschung akzeptiert (Engelhardt, Hein et al. 1999). Die Aktivierung des RAAS nimmt über die direkte Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes entscheidenden Einfluss auf den peripheren Widerstand und kann so akut eine hämodynamische Kompensation bewirken (Dzau, Colucci et al. 1981). Die chronische Aktivierung des RAAS führt über den konstant erhöhten peripheren Widerstand zu kardialer Hypertrophie. AngiotensinII kann ferner über eine Erhöhung der Noradrenalin-Ausschüttung eine weitere Aktivierung des Sympathikus induzieren und stellt somit einen zentralen Induktor für die Progression von Remodelingvorgängen dar. Die neurohumorale Aktivierung im insuffizienten Herz umfasst neben der Aktivierung des Sympathikus und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) eine Steigerung der Endothelin- und Vasopressin-Synthese (Hiroe, Hirata et al. 1991). Endothelin und Vasopressin induzieren primär über eine Vasokonstriktion eine Zunahme des peripheren Widerstandes, aber auch eine Druckzunahme im Pulmonalkreislauf. Durch die Aktivierung vasodilatierender Moleküle, wie den natriuretischen Peptiden ANF und BNP, Adrenomedullin, Bradykinin, Prostaglandinen und Stickstoffmonoxid (NO) kann der Vasokonstriktion und Wasserretention entgegengewirkt werden. Im Verlauf der Herzinsuffizienz kommt es jedoch langfristig zu einem Übergewicht der vasokonstringierenden und wasserretendierenden Systeme.

3.2 Mechanische Kompensation durch kardiales Remodeling

Neben der neurohumoralen Aktivierung können während der Entwicklung einer Herzinsuffizienz charakteristische makroskopische, mikroskopische und molekularbiologische Veränderungen im Herzmuskel beobachtet werden. Diese Veränderungen der Herzgeometrie und -funktion werden unter dem Begriff kardiales Remodeling zusammengefasst. Strukturelles und funktionelles Remodeling trägt entscheidend zum Voranschreiten einer Herzmuskelschwäche bei (Mann 1999; Mann and Taegtmeyer 2001; Gaballa and Goldman 2002).

3.2.1 Apoptose von Herzmuskelzellen

Bei der Entwicklung und Manifestation der Herzinsuffizienz spielt der apoptotische Zelltod von Herzmuskelzellen eine bedeutende Rolle (Narula, Haider et al. 1996;

Olivetti, Abbi et al. 1997). Im ischämischen, aber auch im nicht-ischämischen, jedoch überlasteten Myokard, ist eine deutlich erhöhte Kardiomyozytenapoptose im Vergleich zu der sehr geringen altersassoziierten Basalapoptose zu finden (Gottlieb, Burleson et al. 1994; Kajstura, Cheng et al. 1996). Die wesentlichen Ursachen für den apoptotischen Zelltod von Kardiomyozyten ist die Überbelastung der Herzmuskelzellen durch eine gesteigerte Wandspannung (Katz 1990; Cheng, Li et al. 1995). Ganz wesentlich tragen auch die bei Herzinsuffizienz erhöhten Katecholaminspiegel zur direkten Induktion von Kardiomyozytenapoptose bei. Der unmittelbar proapoptotische Effekt einer Stimulation mit Noradrenalin (Communal, Singh et al. 1998; Shizukuda, Buttrick et al. 1998; Singh, Communal et al. 2000) und Angiotensin II (Cigola, Kajstura et al. 1997) ist in der Literatur beschrieben. Adulte Kardiomyozyten sind terminal differenzierte Zellen, die ihre Fähigkeit zur mitotischen Zellteilung verloren haben (Pasumarthi and Field 2002). Da untergegangene Herzmuskelzellen somit nicht durch Teilung der verbleibenden kontraktile Kardiomyozyten ersetzt werden können, besitzt das adulte Herz primär keine Fähigkeit zur endogenen Regeneration. Kardiomyozytenapoptose im adulten Herzmuskel stellt infolgedessen einen pathologischen Vorgang dar. Herzmuskelzellen sind nicht nur mengenmäßig der Hauptbestandteil des Herzmuskels, sondern sie übernehmen als kontraktile Elemente des Herzmuskels auch die Grundsteuerung der Herzfunktion. Der Verlust der Herzmuskelzellen wirkt sich negativ auf die Herzfunktion aus. Für die verbleibenden Kardiomyozyten steigt die Wandspannung weiter an, was in der Summe zu einer Zunahme der Kardiomyozytenapoptose und zu einem fortschreitenden Remodeling im verbleibenden Myokard führt. Es wird reaktive Kardiomyozytenhypertrophie und Ersatzfibrosierung des Myokards induziert. Beide Vorgänge bewirken neben einer Verminderung der Kontraktilität eine reduzierte Kapillargefäßdichte. Durch die so bedingte Unterversorgung des Gewebes mit sauerstoffreichem Blut kann es zu lokalen Ischämien kommen, die die Herzfunktion weiter herabsetzen und Remodelingvorgänge weiter vorantreiben (Swynghedauw 1999).

3.2.2 Hypertrophes Wachstum von Herzmuskelzellen

Im insuffizienten Herz führt ein Anstieg des Drucks und des Diameters des linken Ventrikels, beispielsweise durch das Absterben von Kardiomyozyten durch die mechanische Dehnung des Myokardgewebes, zu einem Anstieg der Wandspannung (Katz 1990; Sadoshima, Jahn et al. 1992). Nach dem Laplace'schen Gesetz kann eine gesteigerte Wandspannung durch eine reaktive Zunahme der Wanddicke ausgeglichen werden (Katz 1994; Anversa, Kajstura et al. 1996; Weil and Schunkert 2006). Das Herzmuskelgewebe besteht, wie bereits erwähnt, aus terminal differenzierten,

postmitotischen Kardiomyozyten und zählt somit zum sogenannten Ruhegewebe (Pasumarthi and Field 2002). Dies impliziert, dass eine Zunahme der Wanddicke nur durch hypertrophes Wachstum einzelner Kardiomyozyten erreicht werden kann (Cohn, Ferrari et al. 2000). Hypertrophie ist definiert als das Wachstum von Geweben und Organen durch eine Zunahme des Zellvolumens bei konstanter Zellzahl. Hypertrophie grenzt sich damit gegenüber Hyperplasie ab, die als Größenzunahme eines Organs oder Gewebes durch Zellvermehrung definiert ist. Im Herz dient die Kardiomyozytenhypertrophie der Anpassung an physiologische Mehrbelastung oder pathologische Überbelastung. Die sogenannte reaktive Kardiomyozytenhypertrophie kann neben der Zunahme der Myokardmasse auch untergegangene Herzmuskelzellen räumlich ersetzen. Hypertrophie kann somit einerseits einen kompensatorischen Charakter aufweisen, eine bestehende Hypertrophie kann aber auch selbst zur Entstehung einer Herzinsuffizienz führen (Hunter and Chien 1999).

Die kontraktilen Elemente der Herzmuskelzellen bestehen aus Myofilamenten, diese wiederum aus den beiden Proteinen Aktin und Myosin. Durch die regelmäßige Anordnung dieser Myofilamente (Sarkomere) entsteht die charakteristische Querstreifung der Herzmuskelzellen. Bei Kardiomyozytenhypertrophie findet eine Vermehrung der kontraktilen Einheiten statt, die neugebildeten Sarkomere werden primär parallel geschaltet, was sich in einer Zunahme der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche (konzentrische Hypertrophie) widerspiegelt (Frey and Olson 2003). In hypertrophierten Herzmuskelzellen kann eine verstärkte Reorganisation der Sarkomere beobachtet werden (Huot, Houle et al. 1997; Aoki, Izumo et al. 1998).

Die konzentrische Myokardhypertrophie geht mit fortschreitendem Krankheitsverlauf meist in eine exzentrische Ventrikelhypertrophie mit Zunahme des linksventrikulären Diameters und reduzierter linksventrikulärer Wanddicke über (Mann 1999). Der Frank-Starling Mechanismus (Starling 1908) beschreibt den Zusammenhang zwischen der diastolischen Vordehnung des Myokards und der Kontraktilität (Kraftentwicklung) des Herzmuskels während der Systole. Diese Längen-Kraft-Beziehung trifft jedoch nur bis zu einem gewissen Dehnungsgrad der Sarkomere zu, bei massiv dilatierten Ventrikeln nimmt die Kontraktilität wieder ab. Infolgedessen ist der Frank-Starling Mechanismus im dilatierten Ventrikel bei chronischer Herzinsuffizienz abgeschwächt, was zur weiteren Reduktion der Herzkontraktilität beiträgt (Schwinger, Bohm et al. 1994; Weil and Schunkert 2006).

Durch Kardiomyozytenapoptose, -hypertrophie und Myokardfibrose bewirkt das Geweberemodeling einen Verlust der regelmäßigen und parallelen Anordnung der Kardiomyozyten im Myokardgewebe (Disarray). Durch diesen sogenannten disarray werden die wichtigen Zytoplasmabrücken zwischen den Zellen (gap junctions) gestört,

was sich ferner negativ auf die Erregungsausbreitung im Ventrikelmyokard auswirkt. (Swynghedauw 1999)

3.2.3 Veränderte Genexpression der Herzmuskelzellen

Während der Entwicklung einer Herzmuskelschwäche kommt es zu qualitativen und quantitativen Veränderungen bei der Genexpression wesentlicher kardialer Proteine (Izumo, Nadal-Ginard et al. 1988; Chien, Zhu et al. 1993). Die Freisetzung von Ca^{2+} aus den longitudinalen Tubuli des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) und die nachfolgende Sequestrierung des zytosolischen Ca^{2+} primär durch SERCA (Sarkoplasmatische(SR)-Kalzium-ATPase) sind ein wesentlicher Regulationsmechanismus für eine effiziente Kontraktion des Herzmuskels (Arai, Alpert et al. 1993; Meyer, Schillinger et al. 1995; Bers and Despa 2006). Die Verminderung der SERCA-Expression führt langfristig zu einer Überladung des Zytosols mit diastolischem Ca^{2+} , da die Wiederaufnahme des Ca^{2+} in das SR über SERCA eingeschränkt ist. Aufgrund dieser unzureichenden Neubeladung des SR mit Ca^{2+} sinkt die freigesetzte Menge an Ca^{2+} in der Systole. Trotz einer verstärkten Expression des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers in der Plasmamembran kann der gestörte zytostolische Ca^{2+} -Haushalt nicht mehr ausreichend reguliert werden (Studer, Reinecke et al. 1994; Schwinger, Wang et al. 1999). Die Veränderung des intrazellulären Ca^{2+} -Transienten bewirkt eine Störung der Excitations-Kontraktions-Kopplung, was wesentlich zum Fortschreiten der Herzinsuffizienz beiträgt (Schmidt, Hajjar et al. 1998).

Neben diesem Beispiel einer quantitativen Änderung der Genexpression kommt es bei der Herzmuskelschwäche zu einer Reaktivierung des fetalen Genexpressionsprogrammes, also einer qualitativen Änderung der Genexpression. Im hypertrophierten Myokard findet man daher ein Genexpressionsmuster, das dem in der fetalen Herzmuskelzelle ähnlich ist. Das bekannteste Beispiel ist die ventrikuläre Reexpression von ANF, der im gesunden adulten Herzen nur im Vorhof exprimiert wird. Man konnte zeigen, dass die mRNA-Expression von ANF im linken Ventrikel mit einer verminderten linksventrikulären Funktion korreliert. Aufgrund dessen dient die ANF-Expression heute sowohl in der Forschung als auch in der Klinik als Marker für den Schweregrad einer Herzinsuffizienz, wobei in letzter Zeit vermehrt BNP als prognostischer Marker an Bedeutung gewonnen hat (Wright and Struthers 2006). Ein weiteres Beispiel für die Induktion des fetalen Genexpressionsmusters bei Herzinsuffizienz ist die Expressions-Shift der adulten α -Isoform zur fetalen β -Isoform des MHC (Myosin-heavy chain)-Proteins (Izumo, Lompre et al. 1987).

3.3 Circulus vitiosus und Dekompensation

Zusammenfassend kann man sagen, dass die eigentlichen Kompensationsmechanismen im Herz langfristig die Progression der Herzinsuffizienz durch Induktion von kardialem Remodeling über einen Circulus vitiosus vorantreiben (Jackson, Gibbs et al. 2000).

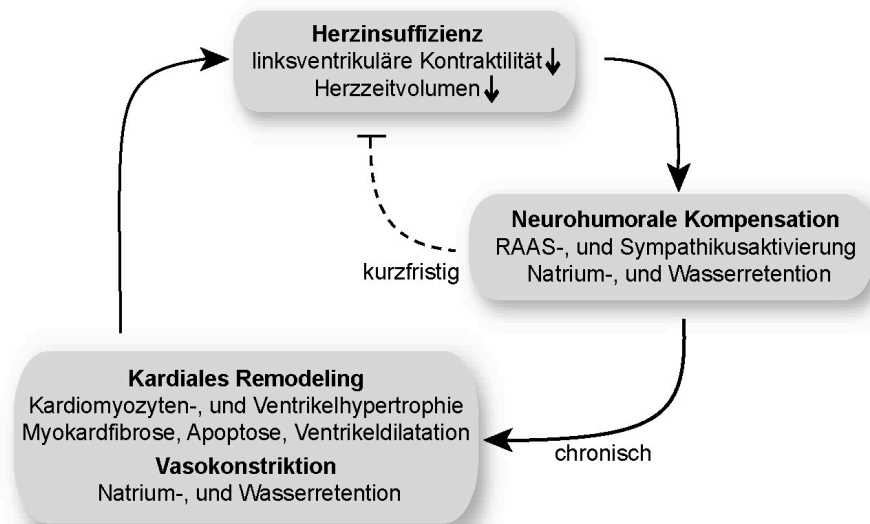


Abbildung 7: Circulus vitiosus der chronischen Herzinsuffizienz. Die Kompensationsmechanismen erlauben kurzfristig eine Stabilisierung der Myokardfunktion und damit der Perfusion lebenswichtiger Organe. Bei chronischer Aktivierung tragen dieselben Mechanismen jedoch wesentlich zur Progression der Herzinsuffizienz bei, es entsteht ein circulus vitiosus. (Modifiziert nach Zipes et. al, Braunwald's Heart Disease, 2004)

Infolge der Kardiomyozytenhypertrophie, der zunehmenden Steifheit des Myokards durch Fibrosierung sowie durch die Erschöpfung der überbelasteten Kardiomyozyten und deren apoptotischen Zelltod geht letztlich die Kompensations- in die Dekompensationsphase über. Im Endstadium der Herzmuskelschwäche ist die Herzkammer morphologisch durch eine starke Dilatation und eine deutliche Abnahme der ventrikulären Wanddicke gekennzeichnet. Letztlich befindet sich das Herz in einem Zustand, in dem die Kompensationsmechanismen durch Beeinflussung der Herzfrequenz, der Kontraktilität, des Schlagvolumens sowie der Blutdruckregulation nicht mehr zur Aufrechterhaltung der notwendigen Organ- und Gewebepерfusion ausreichen (van Empel and De Windt 2004). Die Dekompensationsphase ist durch das symptomatische Erscheinungsbild einer schweren Herzinsuffizienz mit Mangeldurchblutung lebenswichtiger peripherer Gewebe charakterisiert (Denolin, Kuhn et al. 1983; Mann 1999) .

III Ziel dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll die Funktion der kardialen Caspase-1 bei Herzinsuffizienz aufgeklärt werden.

Ist die verstärkte Expression der Caspase-1 bei Herzinsuffizienz kausal an der Entstehung und Progression einer Herzmuskelschwäche beteiligt?

Die funktionelle Analyse der kardialen Caspase-1 *in vivo* soll an einem transgenen Mausmodell erfolgen, bei dem durch herzspezifische Überexpression die verstärkte Expression bei Herzinsuffizienz imitiert werden kann. Anhand dieser Tiere und mittels Untersuchungen *in vitro* soll die Auswirkung einer verstärkten kardialen Expression der Caspase-1 auf das Myokard untersucht werden.

Ferner soll das Potential einer Inhibition der endogenen kardialen Caspase-1, im Sinne einer möglichen Therapiestrategie, untersucht werden.

Diese Fragestellung soll *in vivo* in einem Caspase-1-defizienten Mausmodell untersucht werden. Durch Ausschalten der endogenen Caspase-1 kann eine Inhibition der Caspase-1 beispielsweise durch Therapeutika imitiert werden. Durch Inhibitor-Studien *in vitro* sollen die Befunde validiert werden.

Diese Arbeit soll zum besseren Verständnis der Herzmuskelschwäche zugrunde liegenden Mechanismen beitragen um so die Entwicklung alternativer Therapiestrategien zu ermöglichen.

MATERIALIEN

Chemikalien und häufig verwendete Lösungen

Alle Standardlösungen und Puffer wurden entsprechend den Vorschriften aus Ausubel et al. (1995) hergestellt. Im Normalfall wurde vollentsalztes und pyrogenfreies Reinstwasser verwendet.

Die Zusammensetzung aller selbst hergestellten Puffer ist an der Stelle ihrer Verwendung beschrieben, ausgenommen der nachfolgend aufgelisteten Puffer, da diese bei verschiedenen Methoden angewandt wurden.

<u>PBS-Puffer (10x):</u>	NaCl	80 g
	KCl	2,0 g
	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	11,5 g
	KH ₂ PO ₄	2,0 g
<u>Tribromethanol:</u> 100% Stamm-Lösung:	2,2,2-Tribromoethylalkohol	1 g
	tert-Amyl-Alkohol	1 ml
2,5% Endkonzentration:	1:40 Verdünnung mit Aqua ad inj. oder 0,9% NaCl	
<u>4% PBS-gepuffertes Paraformaldehyd:</u> (4% Paraformaldehydlösung)	Paraformaldehyd	4 g
	10x PBS	10 ml
	Wasser	ad 100 ml

Der Ansatz wurde im Wasserbad auf 60°C erhitzt und es wurde bis zur vollständigen Klärung tropfenweise 1 M NaOH-Lösung zugegeben. Nach dem Abkühlen wurde die so hergestellte 4%ige Paraformaldehydlösung aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Enzyme, Pharmaka, Kits oder weitere Methoden-spezifische Substanzen sind an Stelle ihrer Verwendung mit dem entsprechenden Hersteller gekennzeichnet.

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien aufgelistet. Sämtliche Chemikalien wurden in einer Reinheit von mindestens p.a. (pro analysi) bezogen.

Substanz	Bezugsquelle
Aceton	Roth
Acrylamid 30% / Bisacrylamid 0,8%	Roth
Agarose	Invitrogen
APS	PeqLab
BrdU	Sigma
Bromphenolblau	Merck
Chelex® 100 Resin	Biorad
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva Feinbiochemica GmbH
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen
EDTA	AppliChem
EGTA	AppliChem
Essigsäure	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Sigma
Ethanol	J.T. Baker
Evans Blau	Sigma
Formaldehyd	Roth
Glycerin 85%	Klinikum-Apotheke
Kaliumchlorid	AppliChem
Methanol	J.T. Baker
Mercaptoethanol	Roth
MTT	Sigma
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Sigma
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumdeoxycholat	AppliChem
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid-Plätzchen	Sigma
Natriumlaurylsarcosin	Sigma
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Bethesda Research Laboratories
Natriumpyrophosphat	AppliChem
Natriumvanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma
N,N-Dimethylformamid	Roth

Paraformaldehyd	Applichem
Pikrinsäure	Sigma
TEMED	Sigma
2,2,2-Tribromoethylalkohol	Aldrich
Tris	AppliChem
Trockenmilch-Pulver	AppliChem
Trypanblau	Sigma
tert-Amyl-Alkohol	Aldrich
Triton-X-100	Sigma
TTC	Sigma
Xylencyanol	Sigma

Verbrauchsmaterial

Chemolumineszenzfilme Biomax [®] ML	Kodak
PVDF-Membranen (Immobilon [®] -P)	Millipore Corporation
Superfrost Plus Objektträger	Menzel-Gleser
Deckgläschen	Marienfeld
96-well ELISA-Platte	Nunc

Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide (MWG-Biotech AG, Reinheit: HPSF „High Purity Salt Free“) wurden in Wasser (Aqua ad inj.) gelöst und auf 1000 μ M eingestellt. Für die jeweiligen Versuche wurden dann 20 μ M Lösungen verwendet.

METHODEN

I Transgene Mausmodelle

1 Caspase-1-transgene Mäuse

1.1 Generierung von Mäusen mit kardialer Expression der Caspase-1

Aus dem Expressionsvektor (pBlueMHC-ICE) wurde mit dem Restriktionsenzym NotI das Promotor-cDNA-Konstrukt herausgeschnitten und auf einem 1%igen Agarosegel größenfraktioniert. Nach Isolierung der DNA aus der entsprechenden Bande durch Verwendung eines kommerziellen Reinigungskits (QIAquick, Qiagen) wurde die DNA über Nacht mit einer Dialyse-Kassette dialysiert und anschließend sterilfiltriert. Durch Gelelektrophorese wurde die DNA-Konzentration des Konstruktes bestimmt und anschließend auf eine Endkonzentration von 2 ng/µl eingestellt (Buitrago, Lorenz et al. 2005).

Die gereinigte und linearisierte DNA wurde in befruchtete Oozyten von superovulierten FVB/N Mäusen injiziert und in das Ovidukt von pseudoträchtigen CD-1 Mäusen, sogenannte Ammen, transferiert (Engelhardt, Hein et al. 1999). Aus diesen Eizellen entwickeln sich bei der Integration des Promotor-cDNA-Konstrukts in das Genom sogenannte Gründertiere. Erweisen sich die Nachkommen als Keimbahnüberträger, kann aus jedem dieser Gründertiere eine eigene transgene Tierlinie hervorgehen.

1.2 Genotypisierung Caspase-1-transgener Mäuse

Eine ca. zwei mm lange Mausschwanzbiopsie wurde in 200 µl Chelex[®]-Lysis-Puffer und 10µl Proteinase K (0,1 mg/ml, AppliChem) bei 55°C unter starkem Schütteln über Nacht verdaut. Nach intensivem Mischen durch vortexen wurden die Proben zwei Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und zehn Minuten auf 99°C erhitzt. Nach erneutem Zentrifugieren der Proben für vier Minuten bei 13000 rpm konnte die gelöste DNA aus dem Überstand zur folgenden PCR-Analyse abgenommen werden.

Chelex [®] -Lysis Puffer:	NaCl	0,1 M
	Natriumlaurylsarcosin	0,5%
	Chelex [®] -100	5 %

Die so gewonnene genomische DNA wurde 1:4 verdünnt und 2 µl davon in die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Identifizierung von transgenen Mäusen eingesetzt. Für diese PCR wurden die Primer so gewählt, dass sich nur dann ein PCR-

Produkt ergibt, wenn der Transgenvektor in die genomische DNA integriert ist. Zunächst wurde eine gemeinsame Stammlösung mit folgenden Bestandteilen auf Eis hergestellt:

10-fach Taq-PCR-Puffer (Eppendorf)	2,0 µl
Vorwärts- und Rückwärtsprimer (20 µM)	je 0,5 µl
Desoxynukleotide (10 mM)	0,4 µl
Taq-DNA-Polymerase (Eppendorf)	0,1 µl
Wasser	14,5 µl

Je 18 µl dieser Stammlösung wurden in PCR-Reaktionsgefäße pipettiert und mit 2 µl DNA-Lösung versetzt. Die Reaktionsansätze wurden nun in die auf 94°C vorgeheizte PCR-Maschine (Mastercycler epgradient, Eppendorf) gegeben und die DNA nach folgendem Programm amplifiziert:

Zyklenzahl	Schritt	Temperatur in °C	Zeit in s
1x	Vor-Denaturierung	94	180
35x	Denaturierung	94	15
	Hybridisierung	53 ¹	20
	Elongation	72	50 ²
1x	End-Elongation	72	300

¹Abhängig von Primer-Sequenzen

²Abhängig von Template-Länge

Zum Ausschluss falsch-negativer Genotypisierungsergebnisse durch eine fehlerhafte PCR oder mangelhafte DNA wurde für jede Probe dieselbe PCR mit Primern für Cathepsin D (*Ctsd*) als interne Kontrolle durchgeführt.

Zur Genotypisierung der Caspase-1-transgenen Mäuse wurden folgende Desoxynukleotidprimer verwendet:

Bezeichnung	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Produktgröße
Caspase-1 Genotypisierung	5' -AAGTGGTGGTGTAGGAAAGT- 3'	5' -CCTTTCGGAATAACGGAGTC- 3'	305 bp
Kontroll-PCR Primer (<i>Ctsd</i>)	5' -GCAACCCGGAGGAGAACTAA- 3'	5' -CCACAGGCCCCACCAGAAGA- 3'	361s bp

2 Caspase-1-defiziente Mäuse

Caspase-1-defiziente Mäuse (NOD.129S2(B6)-Casp1^{tm1Sesh}/LtJ, Stock#004947) und entsprechenden Kontroll-Mäuse (NOD/LtJ, Stock#001976) wurden von der Firma The Jackson Laboratory (TJL, Boston MA, USA) über Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und durch homozygote Verpaarung gezüchtet.

3 Tierhaltung

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden in einer SPF-Anlage entsprechend den Tierschutz-Bestimmungen in Käfigen mit maximal fünf Tieren und einem zwölfstündigem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Mäuse hatten zu jeder Zeit freien Zugang zu Trinkwasser und artgerechtem Futter (Altromin).

II Isolierung und Infektion von Kardiomyozyten

Die Kultur von Zellen, die direkt aus dem Organismus entnommen werden, wird als Primärkultur bezeichnet. Die Standardmethode zur Gewinnung von Primärkulturen erfolgt auf enzymatischem Weg.

1 Isolierung und Kultur von adulten Mauskardiomyozyten

Zur Gewinnung von adulten murinen Kardiomyozyten wurde die Maus ca. fünf Minuten nach Injektion (i.p.) von 50 Einheiten Heparin (Liquemin® N 25000, Roche) mit Tribromethanol anästhesiert und ihr das Herz entnommen. Dieses wurde dann über die Aorta mit einer Kollagenaselösung (Zusammensetzung nach „AfCS Solution Protocol“, <http://www.signaling-gateway.org>) entsprechend der Langendorff-Methode perfundiert, unverdautes Gewebe wurde anschließend durch Filtration des Herzens (100 µm Maschenweite) abgetrennt. Nach langsamer Erhöhung der Kalziumkonzentration auf 1 mM wurden die so gewonnenen Kardiomyozyten gezählt, auf mit Laminin (Omnilab) beschichtete runde Deckgläschen in 24-well-Zellkulturplatten ausgesät und in serumfreiem MEM-Medium (Invitrogen/Gibco), mit BSA (0,1 mg/ml, Sigma) und 1% Penicillin/Streptomycin (v/v, PAN Biotech), kultiviert.

Zur Bestimmung der Zelldimensionen wurden die Kardiomyozyten in 4%iger Paraformaldehydlösung resuspendiert, auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die einzelnen Kardiomyozyten wurden digital fotografiert und durch computergestützte Analyse (MetaVue Software, Visitron Systems) die Längen- und Breitenachse in µm gemessen.

2 Isolierung und Kultur von neonatalen Rattenkardiomyozyten

Neonatale Rattenkardiomyozyten (NRCM) wurden aus Herzen von 1–2 Tage alten Sprague-Dawley Ratten isoliert. Nach Entfernen der Vorhöfe wurde das Ventrikelgewebe in kleine Stücke geschnitten und mit DNase-haltiger Trypsin-Lösung in repetitiven Schritten verdaut. DNase wird bei der Trypsinierung von Geweben eingesetzt um die Aggregation von Einzelzellen durch freigesetzte DNA zu minimieren. Nach dem

vollständigen Verdau der Gewebestückchen wurden Trypsin und DNase durch Zugabe von FCS (PAN Biotech) inaktiviert und die so entstandene Zellsuspension anschließend für zehn Minuten bei 700 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in MEM-Medium mit 5% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin resuspendiert. Um die Kardiomyozyten von den Nichtkardiomyozyten (kardiale Fibroblasten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen) zu trennen, wurde die Zellsuspension in unbeschichteten Kulturschalen für eine Stunde bei 1%CO₂ und 37°C inkubiert (Preplating). Diese Zeit ist ausreichend, um Nicht-Kardiomyozyten, aufgrund schnellerer Anheftungseigenschaften am Schalenboden, von den noch frei im Nährmedium schwimmenden Kardiomyozyten zu trennen. Der Überstand mit den neonatalen Kardiomyozyten wurde abgenommen und die Zellzahl in einer entnommenen Probe nach Zugabe von 4%iger Trypanblau-Lösung (1:1) durch Zählen in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Durch das Trypanblau werden tote Zellen blau angefärbt, wodurch die ungefärbten, lebenden Zellen gezählt werden können. Abschließend wurden die Kardiomyozyten in MEM Medium (5% FCS) auf mit Polylysin (Sigma) beschichteten Zellkulturplatten ausgesät. Durch die Zugabe von BrdU wurde das Wachstum noch verbleibender Fibroblasten inhibiert. Die Kultivierung der NRCM erfolgte stets bei 1% CO₂ und 37°C.

CBFHH-Medium:	NaCl	137 mM
	KCl	5,36 mM
	MgSO ₄ x7H ₂ O	0,81 mM
	Dextrose (Merck)	5,55 mM
	KH ₂ PO ₄	0,44 mM
	Na ₂ HPO ₄ x7H ₂ O	0,34 mM
	Hepes pH 7,3 (Chalibiochem)	20,06 mM

Trypsin-Lösung:	Trypsin (BD)	300 mg
	DNase (Sigma)	2 ml
	(Stock: 10ml/5ml 0,15M NaCl)	
	Penicillin/Streptomycin (PAN Biotech)	1% (v/v)
	CBFHH-Medium	ad 200 ml

NRCM-Medium:	MEM (Invitrogen)	10,7 g
	NaHCO ₃	350 mg
	Vitamin B12 67% (m/v) (Sigma)	1 ml
	Wasser	ad 1000 ml
	Vor Gebrauch frisch zugeben:	
	BrdU (Sigma)	0,003% (m/v)
	Penicillin/Streptomycin	1% (v/v)

3 Generierung von Adenoviren und Infektion von NRCM

Die in dieser Arbeit verwendeten Adenoviren wurden mit Hilfe des Gateway-Systems (Invitrogen) hergestellt. Das 1214 bp große Caspase-1-cDNA-Fragment wurde aus dem Plasmid pBlueMHC-ICE mittels PCR amplifiziert und anschließend mit Hilfe einer Gelelektrophorese isoliert. Durch das Enzym Integrase (Invitrogen) wurde das, für die humane Caspase-1 (Isoform α) kodierende cDNA-Fragment zunächst in den Donor-Vektor pDONR221 subkloniert. Der so entstandene Vektor (entry clone) pENTR221-hCasp1 wurde sequenziert. Ausgehend von diesem Vektor wurde das enthaltene cDNA-Fragment zur Generierung des Adenovirus in den Zielvektor (destination clone) pAD/CMV/V5-Dest überführt, wodurch der Endklon pAD/CMV/hCasp1 erhalten wurde. Dieser Schritt wurde durch die LR-Klonase (Invitrogen) katalysiert.

Nach Verdau der gereinigten, rekombinanten adenoviralen DNA mit PacI (NEB) und Isolierung der DNA durch Salz-Präzipitation wurde diese für die Transfektion von HEK293A Zellen mit Effectene (Qiagen) eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von elf Tagen wurden die mit Virus beladenen Zellen durch Gefrier-Tau-Zyklen lysiert.

Zur Amplifikation des Caspase-1-exprimierenden Adenovirus (Adv-Casp-1) wurde der Überstand zur Infektion weiterer Zellen verwendet. Zur Bestimmung der Viruskonzentration wurde der sogenannte Plaque-Test durchgeführt. Ein Plaque entspricht der Lyse eines Verbandes von HEK293A-Zellen, die durch einen einzelnen Virus-Klon hervorgerufen worden ist. Nach zweistündiger Inkubation von HEK293A-Zellen mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen wurden die Zellen mit Agarose überschichtet. Nach der folgenden 15-tägigen Inkubation wurden die entstandenen Plaques durch Kontrastfärbung der intakten Zellen mit MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) sichtbar gemacht. Durch Spaltung des Tetrazoliumrings durch aktive, mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen wird das lösliche MTT in unlösliches, violette Formazan umgewandelt. Plaques, also tote Zellen, können den Farbstoff MTT nicht umsetzen und bleiben farblos. Die Titerbestimmung erfolgte durch Berechnung der „plaque forming units“ (pfu), d.h. der

Anzahl der infektiösen Viren (in einem Milliliter Lösung) bezogen auf die Gesamtzahl an Plaques bei der jeweiligen Viruskonzentration.

Zur Generierung des Caspase-1-exprimierenden Adenovirus wurden folgende Desoxynukleotidprimer verwendet:

Bezeichnung	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Produktgröße
CASP-1	5' -GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA GGCTCCACCATCCCCGACAACGTCCT GA- 3'	5' -GGGGACCACTTTGTACAAGAAAG CTGGGTCTTAATGTCCTCCGAAGAGG TA- 3'	1214 bp

Zur adenoviralen Infektion wurden die NRCM zunächst 24 Stunden in 5%FCS enthaltendem MEM-Medium kultiviert und anschließend für weitere 24 Stunden in 1% FCS enthaltendes MEM-Medium überführt. Nach weiteren 24 Stunden wurden sie in FCS-freies MEM-Medium überführt und mit dem jeweiligen Adenovirus in der gewünschten Konzentration (MOI, multiplicity of infection) infiziert. Als Kontrollgruppe wurden NRCM verwendet, die mit einem LacZ-exprimierenden Adenovirus entsprechend infiziert wurden.

4 MTT-Versuch

Ziel des MTT-Assays ist die quantitative Bestimmung lebendiger Zellen *in vitro* durch die selektive Umsetzung des MTT-Substrats zu einem Farbstoff in intakten Zellen. Zur Durchführung des MTT-Assays wurden frisch isolierte NRCM (2×10^5 NRCM pro well) in Polylysin-beschichteten 24-well Zellkulturplatten ausgesät und nach adenoviraler Infektion für weitere 34 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium durch MTT-haltiges (5 mg/ml MTT) Medium ersetzt und für weitere 60 Minuten inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit PBS und Zellyse mit einer Salzsäure/Isopropanol-Mischung wurden die Lysate in eine 96-well ELISA-Platte überführt und die Absorption mit einem ELISA-Plattenmessgerät bei 570 nm gemessen (der Hintergrund wurde bei 650 nm gemessen und entsprechend subtrahiert).

Der Breitspektrum Caspase-Inhibitor zVAD-fmk (Endkonzentration 20 μ M, R&D, Wiesbaden, Deutschland) oder der Caspase-8 spezifische Inhibitor zIETD-fmk (Endkonzentration 20 μ M, Calbiochem, CA, USA) oder der Caspase-1 spezifische Inhibitor RU36384 (Endkonzentration 5 μ M, Sanofi-Aventis, Frankfurt, Deutschland) wurden zusammen mit dem Adeovirus appliziert und für 34 Stunden bei 1% CO₂ und 37°C inkubiert.

III Quantifizierung der mRNA-Expression mit real-time PCR

1 Isolierung und Quantifizierung von mRNA

Die Isolierung von mRNA aus Herzgewebe wurde mit Hilfe eines Säulchen-Systems (RNeasy® Mini Kit, Qiagen) durchgeführt. In flüssigem Stickstoff tiefgefrorene Gewebestückchen wurden in 600 µl RLT-Puffer (Qiagen) mit einem Ultraturrax (IKA-Labortechnik) homogenisiert. Nach Zugabe von 40 µl Proteinase K (10 mg/ml, AppliChem) und Auffüllen des Reaktionsvolumens mit Wasser auf 1800 µl wurde dieser Ansatz zehn Minuten bei 55°C inkubiert und anschließend mit 900 µl Ethanol versetzt. Diese Lysatlösung wurde auf eine Säule (RNeasy, Qiagen) gegeben, und die RNA durch die folgende Zentrifugation (15 Sekunden, 9000 g) an die RNeasy Silicagel-Membran gebunden. Zum Entfernen von Zellrückständen wurde die Membran der Säulchen mit 350 µl RW1-Puffer (Qiagen) gewaschen. Durch eine zwischengeschaltete Inkubation mit 80 µl DNase-Lösung (Qiagen) von 15 Minuten konnten Verunreinigungen mit genomischer DNA eliminiert werden. Schließlich wurde die gewaschene RNA mit RNase-freiem Wasser (Qiagen) von der Säule eluiert. Durch UV-Spektrometrie, der Absorptionsmessung bei 260 nm in einer 1 cm Quarzküvette, wurde anschließend die RNA-Konzentration des Eluats ermittelt. Die Berechnung erfolgte über folgenden Umrechnungsfaktor: 1 Absorptionseinheit bei 260 nm = 40 µg/ml RNA. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} diente zur Kontrolle etwaiger Verunreinigungen. Als Sollbereich gilt ein Quotient von 1,8 – 2,0. Die Proben wurden für die weiteren Analysen auf die jeweils geringste mRNA-Konzentration eingestellt.

Zur Qualitätskontrolle der so isolierten mRNA wurde eine denaturierende Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei erkennt man die Integrität der mRNA an den typischen Banden in Höhe von ~4,5 und 1,9 kb, die der 28S- und 18S-Fraktion der mRNA entsprechen. Für die denaturierende Gelelektrophorese wurde 1 µg mRNA mit dem dreifachen Volumen RNA-Auftragspuffer versetzt und zehn Minuten bei 60°C denaturiert. Zur anschließenden Gelelektrophorese wurde ein 1% (v/v) Formaldehyd enthaltendes 1%iges Agarosegel verwendet. MOPS-Puffer (1x) wurde zur Herstellung des Agarosegels und als Laufpuffer verwendet.

Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei –80°C gelagert.

MOPS-Puffer (10x):	MOPS	104,7 g
	EDTA	3,7 g
	NaOH	pH 7,0 einstellen
	Wasser	ad 1000 ml
RNA-Auftragspuffer:	10x MOPS	1 ml
	100% Formamid	5 ml
	37% Formaldehyd	1,84 ml
	85% Glycerin	1,34 ml
	Xylencyanol	0,05% (m/v)
	gesättigte Ethidiumbromidlsg.	50 µl

2 Reverse Transkription von mRNA

Zur Expressionsanalyse von Genen mittels quantitativer real-time PCR wurde die isolierte mRNA durch reverse Transkription in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dafür wurden Oligo(dT)-Primer verwendet, die spezifisch an den poly(A)-Schwanz von eukaryontischer mRNA binden. Es wurden 1 µg RNA mit 2 µl Oligo(dT)-Primern (10 µM) in einem Volumen von 11 µl für zehn Minuten bei 70°C inkubiert, wobei die Anlagerung der Oligo(dT)-Primer an die 3'-Enden der RNA stattfindet. Nach erfolgter Inkubation wurden die folgenden Substanzen zu jedem RNA-Reaktionsansatz gegeben:

5-fach Enzympuffer (First Strand, Invitrogen)	4 µl
DTT (100 mM)	2 µl
Desoxynukleotide (Desoxynucleotid-Set, Eppendorf) (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1 µl
Wasser	0,9 µl
RNase-Inhibitor (RNasin, 40 U/µl, Promega)	0,1 µl
Reverse Transkriptase (Superscript® II Reverse Transkriptase, 200 U/µl, Invitrogen)	1 µl

Es wurde für 60 Minuten bei 42°C inkubiert. Während dieser Inkubation erfolgt die reverse Transkription, die mRNA wird in komplementäre cDNA umgeschrieben. Abschließend wurden die Proben zur Denaturierung der Reversen Transkriptase für zehn Minuten auf 70°C erhitzt. Die cDNA wurde durch Zugabe der entsprechenden

Menge an Wasser auf eine Konzentration von 10 ng/ μ l verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3 Quantitative real-time PCR

3.1 Prinzip und Durchführung

Die quantitative real-time PCR ist eine spezielle Form der üblichen Polymerase-Kettenreaktion. Sie bietet neben der Vervielfältigung des spezifischen PCR-Produkts die Möglichkeit der quantitativen Analyse. Während bei der herkömmlichen PCR eine semiquantitative Analyse erst nach Beendigung der Reaktion möglich ist, kann bei der real-time PCR durch Zugabe von Fluoreszenz-Farbstoffen die Zunahme der DNA während der PCR (daher der Name "real-time") verfolgt werden. Unter Idealbedingungen kommt es, durch je einen durchlaufenen Zyklus, zu einer Verdopplung der Menge des spezifischen PCR-Produktes. Der zugegebene Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green (Cambrex Bioscience) entwickelt erst nach Bindung an doppelsträngige DNA seine Fluoreszenz. Da auf diese Weise die Fluoreszenz proportional mit der Menge an PCR-Produkt zunimmt, wird somit eine Quantifizierung ermöglicht. Mittels eines in der PCR-Maschine (Modell 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems) enthaltenen Laser-Detektionssystems wird kontinuierlich die spezifisch entstehende Fluoreszenz gemessen. ROX (6-Carboxy-X-Rhodamin, Molecular Probes) wird als Referenzfarbstoff eingesetzt, um das Hintergrundrauschen zu bestimmen.

Zur quantitativen Analyse der Genexpression wurde die cDNA der Versuchsgruppen nach folgendem Protokoll (96-well-Format) amplifiziert. Jede Probe wurde jeweils durch Dreifachmessungen analysiert. Die durch reverse Transkription gewonnene cDNA (10 ng DNA/ μ l) wurde für die real-time PCR 1:3 mit Wasser verdünnt, pro Probe wurden jeweils 5 μ l dieser cDNA mit folgenden Reagenzien versetzt:

10-fach HotMaster Taq-PCR-Puffer (Eppendorf)	2 μ l
ROX-Lösung (200 nM)	1 μ l
SYBR-Green-Lösung (1 : 50000 aus 10000x Stammlsg.)	1 μ l
Vorwärtsprimer (20 μ M)	0,5 μ l
Rückwärtsprimer (20 μ M)	0,5 μ l
Desoxynukleotide (10 mM)	0,4 μ l
HotMaster Taq [®] DNA Polymerase (5 U/ μ l)	0,1 μ l
Wasser	14,5 μ l

Die HotMaster Taq® DNA Polymerase (Eppendorf) ist eine modifizierte Polymerase, die erst ab 55°C aktiv ist. Grund hierfür ist, dass ihr ein Inhibitor zugesetzt ist, der die Substrat-Bindestelle der DNA-Polymerase erst oberhalb von 55°C freigibt.

Die PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

Zyklenzahl	Schritt	Temperatur in °C	Zeit in s
1x	Vor-Denaturierung	94	120
30x	Denaturierung	94	20
	Hybridisierung	56 ¹	20
	Elongation	65	35 ²
1x	End-Elongation	65	135

¹Abhängig von Primer-Sequenzen

²Abhängig von Template-Länge

3.2 Auswertung

Durch den Schwellenwert (Threshold line) ist ein Wert definiert, ab dem die Fluoreszenz der Reaktionsprodukte eine Intensität erreicht hat, die deutlich über dem Hintergrundrauschen liegt. Der Zyklus an dem die gemessene Probe den Schwellenwert erreicht bezeichnet man als Schwellen-Zyklus (Ct-Wert). Dieser wurde mit Hilfe der Software Sequence Detector 1.7 (ABI Prism, Applied Biosystems) automatisiert bestimmt. Sämtliche in dieser Arbeit dargestellte Daten wurden mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode berechnet (Livak and Schmittgen 2001), wodurch sowohl für die Versuchs- als auch für die Kontrollgruppe die Expression berechnet wird. Der ermittelte Ct-Wert des Zielgens der zu untersuchenden Gruppe wird auf den der Kontrollgruppe bezogen (Verhältnis Untersuchungs- versus Kontrollgruppe = $2^{-[\Delta Ct(\text{Untersuchungsgruppe}) - \Delta Ct(\text{Kontrollgruppe})]}$; ΔCt = Einzelwert bezogen auf ein Referenzgen). Für ein in der Kontrollgruppe nicht reguliertes Gen ergibt sich bei dieser Quantifizierungsmethode ein Wert von idealerweise 1. GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) wurde als Referenzgen verwendet. GAPDH ist ein Schlüsselenzym der Glykolyse, das in allen Zellen exprimiert wird. Es unterliegt im adulten Herz keiner Regulation und zeigte in beiden Versuchsgruppen eine identisch starke Regulation. Die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode der quantitativen Berechnung setzt voraus, dass die PCR mit einer nahezu idealen Amplifikationseffizienz (Zunahme der DNA-Menge pro Zyklus um den Faktor 2) abläuft. Diese Bedingung wurde mittels einer Standardkurve für jedes Primerpaar kontrolliert.

Aufgrund der Möglichkeit unspezifischer Bindungen von SYBR Green an jegliche doppelsträngige DNA wurde die Spezifität der gemessenen Fluoreszenz-Signale für das jeweilige Amplifikationsprodukt durch Analyse der Schmelzkurven nach jedem Versuch kontrolliert. Dafür wurde die Reaktionslösung kontinuierlich von 60°C auf 95°C erhitzt,

die dabei entstehende Fluoreszenz wurde parallel gemessen. Bei Erreichen der Schmelztemperatur des jeweiligen Amplifikationsproduktes dissoziiert die DNA in ihre Einzelstränge. Dies ist an einem schlagartigen Abfall der messbaren Fluoreszenz durch SYBR Green erkennbar und wird in der Schmelzkurve durch einen einzelnen Peak, bei der für das Amplifikationsprodukt spezifischen Schmelztemperatur, sichtbar.

Neben der Analyse der Schmelzkurven wurden die durch die real-time PCR entstandenen Amplifikationsprodukte mittels 2%igen Agarosegelen elektrophoretisch größenfraktioniert. Auf diese Weise wurde kontrolliert, ob ausschließlich das spezifische PCR-Produkt amplifiziert wurde.

Primer und Produktgrößen der so untersuchten humanen Gene sind in folgender Tabelle angegeben:

Gene	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Produktgröße
<i>CASP-1</i>	5' -GCTTTCTGCTCTCCACACC- 3'	5' -TCCTCCACATCACAGGAACA -3'	118 bp
<i>GAPDH</i>	5' -GATCATCAGCAATGCCTCCT- 3'	5' -GGGCCATCCACAGTCTTCT -3'	140 bp

Primer und Produktgrößen der so untersuchten murinen Gene sind in folgender Tabelle angegeben:

Gene	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Produktgröße
<i>Anf</i>	5' -TTTCAAGAACCTGCTAGACCAC- 3'	5' -CCCTGCTTCCTCAGTCTGCT- 3'	96 bp
<i>β-Mhc</i>	5' -CAATGCAGAGTCGGTGAAGG- 3'	5' -GCCGCATTAAGTTCTTCTGTCT- 3'	96 bp
<i>Serca</i>	5' -TGACAATGGCACTTTCTGTTC- 3'	5' -GCATCCTCAGCAAAGACTGG- 3'	86 bp
<i>Col1α2</i>	5' -CAAGCATGTCTGGTTAGGAGAG- 3'	5' -GCTGAGTTGCCATTCCTTG- 3'	93 bp
<i>Col3α1</i>	5' -ACAGCAAATTCACCTACAGTTC- 3'	5' -CTCATTGCCTTGCGTGTTT- 3'	98 bp
<i>Mmp-2</i>	5' -AGGCTGGTCAGTGGCTTG- 3'	5' -CAGGAGGAGAAGGCTGTGTT- 3'	94 bp
<i>Mmp-9</i>	5' -AGGGCTTCCCTCTGAATAAA- 3'	5' -TGGGACACATAGTGGGAGGT- 3'	136 bp
<i>Timp-1</i>	5' -GGTTCCTGGCGTACTCTG- 3'	5' -ATCCGTCCACAAACAGTGAG- 3'	143 bp
<i>Timp-2</i>	5' -CACCAGAAGAAGAGCCTGA- 3'	5' -TAGCAAGGATCATGGGACA- 3'	82 bp
<i>Gapdh</i>	5' -TGGCAAAGTGGAGATTGTTG-3'	5' -CATTATCGGCCTTGACTGTG- 3'	119 bp

IV Quantifizierung der Proteinexpression

1 Western Blot Analyse

1.1 Probengewinnung und Probenvorbereitung

1.1.1 Proteinlysate aus murinem Gewebe

Die in flüssigem Stickstoff gefrorenen Gewebebiopsien wurden in eisgekühlten Lysispuffer gegeben und sofort mit einem Ultraturrax homogenisiert. Zum Verdau von DNA wurde die Probe mit 1/10 Volumen 5% Benzonase (v/v, Merk) versetzt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zu Inaktivierung der Benzonase wurde der Ansatz anschließend fünf Minuten in einem Ultraschallbad bei 4°C inkubiert. Nach Abnahme einer Lysatprobe für die anschließende Proteinbestimmung wurden die Proben mit je 1/40 Volumen Mercaptoethanol und 1/10 Volumen Auftragspuffer versetzt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80°C gelagert. In die Western-Blot Analyse wurden 30-40 µg Protein eingesetzt.

Lysispuffer:	Tris, pH 6,7	50 mM
	SDS	2% (m/v)
	Na ₃ VO ₄	1 mM
	pro 10 ml Lysispuffer: 1 Tablette Complete Mini® (Roche)	
Auftragspuffer:	Glycerin	50% (v/v)
	Bromphenolblau	0,001% (m/v)
Verdünnungspuffer:	Lysispuffer	
	1/40 Vol. Mercaptoethanol	
	1/10 Vol. Auftragspuffer	

1.1.2 Proteinlysate aus humanem Gewebe

Die Herstellung von Proteinlysaten aus humanen Myokardproben erfolgte prinzipiell nach demselben Ablauf wie die Herstellung von Proteinlysaten aus murinem Gewebe. Es wurde jedoch RIPA-Puffer als Lysispuffer eingesetzt.

RIPA-Puffer:	Tris-HCl pH 7,4	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	1 mM
	Triton-X-100	1% (v/v)
	Natrium-deoxycholat	1% (m/v)
	SDS	0,1% (m/v)
	pro 10 ml Lysispuffer : 1Tablette Complete Mini® (Roche)	

Nach dem Ultraschallbad wurden die Lysate für zehn Minuten bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert und eine Probe wurde für die Proteinbestimmung abgenommen. Die Proteinlysate wurden anschließend mit RIPA-Puffer auf dieselbe Konzentration eingestellt und mit der entsprechenden Menge an Lämmli-Puffer (Roti®-Load1, 4x-Konz., Roth) versetzt.

Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei –80°C gelagert. In die Western-Blot Analyse wurden 70 µg Protein eingesetzt.

1.1.3 Proteinlysate aus NRCM

Zur Herstellung von Proteinlysaten aus neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden jeweils 3×10^6 NRCM in einer 6 cm-Zellkulturschale ausgesät. Die Lysate wurden 24 Stunden nach adenoviraler Infektion hergestellt. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurde der eisgekühlte Lysispuffer zugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber vom Schalenboden abgeschabt. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 1,5 ml Gefäß überführt und zügig dreimal für ca. vier Sekunden sonifiziert. Anschließend wurde etwas Lysat für die Proteinbestimmung abgenommen. Die Proteinlysate wurden zur Angleichung der Konzentration mit Lysispuffer versetzt und der Ladepuffer wurde zugegeben.

Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei –80°C gelagert. In die Western-Blot Analyse wurden 25 µg Protein eingesetzt.

Lysispuffer für NRCM:	Tris pH 7,5	20 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	1 mM
	EGTA	1 mM
	Triton-X-100	1% (v/v)
	Natriumpyrophosphat	2,5 mM
	Na ₃ VO ₄	1 mM
	pro 10 ml Lysispuffer: 1 Tablette Complete Mini® (Roche)	
3x Ladepuffer:	Tris-HCl pH 6,8	187,5 mM
	SDS	6% (m/v)
	Glycerol	30% (v/v)
	DTT	150 mM
	Bromphenolblau	0,03% (m/v)

1.1.4 Quantifizierung der Proteinkonzentration in Lysaten

Die Proteinbestimmung wurde mit Bicinchoninsäure (BCA Protein Assay Kit, Perbio Science) kolorimetrisch nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Chemisch wird hierbei Kupfer(II) in alkalischer Lösung zu Kupfer(I) reduziert welches dann mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure zu einem violetten Farbstoff komplexiert. Durch Extinktionsmessung (Photometer SpectraMax 340, Molecular Devices) dieses Farbkomplexes bei 562 nm gegen einen internen Kalibrationsstandard mit BSA im Bereich von $A_{562}=0,1 - 1,0$ kann die Proteinmenge berechnet werden.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der aus isolierten Rattenkardiomyozyten gewonnenen Proteinlysate erfolgte nach der Bradford-Methode. Die Bradford-Lösung (Biorad) enthält den Triphenylmethan-Farbstoff (Coomassie Brilliant Blau), der in saurer Lösung mit Proteinen komplexiert. Infolgedessen geht der rotbraun-gefärbte Farbstoff in seine blaue, anionische Form über. Die Quantifizierung erfolgte durch die Absorptionsbestimmung bei 595 nm gegen einen internen Kalibrationsstandard.

1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Denaturierung der Proteine wurden die Lysate vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel für zehn Minuten auf mindestens 60°C erhitzt. Je nach Größe des Zielproteins wurden 10-13,5% Polyacrylamidgele verwendet.

Folgend ist das Rezept zur Herstellung von zwei 10% Gelen (14x16 cm, Hoefer-Apperatur) angegeben:

	Sammelgel	Trenngel
Wasser	9,6 ml	11,1 ml
Trenngelpuffer	--	11,4 ml
Sammelgelpuffer	3,75 ml	--
30% Acrylamid-0,8% Bisacrylamid	1,5 ml	15 ml
85% Glycerin	--	7,5 ml
TEMED	18 µl	36 µl
APS 10%	144 µl	216 µl

Durch Zugabe von TEMED und APS wird die Polymerisation der Gele initiiert. Während der Polymerisation des Trenngels wurde es mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet, um so einen luftblasenfreien Gelabschluss zu erhalten und das Gel vor dem Austrocknen zu schützen. Nach abgeschlossener Aushärtung des Trenngels wurde das Isobutanol durch Waschschriffe entfernt und das Sammelgel gegossen. Die Gele wurden entsprechend in die Höfer-Laufkammern eingesetzt und das Anoden- und Kathodenreservoir mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Zur Probenbeladung wurden die Gele mit jeweils 20-70 µg Protein pro Spur geladen, als Molekulargewichtsstandard wurde der vorgefärbte „BenchMark™ Prestained Protein Ladder“ (Invitrogen) in einer zusätzlichen Spur aufgetragen. Die elektrophoretische Proteinauftrennung wurde bei 35 mA für ca. drei Stunden durchgeführt.

Als Stammlösungen für Proteingele dienten folgende Puffer und Lösungen:

4-fach Trenngelpuffer:	SDS	4 g
	3 M Tris-HCl, pH 8,8	500 ml
	Wasser	ad 1000 ml
4-fach Sammelgelpuffer:	SDS	2 g
	1 M Tris-HCl, pH 6,7	250 ml
	Wasser	ad 500 ml
10-fach SDS-Laufpuffer:	Tris	30,3 g
	Glycin	144 g
	SDS	15 g
	Wasser	ad 1000 ml

2-fach Auftragspuffer:	4-fach Sammelgelpuffer	25 ml
	Glycerin	20 ml
	Mercaptoethanol	2 ml
	SDS	4 g
	Bromphenolblau	1 mg
	Wasser	ad 100 ml

1.3 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot)

Zum Transfer der elektrophoretisch getrennten Proteine auf eine PVDF-Membran wurde diese zusammen mit dem Acrylamidgel in eine Nassblotapparatur (Hoefer) eingebracht. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die negativ geladenen Proteine zur Anode und können auf diese Weise von dem Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran transferiert werden (Western Blot). Der Proteintransfer erfolgte bei 600 mA für ca. 90 Minuten.

1.4 Immundetektion von immobilisierten Proteinen

Das gewünschte Zielprotein wurde nach dem Transfer auf die PVDF-Membran durch Immundetektion sichtbar gemacht. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen für die anschließende Immundetektion wurde die PVDF-Membran zunächst für 60 Minuten entweder mit einer 2%igen (m/v) BSA-haltigen Blocklösung oder einer 5%igen (m/v) Trockenmilch-haltigen Blocklösung behandelt. Anschließend wurde der Erstantikörper (meist 1:1000 in BSA-Blocklösung verdünnt) zu der Membran gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Durch mehrmaliges Waschen der Membran mit Waschpuffer wurde ungebundener Erstantikörper entfernt, anschließend wurde die Membran für 60 Minuten mit einem an Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper (1:10000 in Waschpuffer verdünnt) inkubiert. Wiederum wurde durch mehrmaliges Waschen überschüssiger Zweitantikörper entfernt. Durch das an den Zweitantikörper gebundene Enzym Peroxidase kann eine Chemilumineszenzreaktion katalysiert werden. Die am häufigsten verwendete Methode ist die oxidative Umsetzung zu Luminol (Natriumdithionit), bei der die entstehende Lumineszenz durch Schwärzung eines Fotofilms (Biomax ML-Film, Kodak) sichtbar gemacht werden kann. War eine Langzeitbelichtung des Fotofilms zur Detektion nötig, wurde das ECL-Plus Chemolumineszenz Detektionssystem (ECL-Plus Chemolumineszenz Detection Kit, Amersham Bioscience) verwendet.

2% BSA-Blocklösung:	Tris-HCl pH 7,5	50 mM
	NaCl	150 mM
	BSA	2% (m/v)
	Nonidet P40	0,2% (v/v)
	NaN ₃	0,03% (m/v)

5% Trockenmilch-Blocklösung:	NaCl	1,75 g
	1 M Tris pH 7,5	3 ml
	Tween	0,3 ml
	Wasser	ad 300 ml
	frisch vor Gebrauch 5% (m/v) Trockenmilchpulver zugeben	

Waschpuffer:	Tris-HCl pH 7,5	50 mM
	NaCl	150 mM
	BSA	0,5% (m/v)
	Nonidet P40	0,2% (v/v)

Folgende Antikörper wurden für die Western Blot Analyse verwendet:

Antikörper	Sekundärantikörper	Verdünnung	Firma
Anti-geschnittene Caspase-1 human, polyklonal	Anti-Kaninchen	1:850	# sc-515, Santa Cruz
Anti-geschnittene Caspase-3 murin, polyklonal	Anti-Kaninchen	1:1000	#9661S Cell Signaling
Anti-Geschnittene Caspase-8 murin, polyklonal	Anti-Kaninchen	1:1000	#9507 Cell Signaling
Anti-geschnittene Caspase-9 murin, polyklonal	Anti-Kaninchen	1:1000	#sc-7890 Cell Signaling
<u>Zweitantikörper</u> Kaninchen, Peroxidase konjugiertes IgG (H+L)	_____	1:10000	#111-035-144 Jackson Immuno-Research

1.5 Proteinfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Zur Kontrolle der geladenen Proteinmenge wurden die Acrylamidgele mit Coomassie Brilliant Blue-Lösung, einem unspezifischen Protein-Färbereagenz, angefärbt. Nach 30minütiger Färbung und dem anschließenden Herauslösen der unspezifischen Hintergrundfärbung über Nacht mit Entfärbelösung wurde das Gel zur Dokumentation eingescannt. Die Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei 50-100 ng pro Bande.

Färbelösung:	Coomassie Brilliant Blue	0,05% (m/v)
	Essigsäure	10% (v/v)
	Methanol	50% (v/v)
Entfärbelösung:	Essigsäure	7% (v/v)
	Methanol	5% (v/v)

2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Unter einem ELISA versteht man ein sensitives, immunologisches Verfahren zur Detektion von Proteinen. Aufgrund einer der Antigen-Antikörper-Reaktion nachgeschalteten, Antikörper-vermittelten, enzymatischen Farbreaktion ist der ELISA eine sensitive Methode zur quantitativen Bestimmung eines Zielproteins.

2.1 Probengewinnung und Probenvorbereitung

Für die Gewinnung von Serum wurden die Mäuse mit einer 2,5%igen Tribromethanol-Lösung narkotisiert (i.p. Injektion) und mit einer heparinisierten Spritze wurde Blut aus dem noch schlagenden linken Ventrikel entnommen. Durch anschließende Zentrifugation (bei 4500 rpm für drei Minuten) wurde das Serum von den zellulären Bestandteilen des Blutes abgetrennt. Das Serum wurde in ein Schraubdeckelgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen linksventrikulären Myokardbiopsien wurden in 300 µl der eisgekühlten hypotonen Tris-Lösung (5 mM Tris-HCl pH 7,5 mit Complete Mini®-Tabletten (Roche) versetzt) sofort mit einem Ultraturrax homogenisiert. Anschließend wurden die Proben mit 1/10 Volumen 10xPBS versetzt und anschließend mit 5%iger Benzonase-Lösung behandelt. Anschließend wurden die Lysate in einer Ultrazentrifuge (Optima TLX Ultrazentrifuge, Beckman) bei 50000 g für 30 Minuten zentrifugiert und der klare Überstand in ein Schraubdeckelgefäß überführt. Die Proben

wurden nach der Proteinbestimmung auf eine einheitliche Konzentration eingestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2 Durchführung des Sandwich ELISA

Die Quantifizierung von IL-1 β und IL-18 im Serum und Gewebe der Caspase-1-transgenen Mäuse wurde mittels käuflich erwerblicher ELISAs entsprechend der Angabe des Herstellers durchgeführt (IL-1 β : Endogen Mouse IL-1 β ELISA[®] Kit, #EMIL1B Pierce, USA ; IL-18: mouse IL-18 ELISA[®], #618, Bender MedSystems, Österreich).

Zu den mit dem jeweiligen Antikörper (coating-Antikörper) vorbeschichteten 96-well ELISA-Platten wurde pro Probe 50 μ l biotinylierter Erstantikörper und 50 μ l Probenlysat bzw. Serum zugegeben. Für die Standardreihe wurde statt der Probe das Standardreagenz, für den Nullabgleich nur Standard-Lösungsmittel zugegeben. Das in der Probe enthaltene Interleukin wird über den coating-Antikörper mit der Platte verbunden, über die Bindung mit dem zugegebenen Erstantikörper an einer anderen Stelle des Interleukins erfolgt die Detektion. Nach einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur und dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden 100 μ l der Lösung eines Peroxidase-gekoppelten Streptavidins zugegeben. Streptavidin und Biotin binden hochaffin im Verhältnis 4:1, wodurch es zu einer selektiven Signalverstärkung der Antigen-Antikörperbindung kommt. Nach einer weiteren Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde erneut 3mal gewaschen, es wurden 100 μ l einer TMB-Lösung zu jeder Probe gegeben und diese 30 Minuten abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Das farblose TMB-Substrat wird in dieser Zeit durch die Peroxidase in einen blauen Farbstoff überführt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe einer Schwefelsäurehaltigen Lösung gestoppt, die pH-Wert-Erniedrigung bewirkt einen Farbumschlag von blau nach gelb (450 nm). Durch Extinktionsmessung dieses Farbstoffes bei 450 nm gegen den internen Kalibrierungsstandard konnte die Proteinmenge unter Verwendung der FLUOstar OPTIMA Software (BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany) ermittelt werden.

V Histologische Methoden

1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Transvers geschnittene Myokardbiopsien wurden durch eine 24stündige Inkubation in 4%iger Paraformaldehydlösung fixiert. Anschließend erfolgte die Dehydratation des Gewebes in einer ansteigenden Isopropanolreihe (30%, 50%, 70%, 85%, 95%, zweimal 100% Isopropanol) um schließlich in Xylol überführt zu werden. Für die Einbettung der entwässerten Gewebeschnitte in Paraffin wurden sie in flüssiges Paraffinwachs gegeben und in Blöcke gegossen. Mit einem Microtom (Leica RM2165) wurden 5 µM dicke Schnitte angefertigt, auf Polylysin-beschichtete Objektträger aufgezogen und bei 42°C getrocknet. Zur Anfärbung wurden die Schnitte zunächst mit Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert.

2 Anfertigung von Gefrierschnitten

Zum Anfertigen von Gefrierschnitten wurde ein Kryostat (Leica CM3050S) verwendet. Die in flüssigem Stickstoff gefrorenen linksventrikulären Myokardbiopsien wurden in dem, auf konstant -20°C gekühlten Innenraum des Kryostats mittels Tissue Tek (Sakura) auf dem Schnittstempel fixiert. Kurz vor dem vollständigen Erhärten des Gewebeklebers wurde die Oberfläche durch Auflegen eines Metallblocks geebnet. Der Schnittstempel wurde entsprechend in den Schneideblock eingespannt und durch sogenanntes Trimmen erfolgte die grobe Annäherung des Gewebeblockes an das manuell bediente Schneidmesser. Nach jeweils einem erfolgten Schnitt von 7 µm wurde dieser auf einen Superfrost Plus Objektträger aufgezogen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Gefrierschnitte bei -80°C gelagert.

3 Histochemische Färbungen

Durch histochemischen Färbungen werden Zellbestandteile spezifisch durch chemische oder enzymatische Reaktionen sichtbar gemacht.

3.1 Siriusrot-Färbung zur Analyse von Myokardfibrose

Zur Anfärbung und Quantifizierung von Fibrose wurden die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte für 45 Minuten in Siriusrot-Lösung (Direct Red 80, Aldrich) inkubiert. Durch die Siriusrot-Färbung wird interstitielles Bindegewebe rot angefärbt, das restliche Gewebe erscheint gelb. Abschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und nach kurzem Benetzen mit Xylol mit Histokit (Roth) eingebettet.

Zur quantitativen Bestimmung der linksventrikulären Fibrose wurde pro Tier ein kompletter Gewebeschnitt durch ein Mikroskop (Leica) bei 200facher Vergrößerung digital fotografiert. Die gefärbten Schnitte wurden mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms Photoshop (Adobe) ausgewertet. Für jeden fotografierten Ausschnitt wurde durch Pixelzählung zunächst die Fläche der Rotfärbung und dann die Gesamtfläche bestimmt. Aus dem Quotient dieser beiden Messwerte kann die Fibroserate in % ermittelt werden. Der Mittelwert aller, auf diese Weise bestimmten Werte pro Gewebeschnitt ergibt die prozentuale Fibrose pro Versuchstier.

Siriusrot-Lösung:	1%ige Siriusrot F3B-Lösung	1 Teil
	gesättigte Pikrinsäurelösung	9 Teile

3.2 Hämatoxylin/Eosin-Färbung zur Analyse von Kardiomyozytenhypertrophie

Zur Analyse der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche wurden die entparaffinierten Schnitte zehn Minuten in Hämatoxylin (Zellkernfärbung) inkubiert, zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen und anschließend zwei Minuten mit Eosin (Zytoplasmefärbung) gegengefärbt. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und nach kurzem Benetzen mit Xylol mit Histokit (Roth) eingebettet.

Für die morphometrische Bestimmung der Kardiomyozyten-Querschnittsflächen wurden die so gefärbten Schnitte durch ein Mikroskop (Leica) bei 200facher Vergrößerung digital fotografiert. Zur Quantifizierung wurden die Kardiomyozyten-Querschnittsflächen, nach manuellem Umfahren, durch Pixelzählung mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms Photoshop (Adobe) ausgemessen. Es wurden ausschließlich solche Herzmuskelzellen mit einem zentral angeschnittenen Zellkern aus Bereichen mit quergeschnittenen Muskelzellen ausgewertet. Pro Behandlungsgruppe und Genotyp wurden mindestens 90 Zellen von sechs bis neun Tieren jeder Gruppe vermessen.

3.3 DHE-Färbung zur Analyse von reaktiven Sauerstoffspezies

Dihydroethidium (DHE) ist ein intrazellulärer Redox-Indikator der zur Bestimmung des Status an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) verwendet wird. Durch Oxidation wird DHE in Ethidium, einen roten, in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff (585 nm) überführt. Die Intensität der Färbung gilt als Maß für die intrazelluläre Generierung an Superoxid-Anionen.

Die 5mM DHE-Lösung (Invitrogen) wurde zunächst mit PBS in die 5 μ M Arbeitslösung verdünnt. Die bei -80°C gelagerten Gefrierschnitte wurden direkt für fünf Minuten mit der

DHE-Lösung bei 37°C inkubiert. Ohne Waschschrift wurden die gefärbten Schnitte mit einem Deckgläschen abgedeckt, und pro Schnitt drei repräsentative Ausschnitte durch ein Mikroskop (Leica) bei 200facher Vergrößerung digital fotografiert. Mit Hilfe des Bildverarbeitungs-Programms Photoshop (Adobe) konnte die mittlere Pixelintensität pro Aufnahme bestimmt werden. Nach Subtraktion dieses Wertes von 265 konnte der Mittelwert als Maß für den ROS-Status pro Versuchstier ermittelt werden.

3.4 TUNEL-Färbung zur Analyse von Kardiomyozytenapoptose

Während Apoptose induzieren DNasen durch Doppelstrangbrüche eine charakteristische Fragmentierung der DNA zu Mono- und Oligonucleosomen, die zu freiliegenden 3'OH-Enden führt. An diese 3'OH-Enden werden mit Hilfe einer terminalen Transferase (TdT) fluoreszenzmarkierte Nucleotide angehängt, wodurch apoptotische Zellkerne optisch sichtbar gemacht werden können (TUNEL, TdT-mediated dUTP nick end labeling). Die TUNEL-Färbung ist eine Standard-Methode zur Detektion von Apoptose.

3.4.1 TUNEL-Färbung von Gewebeschnitten

Zur Durchführung der TUNEL-Färbung im Gewebe wurden die Paraffinschnitte auf Superfrost Plus Objektträger aufgezogen.

Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden zunächst durch eine Behandlung mit Proteinase K permeabilisiert. Hierzu wurde in einer Glasküvette eine 10 mM Tris-Lösung (pH 7,5) mit 1 µg/ml Proteinase-K (Merck) versetzt und auf 37°C vorgewärmt. Die Schnitte wurden 20 Minuten bei 37°C in dieser Lösung inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurde ein RNA-Verdau durchgeführt, um so mögliche falsch-positive Färbungen durch RNA auszuschließen. Dazu wurde jeder Gewebeschnitt mit RNase (5 µg/ml, Sigma) behandelt und für 20 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Zur Gegenfärbung aller Zellkerne wurde Propidiumiodid, ein roter Fluoreszenz-Farbstoff, eingesetzt. Dazu wurden 150 µl einer Propidiumiodid-Lösung (1 mg/ml) in 250 ml PBS in eine Glasküvette gegeben und die gewaschenen Schnitte in dieser Lösung fünf Minuten im Dunklen inkubiert. Pro Schnitt wurden 25 µl der TUNEL-Färbelösung (2,5 µl der Enzymlösung und 22,5 µl der Färbelösung) (In Situ Cell Death Detektion Kit, Fluorescein, #1684795, Roche) auf Eis angesetzt. Nach Applikation dieser TUNEL-Färbelösung auf die Schnitte wurden sie für mindestens eine Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Als Negativkontrolle wurde jeweils ein Gewebeschnitt nur mit Färbelösung behandelt. Durch Fehlen des TdT-Enzymes ist die Anlagerung der fluoreszenz-markierten Nucleotide nicht möglich und ein TUNEL-Fluoreszenzsignal kommt nicht zustande. Zum Erhalt einer Positivkontrolle wurde jeweils ein

Gewebeschnitt vor der Inkubation mit der TUNEL-Lösung zusätzlich mit DNase (Boehringer Ingelheim) zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die DNase werden künstlich DNA-Strangbrüche induziert, wodurch die anschließende TUNEL-Färbung maximal ist, d.h. fast jede Zelle weist eine grüne Fluoreszenz auf und ist demnach TUNEL-positiv. Abschließend wurden die Schnitte gewaschen, nach kurzem Benetzen mit Xylol an der Luft getrocknet und eingebettet (Vectashield Mounting Medium for Fluorescence, Vektor). Durch Aufbewahrung im Dunkeln ist die Färbung mindestens zehn Tage auswertbar.

Zur Auswertung der TUNEL-Färbung wurden die Schnitte durch ein Mikroskop (Leica) bei 200facher Vergrößerung digital fotografiert. Jeweils derselbe Gewebeausschnitt wurde für die Propidiumiodid-Färbung (rote Fluoreszenz) und die TUNE-Färbung (grüne Fluoreszenz) aufgenommen und anschließend mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms Photoshop (Adobe) eine Überlagerung beider Fluoreszenzbilder erstellt. Anschließend wurden die TUNEL-positiven Zellkerne manuell ausgezählt, und auf die mittlere Kardiomyozytenzahl eines solchen Gewebeschnittes bezogen. Ein apoptotischer Kardiomyozytenzellkern muss gleichzeitig eine Propidiumiodid-Zellkernfärbung und eine eindeutig intrazelluläre Lage im Kardiomyozyt aufweist.

3.4.2 TUNEL-Färbung von NRCM

Die Analyse der Kardiomyozytenapoptose *in vitro* wurde 48 Stunden nach adenoviraler Infektion der NRCM durchgeführt. Hierzu wurden 2×10^5 NRCM pro Well auf runden, in 24-well-Zellkulturplatten befindlichen und mit Polylysin vorbeschichteten Deckgläschen ausgesät. Die Zellen wurden mit dem jeweiligen Adenovirus infiziert und für 48 weitere Stunden inkubiert.

Für die anschließende Färbung wurden die NRCM 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 4%iger Paraformaldehydlösung fixiert und anschließend mit einer 0,1% (v/v) Triton-X-100 haltigen Natriumcitrat-Lösung (0,1% m/v) durch zweiminütige Inkubation auf Eis permeabilisiert. Die Färbung mit Propidiumiodid und dem TUNEL-Reagenz erfolgte wie unter Methoden/3.4.1 beschrieben. Zur Auswertung wurden wiederholt pro Bedingung von zwei Deckgläschen jeweils drei repräsentative Ausschnitte bei 200facher Vergrößerung durch ein Mikroskop digital fotografiert. Durch computergestützte Auszählung wurden die TUNEL-positiven Zellkerne (grüne Fluoreszenz) auf die Gesamtzahl an Zellkernen (rote Fluoreszenz) bezogen. Durch Aufbewahrung im Dunkeln ist die Färbung mindestens zehn Tage auswertbar.

In Kombination mit einer anschließend durchgeführten Immunfluoreszenz wurden die Zellen nur fünf Minuten mit 4%iger Paraformaldehydlösung fixiert. Die Zellen wurden permeabilisiert und die TUNEL-Färbung wurde wie bereits beschrieben durchgeführt.

Anschließend wurden die Präparate mit dem 1:2000 verdünnten anti- α Aktinin Antikörper (monoklonal, Klon EA-53, #A-7811, Sigma) bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurde der 1:500 verdünnte Fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (Anti-Maus, 1:250, Alexa Fluor 555, #A31621, Invitrogen) zusammen mit dem Reagenz zur Zellkernfärbung (Hoe33258, Molecular Probes) appliziert und für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach dem abschließenden Waschschrift wurden die Zellen mit Vectashield Mounting Medium (Vector) eingebettet. Bei Aufbewahrung im Dunkeln ist die Färbung mindestens sieben Tage auswertbar.

3.4.3 TUNEL-Färbung von isolierten adulten Mauskardiomyozyten

Für die Analyse der Kardiomyozytenapoptose an isolierten adulten Herzmuskelzellen *ex vivo* wurden diese nach Isolation für 40 Stunden kultiviert.

Die Zellen wurden fünf Minuten bei Raumtemperatur mit 4%iger Paraformaldehydlösung fixiert. Die Färbung mit Propidiumiodid und dem TUNEL-Reagenz erfolgte wie in diesem Teilbereich unter 3.4.1 beschrieben

4 Immunhistochemische Färbungen

Bei immunhistochemischen Färbungen werden im Gewebe enthaltene Proteine spezifisch durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar gemacht.

4.1 Proinflammatorische Zytokine und Entzündungszellen

Die bei -80°C gelagerten Gefrierschnitte wurden auf Eis aufgetaut und mit Aceton bei 4°C für 20 Sekunden fixiert. Zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen wurden die Schnitte mit einer Serummischung (1% (v/v) Ziegen- und Kaninchenserum) für 20 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. 200 μ l der mit PBS verdünnten Erstantikörper wurden für 45 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert, die 1:1000 verdünnten, biotinylierten Zweitantikörper wurden anschließend für 30 Minuten inkubiert. Für die Negativkontrolle wurde ein Gewebeschnitt anstelle von Erstantikörper mit PBS inkubiert. Der biotinylierte Zweitantikörper wird über die hochaffine Bindung mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin für die abschließende Farbreaktion markiert. Hierzu wurde die Peroxidase-gekoppelte Streptavidin-Lösung (3 μ l/ml Enzymlösung, Dako, #p0397, Hamburg, Deutschland) für 30 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. In einer fünfminütigen Inkubation wird das AEC-Färbereagenz (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol, #A5754, Sigma) durch die Peroxidase zu einem braunen Farbstoff umgesetzt, die Reaktion wurde durch Zugabe von 4%iger Formaldehydlösung gestoppt. Nachdem überschüssiger Farbstoff durch kurzes Eintauchen in Wasser abgespült

wurde, wurde das Gewebe, speziell die Zellkerne durch Applikation von Hämatoxylin (Hämatoxylin Gills Nr.3, #GHS332, Sigma) für maximal 20 Sekunden gegengefärbt. Wiederum wurde überschüssige Färbelösung durch kurzes Eintauchen in Wasser entfernt und die Schnitte wurden zu Aufhellung und Fixierung der Färbung für 15 Sekunden in eine gesättigte Lithiumkarbonat-Lösung getaucht. Nach einem abschließenden Waschschrift mit Wasser wurden die noch feuchten Schnitte eingebettet (Immu-Mount Medium, #9990402, ThermoScientific).

Zur Analyse der Chloroacetat-Esterase (CAE) Aktivität (Anfärbung von neutrophilen Granulozyten und Mastzellen), wurden die Schnitte mit Naphthol-AS-D-Chloracetat (#N-0758, Sigma) behandelt und mit Methylgrün (Merck) gegengefärbt.

AEC-Färbereagenz:	AEC	p80 mg
	N,N Dimethylformamid	10 ml
	0,1 M Acetatpuffer	ad 200 ml auffüllen
	Zum Start der Reaktion müssen 200 µl 30%ige H ₂ O ₂ -Lösung zugegeben werden	

0,2 M Acetatpuffer:	0,2 M Essigsäure	250 ml
	0,2 M Natriumacetat-Lösung	750 ml

4% Formaldehydlösung:	0,2 M Acetatpuffer	90 ml
	37% Formaldehyd	20 ml
	Wasser	ad 200 ml

Folgende Liste beinhaltet die für diese Färbung wahlweise verwendeten Antikörper:

Erstantikörper	Zweitantikörper	Verdünnung	Firma
Anti-IL-1 α murin, monoklonal	Anti-Kaninchen	1:1000	MAB 401 R&D
Anti-IL-1 β murin, monoklonal	Anti-Kaninchen	10µg/ml	MAB 30311.11 R&D
Anti-IL-4 murin, monoklonal	Anti-Ziege	10µg/ml	BVD-24G2 BD Pharmingen
Anti-IL-6 murin, monoklonal	Anti-Kaninchen	10µg/ml	MP5-20F3 BD Pharmingen
Anti-TNF α murin, monoklonal	Anti-Kaninchen	1:1000	MP6-XT3 BD Pharmingen

Anti-IGF γ murin, monoklonal	Anti-Kaninchen	1:50	XMG 1,2 BD Pharmingen
Anti-GM-CSF murin, monoklonal	Anti-Ziege	10 μ g/ml	MP1-22E9 BD Pharmingen
Anti-CD3 murin, monoklonal	Anti-Ziege	10 μ g/ml	01511D BD Pharmingen
Anti-CD4 murin, monoklonal	Anti-Kaninchen	10 μ g/ml	01061D BD Pharmingen
Anti-CD8 murin, monoklonal	Anti-Kaninchen	10 μ g/ml	01041D BD Pharmingen
Anti-CD18 murin, monoklonal	Anti-Kaninchen	10 μ g/ml	01661D BD Pharmingen
Anti-CD19 murin, monoklonal	Anti-Kaninchen	10 μ g/ml	09651D BD Pharmingen
<u>Positivkontrolle</u> Anti-CD31(PECAM-1) murin, monoklonal	Anti-Kaninchen	10 μ g/ml	MEC 13,3 BD Pharmingen
<u>Zweitantikörper</u> Biotinylierter anti-IgG in Kaninchen hergestellt	_____	1:100	BA 4001 Vector
<u>Zweitantikörper</u> Biotinylierter anti-IgG in Ziege hergestellt	_____	1:100	BA 9100 Vector

4.2 Komplementkomponente C9-Färbung zur Analyse nekrotischen Zelltods

Zur Detektion von nekrotischem Zelltod wurden Gewebeschnitte durch Fluoreszenzfärbung gegen die Komplementkomponente C9 gefärbt. Hierzu wurden die Gefrierschnitte mit 4%iger Paraformaldehydlösung und -20°C kaltem Aceton jeweils für zehn Minuten inkubiert und anschließend drei Minuten an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen mit einer Serummischung (1% (v/v) Ziegen- und Kaninchenserum) für 30 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Zunächst wurde der 1:50 verdünnte anti-Komplementkomponente C9 Antikörper (anti-NCL-CCC9, Novocastra, Newcastle, England), anschließend der mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff markierte Zweitantikörper (1:1000 verdünnt, Kaninchen anti-Maus, Alexa 555 gekoppelt, Molecular Probes) für eine Stunde auf dem Gewebeschnitt inkubiert. Zur Kontrastfärbung des

Herzmuskelgewebes wurde mit Phalloidin (Alexa Fluor 488 phalloidin, #A-12379, Invitrogen) für sieben Minuten inkubiert. Abschließend wurden die Zellkerne mit DAPI (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Sigma) angefärbt und die Gewebeschnitte eingebettet (Vectashield Mounting Medium for Fluorescence, Vector).

4.3 8-OHdG-Färbung zur Analyse von DNA-Schäden durch oxidativen Stress

Zur Detektion von DNA-Schädigungen durch oxidativen Stress wurden Paraffingewebeschnitte gegen 8-Hydroxydeoxyguanosin (8-OHdG) gefärbt. Durch Inkubation der entparaffinierten und rehydrierten Gewebeschnitte mit 1,5%iger Wasserstoffperoxid-Lösung (Merck) wurde zunächst die endogene Peroxidase blockiert. Durch Aufkochen der Proben für zehn Minuten in EDTA-Puffer und anschließender Inkubation mit einer 5%igen FCS-Lösung (PAN Biotech) für 20 Minuten wurden unspezifische Bindungsstellen abgeblockt. Die Gewebeschnitte wurden mit dem gegen 8-OHdG gerichteten Erstantikörper (7,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-8OHDG Antikörper, #24328, Oxis Intl. Inc. Portland OR, USA) für eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde der biotinylierte Zweitantikörper (EnVision+[®]System-HRP(DAB) for use with mouse primary Antibodies, #K4006, DAKO) und das Peroxidase-gekoppelte Steptavidin zugegeben und für 30 Minuten inkubiert. Nach Waschen der Proben wurde die DAB-Chromogenlösung (Envision+anti-mouse kit, DAKO) für ca. zwei Minuten zugegeben, die enthaltene Substanz DAB wird durch die Peroxidase in einen brauen Farbstoff oxidiert. Abschließend wurden die Gewebe, speziell die Zellkerne durch Applikation von Hämatoxylin (Hämatoxylin Gills Nr.3, #GHS332, Sigma) gegengefärbt und, nach kurzem Benetzen mit Xylol, eingebettet (Histokit, Roth).

VI Physiologische Methoden

1 Methoden zur Analyse der Herzfunktion *in vivo*

1.1 Linksherzkatheterisierung

Die zu untersuchenden Mäuse wurden mit Tribromethanol (13 μl einer 2,5%igen Lösung pro g Körpergewicht) anästhesiert und auf einer Wärmeplatte (39°C) fixiert. Mit Hilfe einer Stereolupe wurde die Arteria carotis (Halsschlagader) freipräpariert und der Mikromanometer-Katheter (Millar Instruments, Houston TX, USA) über eine kleine Inzision in das vorgespannte Gefäß eingeführt. Durch Kontrolle der konstant aufgezeichneten Druckkurve wurde der Katheter durch die Aortenklappe in den linken

Ventrikel vorgeschoben und dort platziert. Anschließend wurde die linke Vena jugularis freipräpariert und eine mit einer mechanisch regulierbaren Mikroliter-Spritze (Hamilton) verbundenen Kunststoffkanüle (Mikroloader, Eppendorf), in das Gefäß eingebracht. Über diesen Zugang konnte während der laufenden Linksherzkatheterisierung Dobutamin intravenös in steigenden Dosen appliziert werden. Die durch die Linksherzkatheterisierung erhaltenen Messdaten wurden mit Hilfe der Software Chart 4.2 (ADInstruments, Castle Hill, Australien) ausgewertet.

1.2 Echokardiographie

Die Echokardiographie wurde bei spontaner Atmung unter leichter Narkose mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran durchgeführt. Die echokardiographischen Messungen (Toshiba PowerVision 6000 Gerät mit einem 15 MHz Schallkopf) wurden von einer routinierten, für den jeweiligen Genotyp geblindeten Fachkraft durchgeführt. Es wurden zweidimensionale, an der kurzen, horizontalen Herzachse durchgeführte Aufnahmen auf mittlerer Höhe des linken Ventrikels aufgezeichnet (1000MHz). Die analogen Messungen wurden im sogenannten M-Mode durchgeführt.

2 Operative Schädigungsmodelle des Herzens

Operative Schädigungsmodelle am Herzen sind eine Möglichkeit um eine Erkrankung *in vivo* zu imitieren.

2.1 Myokardinfarkt zur Induktion einer Herzinsuffizienz

Zur Induktion eines künstlichen Herzinfarktes wurden zwei bis drei Monate alte Mäuse einer operativen Ligation der Koronararterie unterzogen.

Die mit einer Mischung aus Sauerstoff und Isofluran intubierten Mäuse wurden auf einer Wärmeplatte fixiert und der Thorax wurde geöffnet. Nachdem die Koronararterie freipräpariert war, wurde mit einem sterilen Operationsfaden die Ligation gesetzt. Jeweils vier und acht Wochen nach dem Myokardinfarkt wurden echokardiografische Messungen vorgenommen.

Zur Bestimmung der Infarktgröße wurde im explantierten Herz ein midventrikulärer Ring entnommen und Sirius-Rot gefärbte Paraffinschnitte angefertigt. Durch computergestützte planimetrische Analyse wurde die prozentuale Infarktgröße berechnet (Summe endo- und epikardialer Umfänge des Infarktgebietes/ Summe endo- und epikardialer Umfänge des gesamten linken Ventrikels).

2.2 Ischämie/Reperfusion zur Induktion von Apoptose

Für die Induktion von Kardiomyozytenapoptose wurden vier Monate alte Mäuse einer operativen Ischämie/Reperfusion unterzogen.

Die mit einer Mischung aus Sauerstoff und Isofluran intubierten Mäuse wurden auf einer Wärmeplatte fixiert und der Thorax wurde geöffnet. Die linke absteigende Koronararterie (LAD) wurde mit einem Fadenknoten ligiert. Nach 30 Minuten Ligation wurde das Gefäß wieder geöffnet und eine 24stündige Reperfusionsphase eingeleitet. Nach der Reperfusion wurde erneut religiert, und das nicht-ischämische Gewebe durch die Injektion einer 1%igen Evans Blau Lösung (m/v, Sigma) in den linken Ventrikel angefärbt. Nach der Herzentnahme wurde das linksventrikuläre Myokard in fünf transverse Ventrikelringe geschnitten und zehn Minuten in einer 1,5%igen TTC-Lösung (m/v, Sigma) inkubiert. In gesundem Gewebe wird TTC durch oxidative Phosphorylierung durch mitochondriale Dehydrogenasen in einen roten unlöslichen Farbstoff (1,3,5-Triphenylformazan) umgewandelt. Ischämisches Gewebe wird infolgedessen rot angefärbt, das Infarktgewebe bleibt ungefärbt. Jeder dieser Ventrikelringe wurde gewogen und anschließend für 24 Stunden in 4%iger Paraformaldehydlösung fixiert. Abschließend wurden die Schnitte von jeder Seite bei sechsfacher Vergrößerung durch eine Stereolupe digital fotografiert. Zur prozentualen Anteilsbestimmung des ischämischen Bereiches (AAR, Area at risk, positive TTC-Färbung, rot) und des Infarktgebietes (IA, infarct area, ungefärbt) am gesamten linken Ventrikel wurden die gefärbten Teilbereiche der linksventrikulären Geweberinge mit Hilfe des Bildverarbeitungs-Programms Photoshop (Adobe) durch Pixelzählung ausgewertet.

VII Statistische Auswertung der Ergebnisse

Abbildungen von Herzen und Gewebeschnitten wurden unter Zuhilfenahme der Programme Photoshop und Illustrator (Adobe) erstellt. Für die Auswertung und graphische Darstellung von Daten wurden die Programme Excel (Microsoft) und Prism (GraphPad) verwendet.

Die angegebenen Messwerte stellen, wenn nicht anders angegeben, Mittelwerte dar. Als Fehlermaß wurde der Standardfehler verwendet. Der Student t-Test wurde zur Signifikanzprüfung von Unterschieden verwendet. Für vergleichende Analysen verschiedener Gruppen wurde eine Varianzanalyse durchgeführt, an die ein Bonferroni-Test angeschlossen wurde.

ERGEBNISSE

I Verstärkte Expression der Caspase-1 bei Herzinsuffizienz

Zur Identifizierung neuer Kandidatengene, die an der Entwicklung einer Herzinsuffizienz beteiligt sind, wurde eine cDNA Array Expressions-Analyse durchgeführt. Es wurde die Expression von 1176 Genen analysiert. Als murines Modell einer Herzinsuffizienz wurden Mäuse mit transgener Expression des β_1 -adrenergen Rezeptors (β_1 AR-transgenen) verwendet. Durch die herzzpezifische Überexpression des β_1 -adrenergen Rezeptors wird in diesen Mäusen die chronische Aktivierung der β_1 -adrenergen Rezeptoren bei einer Herzinsuffizienz imitiert. β_1 AR-transgene Mäuse zeigen bereits ab dem Alter von zwei Monaten eine signifikante Kardiomyozytenhypertrophie. Ab dem vierten Lebensmonat ist die progressive Einschränkung der linksventrikulären Herzfunktion sichtbar, die das klinische Bild einer Herzinsuffizienz beim Menschen widerspiegelt (Engelhardt, Hein et al. 1999). Für den cDNA Array wurde linksventrikuläres Gewebe von vier Monate alten β_1 AR-transgenen Tieren und entsprechenden Wildtyp-Geschwistertieren als Referenzgruppe verwendet.

1 Verstärkte Expression der Caspase-1 in einem murinen Herzinsuffizienzmodell

Neben anderen Kandidatengenen, wie dem Egr-Repressor NAB1 (Buitrago, Lorenz et al. 2005), wurde in dem cDNA Array eine verstärkte Expression der Caspase-1 in den β_1 AR-transgenen Mäusen identifiziert.

Die verstärkte Caspase-1-Expression bei muriner Herzinsuffizienz wurde in diesen Mäusen zunächst auf mRNA- und Proteinebene verifiziert. Mittels quantitativer real-time PCR mit linksventrikulärem Gewebe sechs Monate alter, β_1 AR-transgener Mäuse wurde eine signifikant erhöhte mRNA-Expression gezeigt (siehe Abb. 8). Die Detektion der Proteinexpression in den β_1 AR-transgenen Mäusen wurde mit Western Blot Analyse durchgeführt. Um die Caspase-1-Expression altersabhängig, also während dem Voranschreiten der Herzinsuffizienz zu untersuchen, wurden linksventrikuläre Proteinlysate von fünf und zwölf Monate alten β_1 AR-transgenen Mäusen und entsprechenden Wildtyptieren untersucht. Die Quantifizierung der Western Blot Analyse zeigte eine zur Progression der Herzinsuffizienz parallele, progressiv zunehmende Caspase-1-Proteinexpression, die im Alter von zwölf Monaten ca. dreifach gegenüber dem Wildtyp erhöht ist (siehe Abb. 8).

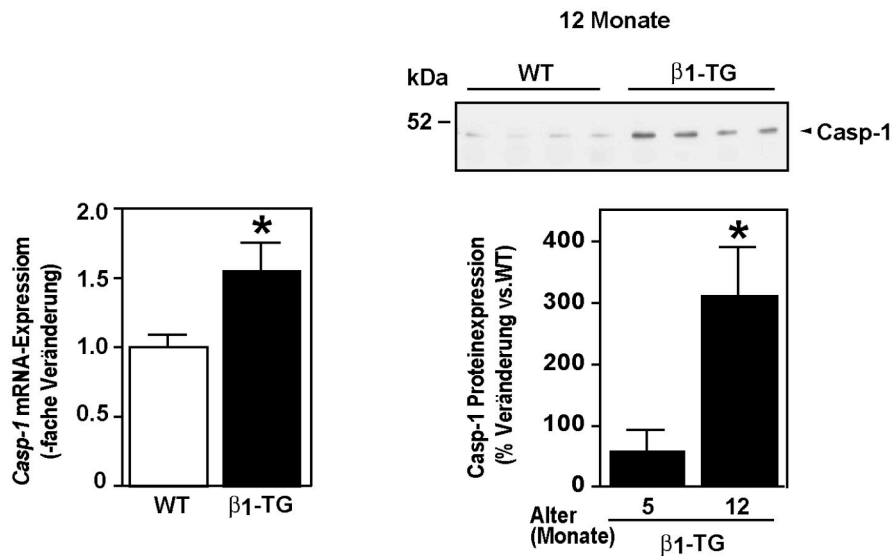


Abbildung 8: Verstärkte Expression der Caspase-1 bei muriner Herzinsuffizienz. (Links) Quantitative real-time PCR von sechs Monate alten β_1 AR-transgenen Mäusen und entsprechenden Wildtypieren (n=4 pro Genotyp). (Rechts) Auswertung der Western Blot Analyse für Caspase-1 mit Proteinlysaten aus linksventrikulärem Myokard von fünf und zwölf Monate alten β_1 AR-transgenen Mäusen und Wildtyp-Geschwistertieren (n=4-5). (Rechts oben) Darstellung eines Western Blots für Caspase-1 von zwölf Monate alten β_1 AR-transgenen Mäusen und Wildtyp-Geschwistertieren (40 mg Protein eingesetzt, Detektion mit anti-Caspase-1-Antikörper).

2 Verstärkte Expression der Caspase-1 bei humaner Herzinsuffizienz

Als nächstes sollte untersucht werden, ob das in dem murinen Herzinsuffizienzmodell detektierte Expressionsmuster für Caspase-1 auch bei humaner Herzinsuffizienz zu finden ist. Dazu wurde die Caspase-1-Expression in linksventrikulären Myokardproben von herzinsuffizienten Patienten mit der im Myokard von nicht-insuffizienten Personen verglichen. Auf mRNA-Ebene konnte mittels quantitativer real-time PCR ein eindeutiger Trend zu einer erhöhten Expression in insuffizienten Herzen nachgewiesen werden. Dieser erreichte jedoch aufgrund der hohen Streuung in der Herzinsuffizienz-Gruppe keine Signifikanz. Auf Proteinebene war eine deutliche, signifikant erhöhte Caspase-1-Expression sichtbar (siehe Abb. 9). Die quantitative Auswertung der Western Blot Analyse zeigte eine Zunahme der Caspase-1-Proteinexpression im insuffizienten Herz um ca. 100%.

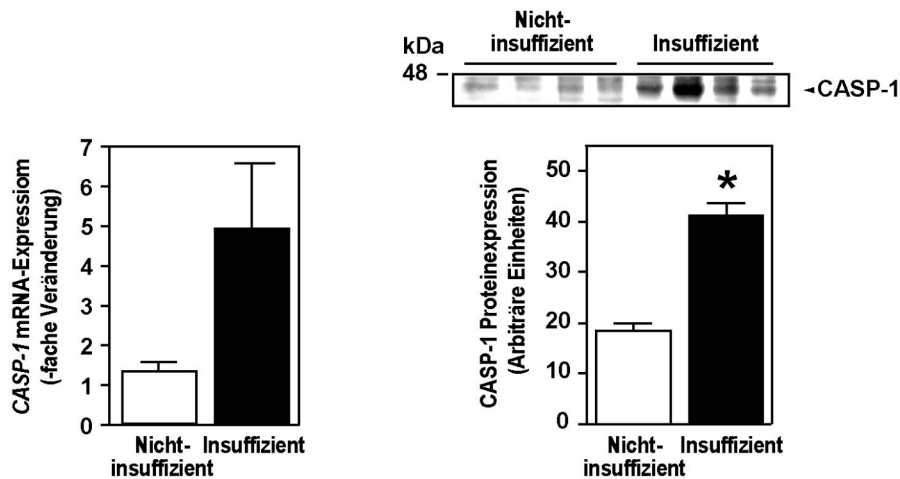


Abbildung 9: Verstärkte Expression der Caspase-1 bei humaner Herzinsuffizienz. (Links) Quantitative real-time PCR von humanen insuffizienten und nicht-insuffizienten linksventrikulären Myokardproben (n=19-22). (Rechts) Auswertung der Western Blot Analyse für Caspase-1 mit Proteinlysaten aus humanen insuffizienten und nicht-insuffizienten linksventrikulären Myokardproben (n=4). (Rechts oben) Darstellung des Western Blots für Caspase-1 mit humanen Proteinlysaten (35 mg Protein eingesetzt, Detektion mit anti-Caspase-1 Antikörper).

II Induktion von Herzinsuffizienz durch kardiale Caspase-1

Um die Konsequenz dieser verstärkten Caspase-1-Expression *in vivo* zu untersuchen, wurden Caspase-1-transgene Mäuse generiert.

1 Generierung von Caspase-1-transgenen Mäusen

Zur herzspezifischen Überexpression der Caspase-1 in transgenen Mäusen wurde ein Transgenvektor kloniert, der die humane α -Isoform der Caspase-1 unter der Kontrolle des murinen α -Myosin-heavy-chain-Promotors (α -MHC-Promotors) exprimiert. Da dieser Promotor im pränatalen Herz in den Vorhöfen, nicht aber in den Ventrikeln aktiv ist, können Defekte in der ventrikulären Herzentwicklung ausgeschlossen werden. Die Transgen-Expression in den Ventrikeln setzt erst mit der Geburt ein (Ng, Grupp et al. 1991; Palermo, Gulick et al. 1996). Das dem Simian Virus 40 (SV40) entstammende Intron SV40 dient der Verbesserung der transgenen Expressionsstärke. Terminiert wird das 3'-Ende des Transgenkonstruktes mit einer Poly(A)-Sequenz (siehe Abb. 10).

Das aufgereinigte und linearisierte, den Transgenvektor enthaltende Plasmid wurde durch pronukleäre Injektion in Oozyten überführt, die dann in pseudoträchtige Ammen-Weibchen eingepflanzt wurden. Durch die Verwendung eines Primerpaares, das nur in transgenen Tieren ein PCR-Produkt ergibt, wurden die Tiere der F₀-Generation auf Integration der Transgenkassette untersucht (siehe Abb. 10). In der F₀-Generation konnten auf diese Weise vier sogenannte Gründertiere identifiziert werden, wovon sich lediglich zwei Tiere, Maus 1 und 10, als Keimbahnträger erwiesen. Durch heterozygote

Verpaarung dieser zwei Gründertiere konnten zwei individuelle transgene Mauslinien etabliert werden. Sie werden nachfolgend, der Gründermaus entsprechend, Casp-1 TG1 und Casp-1 TG10 genannt.

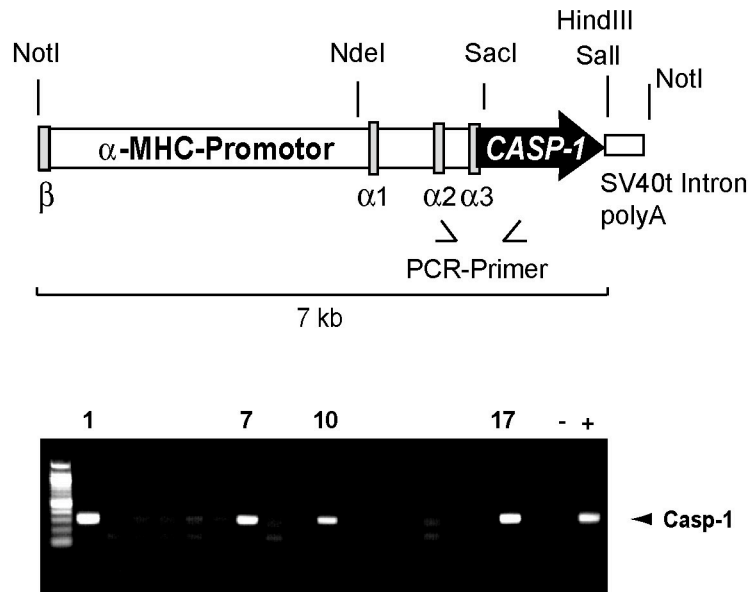


Abbildung 10: Generierung transgener Mäuse mit herzspezifischer Überexpression der Caspase-1. (Oben) Schematische Darstellung des Promotor-cDNA-Konstrukts α -MHC-Caspase-1. Die Lage der Genotypisierungsprimer ist mit den Pfeilen gekennzeichnet. β , α_1 , α_2 und α_3 stehen für die Exons des β - und α -Mhc Gens. Die für die Klonierung wichtigen Restriktionsenzyme sind oberhalb des Transgenvektors angegeben. (Unten) Polymerase-Kettenreaktion zur Genotypisierung der F₀-Generation. Maus 1 und 10 erwiesen sich als Keimbahnüberträger und dienten zur Etablierung der beiden Transgenlinien Casp-1 TG1 und Casp-1 TG10.

Das Ausmaß der transgenen Caspase-1 Proteinexpression im Vergleich zur endogen exprimierten Caspase-1 im Wildtyp wurde mittels Western Blot Analyse bestimmt. Dazu wurden Proteinlysate aus linksventrikulärem Myokard von Caspase-1-transgenen Mäusen der Linien Casp-1 TG1 und Casp-1 TG10 und den entsprechenden Wildtyp-Geschwistertieren verwendet. Um die transgene Caspase-1 Proteinexpression im direkten Vergleich zur endogenen Caspase-1-Expression zu ermöglichen wurden die Wildtyp-Proteinlysate 1:5 verdünnt. Bei der Quantifizierung der Western Blots wurde dieser Verdünnungsfaktor berücksichtigt. Für die Linien Casp-1 TG1 und Casp-1 TG10 konnte so eine 30-fach bzw. 50-fach erhöhte Proteinexpression der Caspase-1 im Vergleich zu der endogen exprimierten Caspase-1 ermittelt werden.

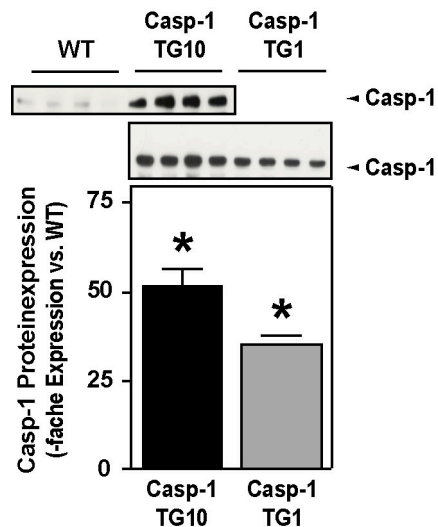


Abbildung 11: Etablierung von zwei individuellen transgenen Mauslinien, Casp-1 TG1 und Casp-1 TG10. Western Blot Analyse zur Quantifizierung der transgen exprimierten Caspase-1 in den Linien Casp-1 TG1 und Casp-1 TG10 im Vergleich zur endogenen Caspase-1 Proteinexpression im Wildtyp. Verwendet wurden linksventrikuläre Proteinlysate von sechs Wochen alten Mäusen (Detektion mit anti-Caspase-1 Antikörper, n=4 pro Genotyp).

Zum Nachweis der Herzspezifität der Transgenexpression durch den α -MHC-Promotor wurde das Protein-Expressionsmuster der Caspase-1 für die Organe Herz, Lunge, Milz, Leber, Muskel und Gehirn angefertigt. Eingesetzt wurden hierbei, jeweils aus drei Tieren gepoolte, linksventrikuläre Proteinlysate von Caspase-1-transgenen Mäusen und Wildtyp-Tieren. In beiden Versuchsgruppen wurde eine endogene Caspase-1 Proteinexpression in Lunge und Milz detektiert (siehe Abb.12, oben) Wie auch in der Literatur beschrieben, zeigen diese beiden Organe die höchste endogene Caspase-1-Expression (Nett, Cerretti et al. 1992; Kamens, Paskind et al. 1995). Im Herzlysate Caspase-1-transgener Mäuse war eine zusätzliche Bande detektierbar, die der transgenen Caspase-1 Proteinexpression entspricht (siehe Abb. 12).

Neben dem Nachweis der Organspezifität war der Nachweis der korrekten Transgen-Expression für die Funktionalität des transgenen Mausmodells entscheidend. Die Western Blot Analyse mit Proteinlysaten Caspase-1-transgener Mäuse zeigte neben der korrekten Expression der Proform der Caspase-1 (45 kDa) eine weitere spezifische Bande, das bei der Prozessierung entstehende Intermediat (30 kDa) (siehe Abb. 12). Darüber hinaus wurde eine altersabhängige Reduktion der Caspase-1-Expression sichtbar, die vermutlich auf einer Abnahme der α -MHC-Promotoraktivität zugunsten einer β -MHC-Promotoraktivierung in insuffizienten Herzen beruht.

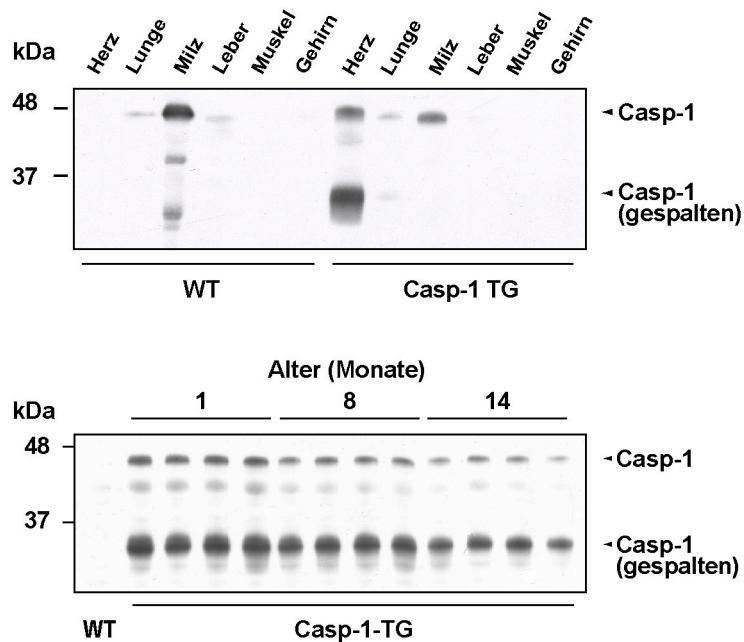


Abbildung 12: Expression und Prozessierung der transgen exprimierten Caspase-1. (Oben) Western Blot Analyse mit Proteinlysaten aus linksventrikulärem Myokard, Lunge, Milz, Leber, Muskel und Gehirn. Eingesetzt wurden gepoolte Proben von jeweils drei Tieren pro Genotyp (35 µg Protein eingesetzt, Detektion mit Anti-Caspase-1 Antikörper). (Unten) Western Blot Analyse mit linksventrikulärem Myokard aus eins, acht und vierzehn Monate alten Caspase-1-transgenen Mäusen und Wildtypen (35 µg Protein eingesetzt, Detektion mit anti-Caspase-1 Antikörper).

2 Linksventrikuläres Remodeling und Herzinsuffizienz in Caspase-1-transgenen Mäusen

Remodeling stellt kurzfristig einen adaptiven Vorgang dar, anhaltendes Remodeling, beispielsweise nach einem Myokardinfarkt oder bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz ist ein pathologischer Prozess. Im Zusammenhang mit Herzmuskelschwäche stellt linksventrikuläres Remodeling einen spezifischen Umbauvorgang (engl: remodeling) dar, der zu Änderungen in der Ventrikelarchitektur (Myokardfibrose, Myozytenhypertrophie und linksventrikuläre Dilatation) und somit der Ventrikelfunktion führt. Um einen umfassenden Überblick über kardiale Remodeling-Prozesse in den Caspase-1-transgenen Mäusen zu erhalten, wurden die meisten der nachfolgenden Untersuchungen zur kardialen Phänotypisierung für ein bis 14 Monate alte Mäuse durchgeführt.

2.1 Progressive Myokardfibrose

Unter kardialer Fibrose versteht man die krankhaft vermehrte Bildung von interstitiellem Bindegewebe in das Myokard, mit der Folge einer Einschränkung der Herzkontraktilität. Zur Analyse der Myokardfibrose in Caspase-1-transgenen Mäusen wurden Paraffinschnitte des linksventrikulären Myokards angefertigt und mit Siriusrot gefärbt. Mit dieser Färbung wird interstitielles Bindegewebe in Rot angefärbt, das restliche Myokard erscheint in Gelb. Die Quantifizierung der Myokardfibrose zeigte, dass Mäuse

mit transgener Caspase-1-Expression beginnend mit dem vierten Lebensmonat eine progressive Fibrosierung im linksventrikulären Myokard aufweisen (siehe Abb. 13). In der transgenen Mauslinie Casp-1 TG1 war die Fibrosierung im Vergleich zur Linie Casp-1 TG10 weniger stark ausgeprägt. Interessanterweise zeigte sich in den jungen, einen Monat alten Caspase-1-transgenen Mäusen keine verstärkte Einlagerung von interstitiellem Bindegewebe.

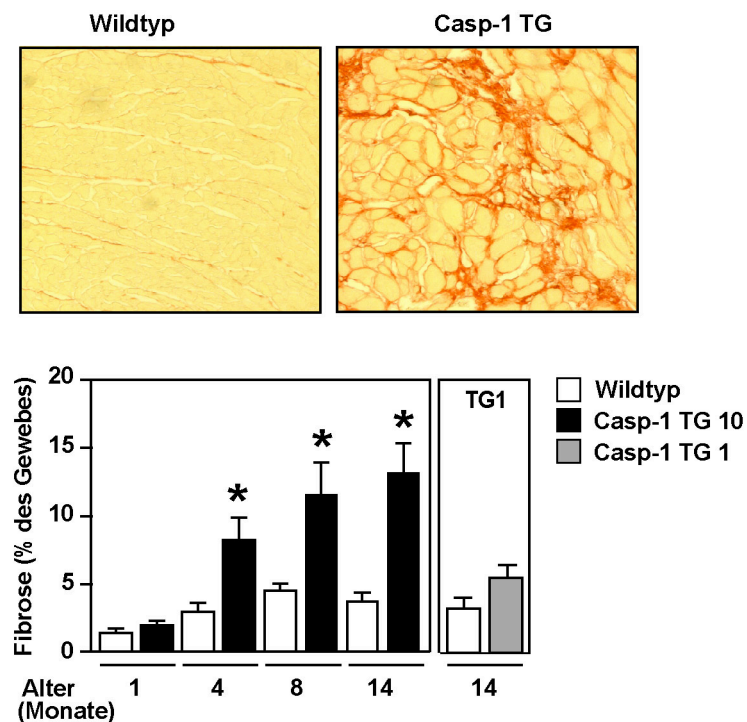


Abbildung 13: Caspase-1-transgene Mäuse entwickeln Myokardfibrose. (Oben) Siriusrot-Färbung von transversen linksventrikulären Herzgewebeschnitten von 14 Monate alten Caspase-1-transgenen Mäusen und Wildtyp-Geschwistertieren. (Unten) Quantitative Auswertung der linksventrikulären Myokardfibrose in ein, vier, acht und vierzehn Monate alten Caspase-1-transgenen Mäusen und Wildtyp-Tieren mittels semi-quantitativer, Computer-gestützter Bildanalyse. Ausgewertet wurden vier repräsentative, linksventrikuläre Gewebeausschnitte pro Tier (n=3-6 Tiere pro Gruppe).

Parallel zu der im Herzmuskelgewebe sichtbar werdenden Myokardfibrose war auch auf mRNA-Ebene ein verstärktes Expressionsmuster Fibrose-assoziiierter Gene ab dem vierten Lebensmonat detektierbar. Mit real-time PCR wurde die Expression der kardialen Isoformen der Kollagene (Col1 α 2, Col3 α 1), der MMPs (Mmp-2, -9) und der TIMPs (Timp-1, -2) auf mRNA-Ebene in ein und vier Monate alten Tieren quantifiziert. Für alle analysierten Gene war ab dem vierten Monat eine signifikante Zunahme der Expression sichtbar (siehe Abb. 14), für Timp-2 war dies erst ab dem achten Lebensmonat der Fall (Daten sind nicht abgebildet).

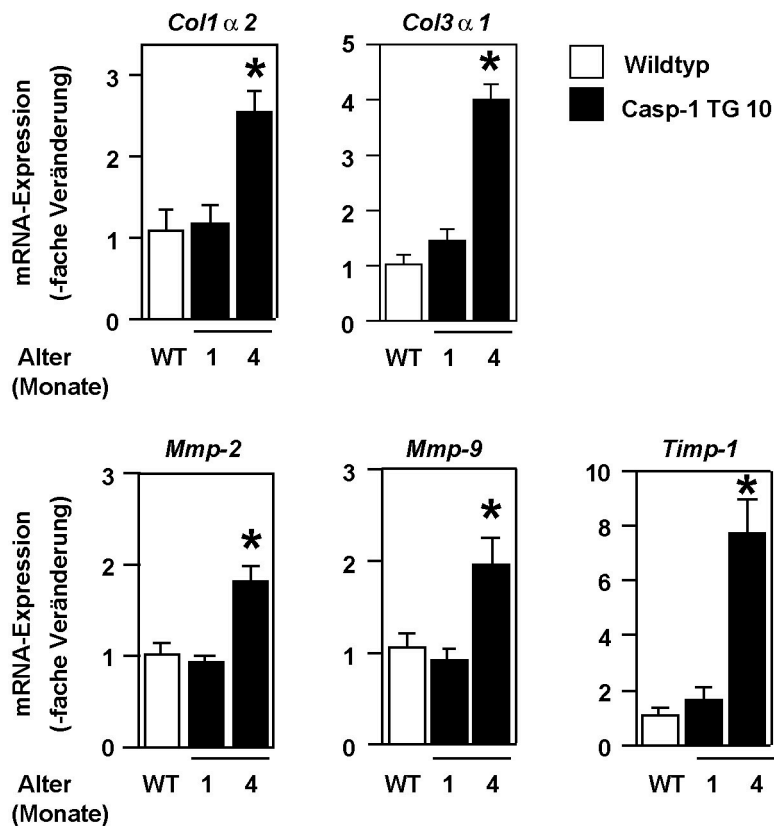


Abbildung 14: Verstärkte Expression Fibrose-assoziiierter Gene in Caspase-1-transgenen Mäusen. Quantifizierung der mRNA-Expression von *Col1α2*, *Col3α1*, *Mmp-2*, *Mmp-9*, *Timp-1* durch Real-time PCR in Herzgewebe von einem und vier Monate alten Wildtyp und Caspase-1-transgenen Mäusen (n=4-7 pro Genotyp).

2.2 Progressive Kardiomyozytenhypertrophie

Zur Analyse der Kardiomyozytenhypertrophie wurden in Paraffin gebettete linksventrikuläre Myokardschnitte mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Die morphometrische Analyse der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche veranschaulichte eine deutliche, progressive Zunahme der Kardiomyozytengröße ab dem vierten Lebensmonat (siehe Abb. 15). Analog zur Myokardfibrose zeigten die einen Monat alten Tiere kein hypertrophes Kardiomyozytenwachstum. In der Linie Casp-1 TG1 war in den 14 Monate alten Tieren eine signifikante, aber entsprechend der niedrigeren Caspase-1-Expression, geringere linksventrikuläre Kardiomyozytenhypertrophie detektierbar (siehe Abb. 15). Neben der Bestimmung der Myozyten-Querschnittsfläche im Gewebeschnitt wurden adulte Kardiomyozyten von Caspase-1 und Wildtyp-Geschwistertieren isoliert und an diesen Längen- und Breitenmessungen vorgenommen. Caspase-1-transgene Herzmuskelzellen zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Kardiomyozyten eine deutliche Breitenzunahme um durchschnittlich 42% und ein geringes Längenwachstum von 11% (siehe Abb. 15). Überraschenderweise war trotz alledem die ventrikuläre Masse, berechnet durch das Verhältnis aus Ventrikelgewicht (VG, mg) zu Körpergewicht

(KG,g), in den Caspase-1-transgenen Mäusen zu keinem analysierten Zeitpunkt gegenüber der Wildtyp-Kontrollgruppe erhöht (siehe Abb. 15).

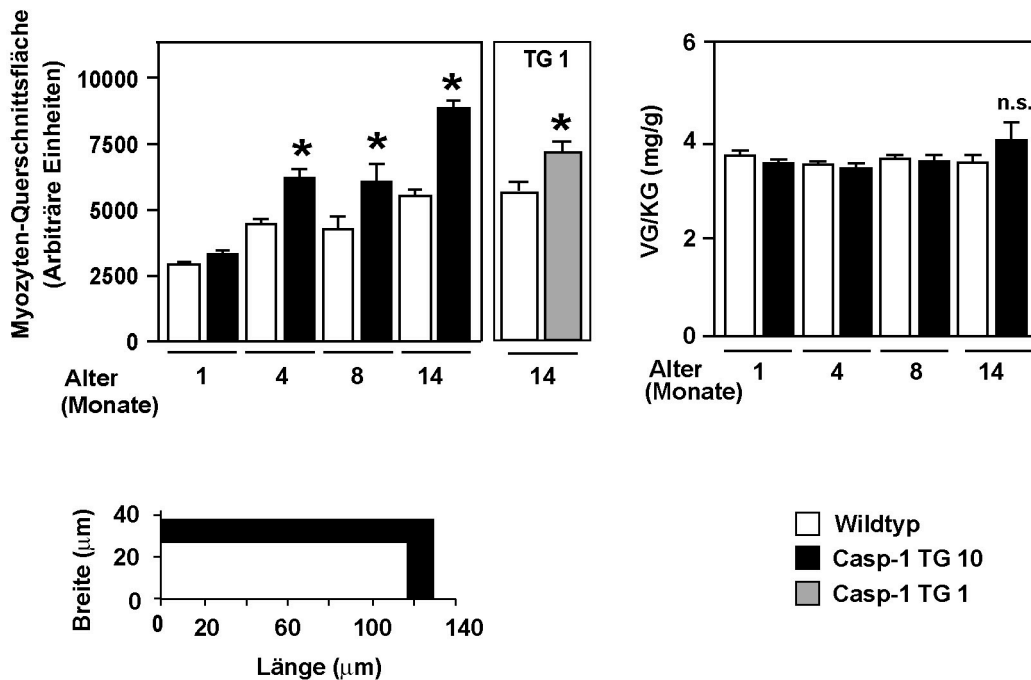


Abbildung 15: Caspase-1-transgene Mäuse entwickeln Kardiomyozytenhypertrophie bei unverändertem Herzgewicht. (Links) Morphometrische Analyse der Myozyten-Querschnittsfläche in linksventrikulären Gewebeschnitten von ein, vier, acht und vierzehn Monate alten Caspase-1-transgenen Mäusen und Wildtyp-Tieren nach Hämatoxylin/Eosin-Färbung. Pro Genotyp wurden 100-120 Einzelzellen analysiert (n=4-6 Tiere pro Gruppe). (Rechts) Analyse des Ventrikel- zu Körpergewichtverhältnisses (mg/g) in ein, vier, acht und vierzehn Monate alten Caspase-1-transgenen Mäusen und Wildtyp-Tieren (n=4-8). (Unten) Längen-, und Breitenmessung der Zelldimensionen isolierter, adulter Kardiomyozyten von Caspase-1-transgenen Mäusen und Wildtyp-Tieren. Mindestens 60 Zellen pro Genotyp wurden durch computergestützte Analyse vermessen.

Hypertrophie und Herzinsuffizienz führen zu charakteristischen qualitativen und quantitativen Änderungen der Genexpression im Myokard, von zentraler Bedeutung ist hierbei die Wiederanschaltung des sogenannten fetalen Genexpressionsprogramms. Darunter versteht man die Reexpression diverser fetaler Gene, bzw. deren Expression in der für die Embryonalentwicklung typischen Isoform. Die klassischen Vertreter sind hierbei neben den kontraktilen Proteinen wie α -Aktin und β -MHC die Peptidhormone ANF und BNP. Ferner werden zentrale Enzyme des Ca^{2+} -Haushaltes, beispielsweise SERCA verändert exprimiert.

Mittels quantitativer real-time PCR wurde die mRNA-Expression der Gene *Anf*, *β -Mhc* und *Serca* im Myokard von einem und vier Monate alten Caspase-1-transgenen Mäusen und Wildtyp-Tieren gemessen. Ab dem vierten Lebensmonat zeigte sich eine verstärkte Reexpression von *Anf* und *β -Mhc* und eine Reduktion des Ca^{2+} -Regulators *Serca* in Herzen mit transgener Caspase-1 Expression (siehe Abb. 16). Erneut waren die jungen, einen Monat alten Caspase-1-transgenen Mäuse bezüglich Veränderungen auf mRNA-Ebene gegenüber den Wildtyp-Geschwistertieren unauffällig.

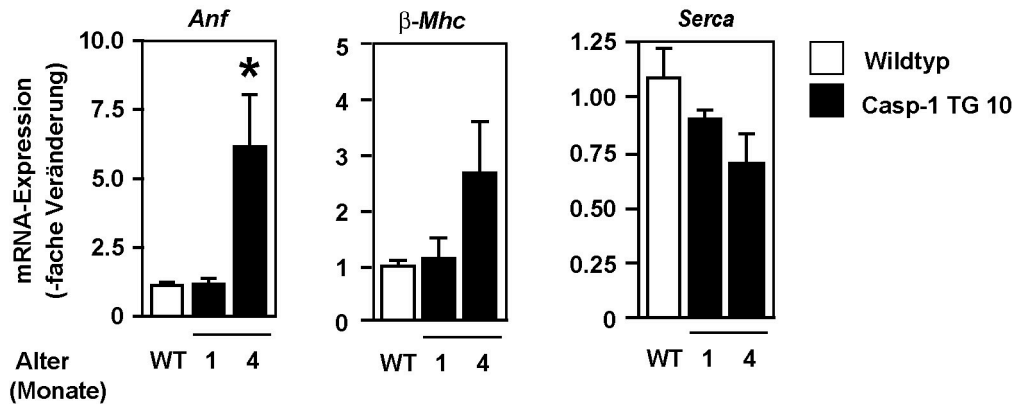


Abbildung 16: Reexpression des fetalen Genexpressionsprogrammes in Caspase-1-transgenen Mäusen. Quantitative Analyse der mRNA-Expression von *Anf*, *β -Mhc* und *Serca* in ein und vier Monate alten Caspase-1-transgenen Mäusen und Wildtypieren (n=4-6).

2.3 Dilatation des linken Ventrikels

Zur makroskopischen Analyse der Herzgeometrie wurden perfusionsfixierte und paraffineingebettete Herzen mit dem Mikrotom geschnitten und mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. In Abbildung 15 sind repräsentative Präparate solcher im sogenannten Vier-Kammerblick geschnittenen Herzen von Caspase-1-transgenen Mäusen und Wildtypieren abgebildet. Die Wildtypherzen zeigten keine morphologischen Veränderungen in Ventrikelform und -größe, auch die Vörrhöfe waren anatomisch normal. Junge, zwei Monate alte Caspase-1-transgene Mäuse waren auch bei der makroskopischen Betrachtung des Herzes phänotypisch unauffällig. Neun Monate alte Herzen mit transgener Caspase-1-Expression zeigten deutliche morphologische Veränderungen, die charakteristisch für ein insuffizientes Herz sind (siehe Abb. 17). Neben der Dilatation des linken Ventrikels war eine Reduktion der linksventrikulären Wanddicke besonders im apikalen Bereich sichtbar. Häufig sah man zudem Vorhofdilatation und Thrombusbildung im Vorhof.

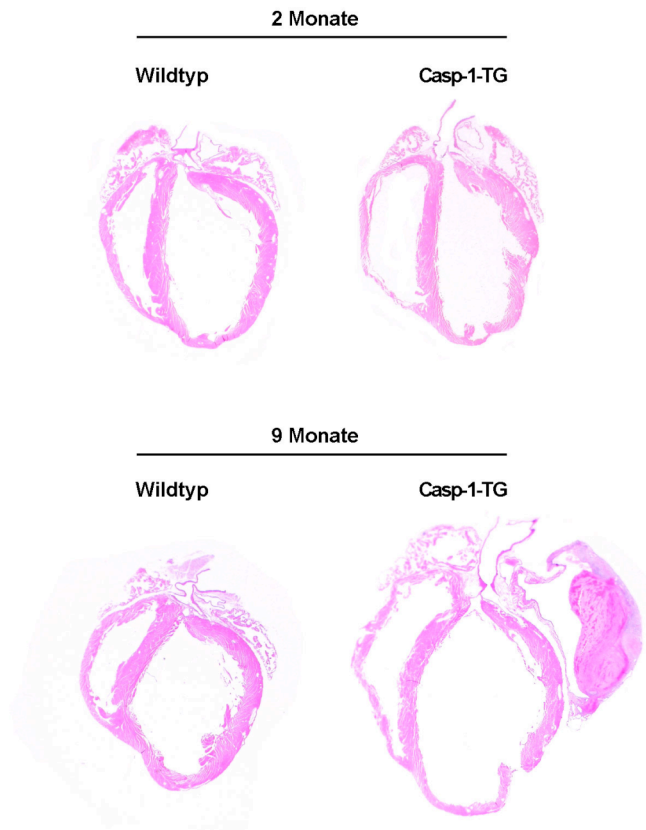


Abbildung 17: Caspase-1-transgene Mäuse entwickeln eine Ventrikeldilatation und eine reduzierte linksventrikuläre Wanddicke. Repräsentative longitudinale Schnitte von perfusionsfixierten Herzen nach Färbung mit Hämatoxylin/Eosin.

2.4 Verminderte linksventrikuläre Herzfunktion

Um den Einfluss der transgen exprimierten Caspase-1 auf die Herzfunktion *in vivo* zu analysieren, wurde eine Linksherzkatheterisierung an narkotisierten Mäusen durchgeführt. Über die rechte Arteria carotis wurde der Katheter (mit einem miniaturisiertem Druckaufnehmer an der Spitze) in den linken Ventrikel vorgeschoben. Dessen korrekte Position wurde durch Kontrolle der linksventrikulären Druckkurve bestimmt. Aus der ventrikulären Druckkurve wurde die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{max}) als Maß für die Kontraktilität des linken Ventrikels berechnet. Um die Funktionalität des Herzens unter zunehmender Belastung im Sinne einer Dosis-Wirkungskurve zu testen, wurden die Kathetermessungen unter Basalbedingungen und während einer sogenannten Dobutamin-Stresskurve durchgeführt (siehe Abb. 18). Über die linke Vena jugularis wurde Dobutamin, ein Sympathomimetikum, in steigenden Konzentrationen und festen Zeitabständen intravenös zugeführt. Durch Messung nahezu identischer Herzfrequenzen (min^{-1}) konnten identische Versuchsbedingungen bezüglich der Narkosetiefe für beide Kollektive sichergestellt werden. Herzen Caspase-1-transgener Mäuse zeigten sowohl

unter Basalbedingungen als auch unter Stressbedingungen eine signifikant reduzierte Herzkontraktilität (dp/dt_{max}), die um ca. 2000 mmHg/s unter dem Wildtypwert lag. Auch der aus der Herzkathetermessung berechnete, linksventrikuläre end-diastolische Druck (LVEDP), ein weiterer Parameter zur Beurteilung einer Herzmuskelschwäche, war im Caspase-1-transgenen Herz deutlich erhöht. Die eingeschränkte linksventrikuläre Kontraktilität spiegelte sich zudem in einem erniedrigten linksventrikulären Druck (LVP) wieder.

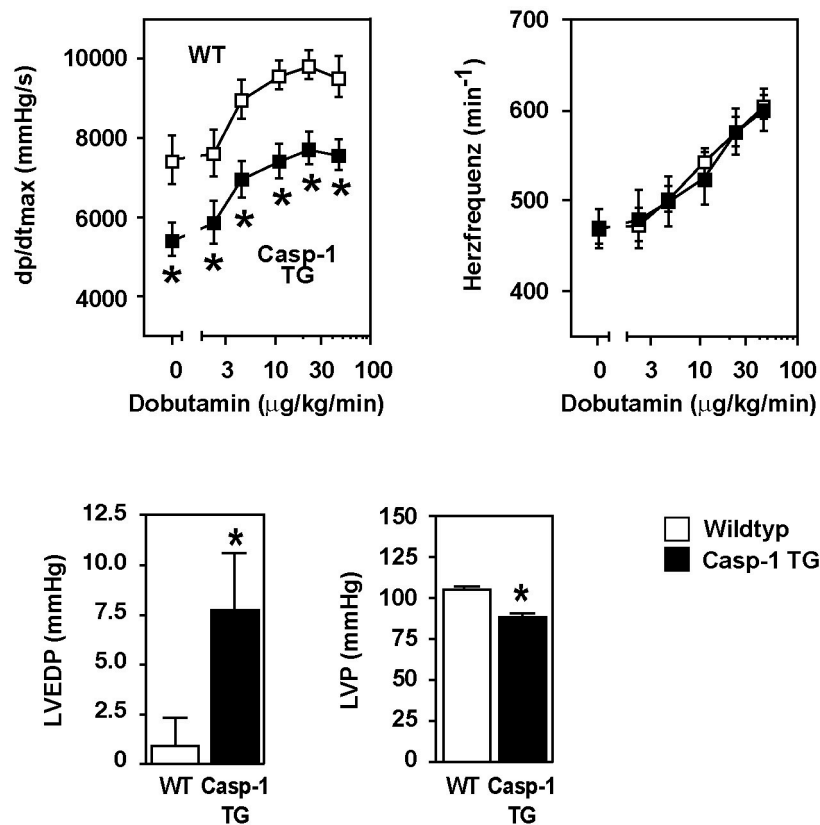


Abbildung 18: Caspase-1-transgene Mäuse entwickeln eine eingeschränkte linksventrikuläre Herzfunktion. Linksherzkathetermessung von Caspase-1-transgenen Mäusen und entsprechenden Wildtypieren zur Bestimmung der Hämodynamik *in vivo* (zwölf Monate alt, $n=7-9$). Dobutamin wurde über die linke V. jugularis zugeführt. (Oben) Aus dem Verlauf der Druckkurve wurde die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit dp/dt_{max} ermittelt, die als Maß für die linksventrikuläre Kontraktilität dient. Die Herzfrequenz war nahezu identisch. (Unten) Bestimmung des linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVEDD, mmHg) und des linksventrikulären Blutdrucks (LVP, mmHg) unter Basalbedingungen.

Mit Hilfe der Echokardiographie kann man neben der Bestimmung der Herzkontraktilität (FS, Verkürzungsfraction) auch detaillierte Information über die Morphologie des Herzens gewinnen. So kann beispielsweise die intraventrikuläre Fläche des linken Ventrikels während der Systole und der Diastole zur Beurteilung einer linksventrikulären Dilatation herangezogen werden.

Herzen Caspase-1-transgener Mäuse der Linie Casp-1 TG10 zeigten eine stark ausgeprägte Zunahme der endsystolischen und enddiastolischen Fläche im Vergleich

zur entsprechenden Wildtyp-Kontrollgruppe. Die ventrikuläre Dilatation war in Herzen der geringer exprimierenden Linie Casp-1 TG1 erwartungsgemäß reduziert. Durch Analyse der Verkürzungsfraction konnte die, durch Linksherzkathetermessungen bestimmte signifikante Reduktion der linksventrikulären Myokardkontraktilität in Caspase-1-transgenen Mäusen bestätigt werden. Auch hier war, entsprechend dem Ausmaß der Transgen-Expression, ein deutlicherer Effekt in Mäusen der Linie Casp-1 TG10 als bei Mäusen der Linie Casp-1 TG1 zu verzeichnen (siehe Abb. 19). Identische Herzfrequenzwerte stellten vergleichbare Versuchsbedingungen bezüglich Narkosetiefe für alle drei Kollektive sicher.

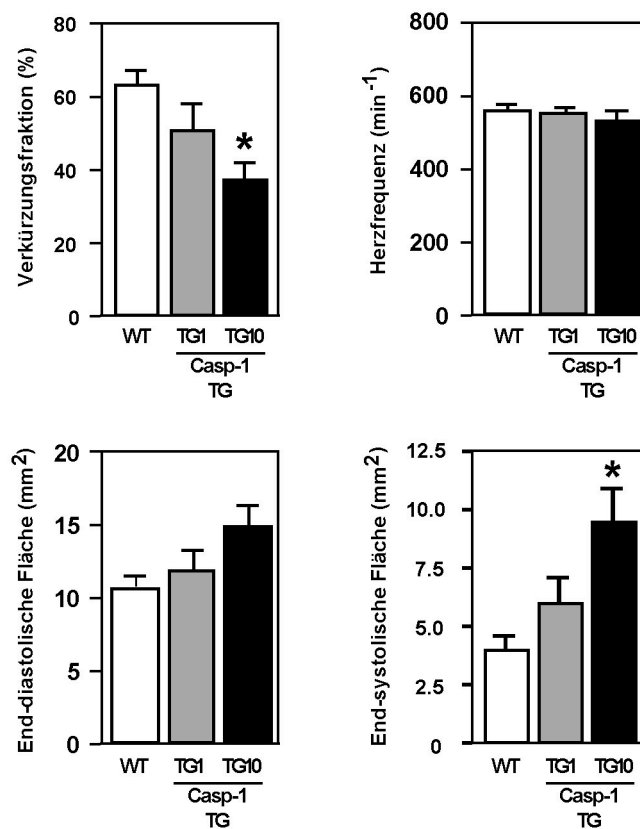


Abbildung 19: Caspase-1-transgene Mäuse entwickeln eine eingeschränkte Herzfunktion. Echokardiographische Analyse von Caspase-1-transgenen Mäusen der Linien Casp-1 TG1 und Casp-1 TG10 und entsprechenden Wildtyp-Kontrolltieren (zwölf Monate alt, n=4-8). Ermittelt wurde die end-systolische und end-diastolische Fläche (mm²), die Verkürzungsfraction (%) und die Herzfrequenz (min⁻¹).

3 Verminderte Herzinsuffizienz durch Ausschaltung der endogenen Caspase-1 nach Myokardinfarkt

Bisher wurde gezeigt, dass eine verstärkte Expression der kardialen Caspase-1 ausreichend für die Induktion einer manifesten Herzinsuffizienz ist. Überträgt man diesen transgen-induzierten Phänotyp auf die endogene Situation, so stellt sich die Frage, ob durch die Ausschaltung der endogenen Caspase-1 der kardiale Phänotyp in einem operativen Herzinsuffizienzmodell verbessert werden kann.

Um die funktionelle Rolle der endogenen Caspase-1 zu untersuchen wurden homozygote Caspase-1-defiziente Mäuse und entsprechende Kontrolltiere einem Postinfarkt-Herzinsuffizienzmodell unterzogen. Hierzu wurden die Mäuse anästhesiert und durch Ligation am vorderen absteigenden Ast der linken Herzkranzarterie (LAD) ein operativer Herzinfarkt (MI) gesetzt. Nach je vier und acht Wochen postoperativ wurde ein Echokardiogramm angefertigt. Schließlich wurden die Mäuse euthanasiert und zur Bestimmung der Infarktgröße ein transversaler midventrikulärer Ring entnommen. Durch Färbung mit Siriusrot wurde die Infarktnarbe aus kollagenem Bindegewebe deutlich sichtbar rot angefärbt. Die mittlere Infarktgröße war in beiden Gruppen nahezu identisch (siehe Abb. 20). Für die nachfolgenden Untersuchungen konnte demzufolge von einem gleich starken Herzinsuffizienz-Stimulus in beiden Kollektiven ausgegangen werden.

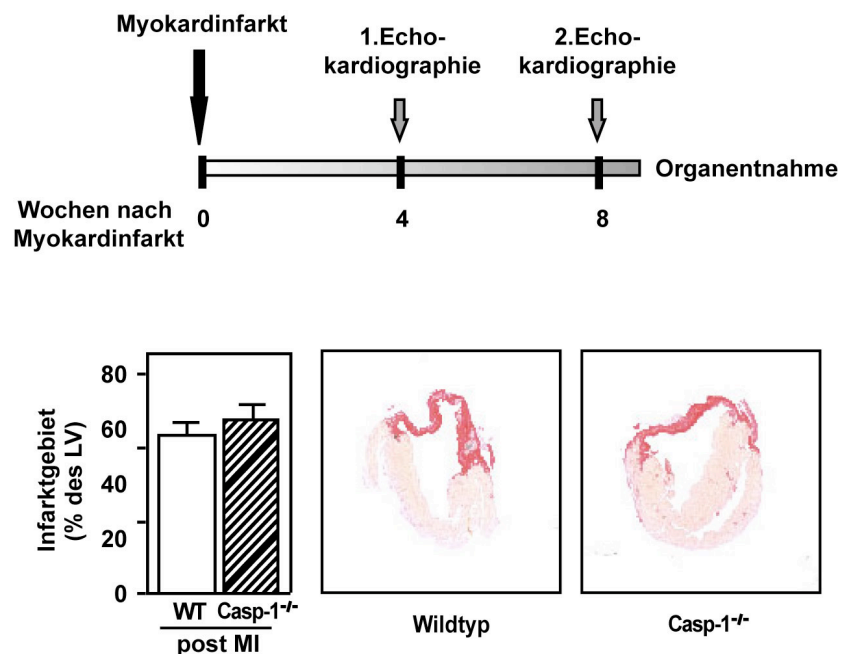


Abbildung 20: Identische Infarktgrößen für Caspase-1-defiziente Mäuse und Wildtypen nach Myokardinfarkt. (Oben) Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufes des Versuchs. (Unten links) Bestimmung der Infarktgröße acht Wochen nach MI in Caspase-1-defizienten Mäusen und entsprechenden Wildtypen (computergestützte planimetrische Auswertung, n=6-9). (Unten rechts) Exemplarische Darstellung je eines transversen, midventrikulären, Siriusrot gefärbten Myokardschnitts acht Wochen nach MI.

Im Verlauf dieses Experiments wurde die Überlebenskurve der beiden Versuchsgruppen mittels einer Kaplan-Meier-Analyse aufgezeichnet. Die Caspase-1-defizienten Mäuse zeigten durch eine Reduktion der Mortalität um ca. 50% einen deutlichen Trend zu einer erhöhten Überlebensrate im Zeitraum von acht Wochen nach MI (siehe Abb. 21). Zur Analyse der Kardiomyozytenhypertrophie wurden midventrikuläre Myokardschnitte des linken Ventrikels mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Hämatoxylin färbt den Zellkern dunkelviolett, Eosin färbt das Zytoplasma rosa. Bei der quantitativen Auswertung der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche wiesen die Caspase-1-defizienten Mäuse eine signifikant geringere reaktive Kardiomyozytenhypertrophie als entsprechende Kontrolltiere acht Wochen nach MI auf (siehe Abb. 21). Neben dieser morphologischen Analyse zeigte die Auswertung der echokardiographischen Daten eine signifikant verminderte Herabsetzung der Herzfunktion in den Caspase-1-defizienten Mäusen, sowohl vier und acht Wochen nach MI.

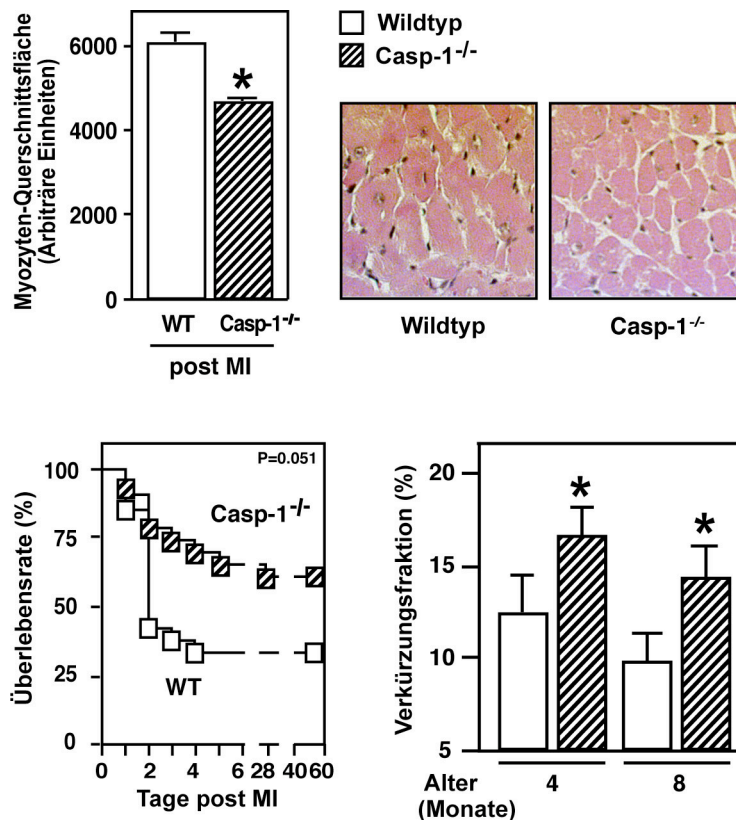


Abbildung 21: Caspase-1-defiziente Mäuse zeigen nach Myokardinfarkt einen milderen Herzinsuffizienz-Phänotyp. (Oben links) Morphometrische Auswertung der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche in Caspase-1-defizienten Mäusen und entsprechenden Kontrolltieren acht Wochen nach MI. Pro Genotyp wurden 130 Einzelzellen analysiert (n=6-9 Tiere pro Gruppe) (oben rechts). Repäsentativer Ausschnitt Hämatoxylin/Eosin gefärbter linksventrikulärer Myokardausschnitte acht Wochen nach MI. (Unten links) Kaplan-Meier-Kurven zur Analyse der Sterblichkeit bis zu acht Wochen nach MI (Caspase-1-defiziente Mäuse: n=21, Wildtypiere: n=20). (Unten rechts) Ermittlung der Verkürzungsfraction vier und acht Wochen nach MI mittels echokardiographischer Analyse (n=7-13, two-way ANOVA).

III Zytokin-unabhängige Induktion von Kardiomyozytenapoptose durch kardiale Caspase-1

Die transgene Überexpression der Caspase-1 *in vivo* ist ausreichend einen sekundär induzierten, ab dem vierten Lebensmonat progressiv entstehenden Herzinsuffizienz-Phänotyp hervorzurufen. Ferner kann, durch Ausschaltung der endogenen Caspase-1 *in vivo*, ein operativ induzierter Herzinsuffizienz-Phänotyp morphologisch und funktionell verbessert werden. Nachdem jedoch der kardiale Phänotyp in den Caspase-1-transgenen Mäusen erst zeitlich deutlich verzögert sichtbar wurde, stellte sich die Frage, was die direkte, primäre Funktion der kardialen Caspase-1 ist.

1 Kardiale Caspase-1 wirkt nicht proinflammatorisch

In der Literatur wird Caspase-1 als eine proinflammatorische Caspase beschrieben, die maßgeblich für die Aktivierung des IL-1 β und des IL-18 verantwortlich ist. Durch Aktivierung dieser Zytokine können inflammatorische und nekrotische Prozesse induziert werden, die sekundär zu linksventrikulärem Remodeling beitragen können.

Um sicher zu stellen, dass mögliche Effekte direkt auf die transgen exprimierte Caspase-1 zurückzuführen sind und nicht die Folge sekundärer Effekte während der Progression der Herzinsuffizienz sind, wurden die nachfolgenden Untersuchungen an jungen, zwei Monate alten Mäusen durchgeführt.

1.1 Unveränderte proinflammatorische Zytokine und Entzündungszellen

Zur Bestimmung der Konzentration an IL-1 β und IL-18 in Serum und linksventrikulärem Gewebe Caspase-1-transgener Mäuse wurden für das jeweilige Interleukin spezifische ELISAs durchgeführt. Hierzu wurden industriell verfügbare, mit anti-IL-1 β oder anti-IL-18 Antikörper vorbeschichtete 96-well ELISA-Platten verwendet. Für beide Interleukine wurden in den Caspase-1-transgenen Mäusen keine erhöhten, sondern zu den Wildtypwerten unveränderte Gewebe- und Serumspiegel detektiert.

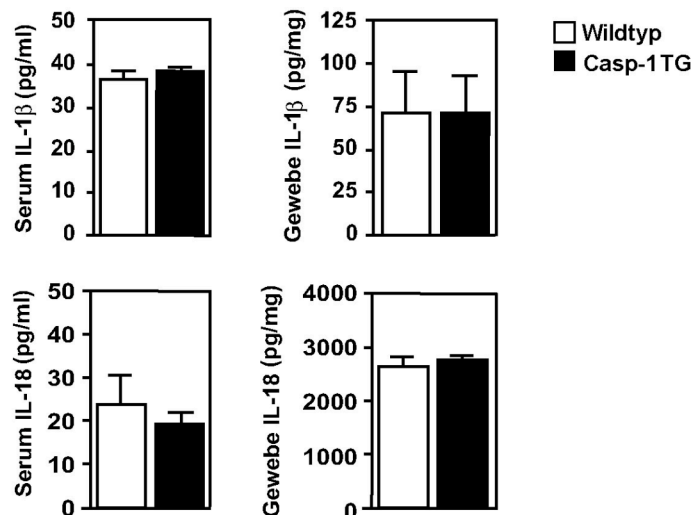


Abbildung 22: Caspase-1-transgene Mäuse zeigen keine verstärkte Generierung an Interleukin-1β und Interleukin-18. Quantitative Analyse der IL-1β (oben) und IL-18 (unten) Konzentration mittels Sandwich-ELISA. Untersucht wurde Serum und linksventrikuläres Gewebe zwei Monate alter Caspase-1-transgener Mäuse und entsprechender Wildtypiere (n=8-13).

Neben der ELISA-basierten Quantifizierung wurde für das IL-1β zudem auf immunhistochemischem Weg demonstriert, dass die transgene Expression der Caspase-1 im linken Ventrikel nicht zu einer verstärkten Bildung an IL-1β führt (siehe Abb. 23). Hierzu wurden Gefrierschnitte zunächst mit einem für IL-1β spezifischem Erstantikörper inkubiert. In einem zweiten Schritt wurde der an IL-1β gebundene Erstantikörper über eine indirekte Immunperoxidase-Färbung sichtbar gemacht. Zur Kontrolle der Funktionalität dieses Färbeverfahrens wurde die Färbung parallel mit einem anti-CD31 Erstantikörper als Positivkontrolle durchgeführt. CD31 gehört zu der Superfamilie der Immunoglobuline und ist ein, vor allem auf Endothelzellen konstitutiv exprimiertes Oberflächenprotein.

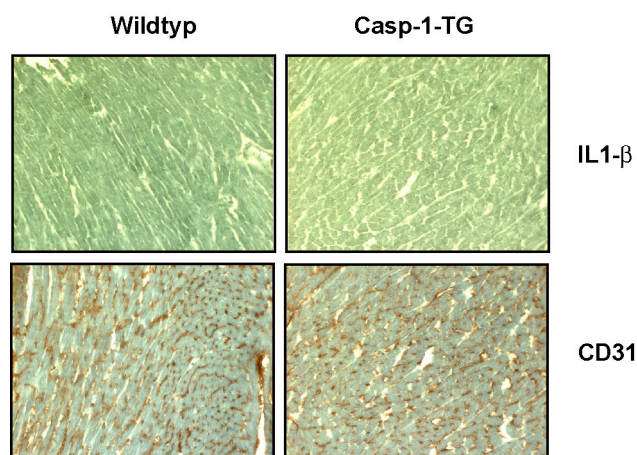


Abbildung 23: Caspase-1-transgene Mäuse zeigen keine verstärkte Bildung von Interleukin-1β. Immunhistochemische Färbungen zur Detektion von IL-1β. Verwendet wurden Gefrierschnitte linksventrikulären Myokards von zwei Monate alten Caspase-1-transgenen Tieren und entsprechenden Wildtypieren. (Oben) Repräsentativer Ausschnitt einer Färbung mit dem für IL-1β spezifischen Erstantikörper. (Unten) Repräsentativer Ausschnitt der Kontrollfärbung mit einem gegen CD31 spezifischen Erstantikörper.

Um ferner eine Aktivierung entzündlicher Vorgänge durch IL-1 β im Myokard Caspase-1 transgener Mäuse zu untersuchen, wurden Herzmuskelschnitte auf Veränderungen in der Proteinexpression bekannter IL-1 β und IL-18 regulierter Targetgene untersucht. Hierbei ergaben sich keinerlei Hinweise auf ein verändertes Expressionsmuster dieser Proteine in Herzmuskelgewebe mit transgener Expression der Caspase-1. Weitere Färbungen zeigten darüber hinaus, abgesehen von einer leicht erhöhten Makrophageninfiltration, keinerlei Hinweise auf eine IL-1 β induzierte erhöhte Infiltration von Zellen des Immunsystems (Färbungen sind nicht abgebildet).

Es ist bekannt, dass es bei chronischer Herzinsuffizienz zu einer Immunaktivierung kommen kann und dies zur Progression der Erkrankung beitragen kann. Proinflammatorische Zytokine können über vielfältige Mechanismen kardiales Remodeling induzieren, unter anderem indem sie durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu einem Anstieg des sogenannten oxidativen Stresses beitragen.

1.2 Unveränderter oxidativer Stresstatus

Im Herzgewebe kann ROS auf vielfältige Weise zu einer Myokardschädigung führen und auf diese Weise unmittelbar zu kardialem Remodeling beitragen. Für die Analyse einer möglichen IL-1 β -induzierten, vermehrten ROS-Synthese und deren Auswirkungen wurden histochemische (Dihydroethidium) und immunhistochemische (8-OHdG) Färbungen im linksventrikulären Myokard Caspase-1-transgener Mäuse durchgeführt. Dihydroethidium, ein Redoxindikator, wurde direkt auf den zu untersuchenden Gefrierschnitt appliziert. Die Intensität der dabei entstehenden roten Fluoreszenz ist ein Maß für die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies. Die Auswertung durch Analyse der Pixelintensität verdeutlichte, dass die kardial exprimierte Caspase-1 keinen Einfluss auf den ROS-Status im linken Ventrikel dieser Mäuse hat.

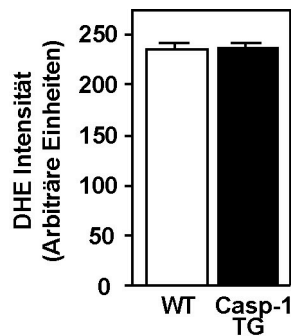


Abbildung 24: Caspase-1-transgene Mäuse zeigen keine verstärkte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Computergestützte quantitative Analyse der Fluoreszenzintensität nach Applikation des Redoxindikators Dihydroethidium (DHE) auf linksventrikuläre Gefrierschnitte zwei Monate alter Caspase-1-transgener Mäuse und entsprechender Wildtypiere. Als Positivkontrolle wurde Wildtyp-Gewebe von Mäusen drei Tage nach Myokardinfarkt verwendet.

Das Guanin-Derivat 8-OHdG ist ein zuverlässiger Marker für DNA-Schäden durch die Einwirkung von reaktiven Sauerstoffspezies. Entparaffinierte linksventrikuläre Gewebeschnitte wurden mit einem anti-8-OHdG Antikörper inkubiert und auf diese Weise markiertes 8-OHdG durch eine indirekte Immunperoxidase-Färbung visualisiert. Für eine Positivkontrolle dieser Färbung wurde Wildtyp-Myokardgewebe von Mäusen drei Tage nach Myokardinfarkt verwendet. In Abbildung 25 sind repräsentative Ausschnitte dieser Färbung dargestellt. Während sich in der Positivkontrolle Bereiche mit der charakteristischen Braunfärbung zeigten, war im Gewebe Caspase-1-transgener Mäuse und entsprechender Wildtypiere keine signifikante Färbung für ROS-induzierte DNA-Schäden sichtbar.

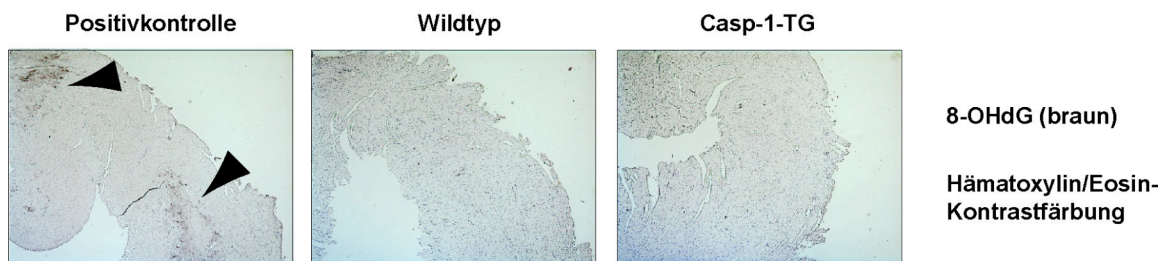


Abbildung 25: Caspase-1-transgene Mäuse zeigen keinen Anstieg von durch ROS induzierten DNA-Schäden. Immunhistochemische Färbung zur Detektion von 8-OHdG. Verwendet wurden in Paraffin gebettete Schnitte linksventrikulären Myokards von zwei Monate alten Caspase-1-transgenen Tieren und entsprechenden Wildtypieren. Als Positivkontrolle wurde Wildtyp-Gewebe von Mäusen drei Tage nach Myokardinfarkt verwendet. Die Pfeilspitzen kennzeichnen die braune 8-OHdG Färbung.

1.3 Keine Zunahme an nekrotischem Zelluntergang

Zur spezifischen Analyse an nekrotischem Zelltod im linksventrikulären Myokardgewebe wurde eine immunhistochemische Fluoreszenzfärbung gegen die Komplementkomponente C9 (CCC9) in Gefrierschnitten durchgeführt. CCC9 ist Bestandteil der proinflammatorischen Komplementkaskade, die während nekrotischem

Zelluntergang aktiviert wird. Durch Verwendung eines Zweitantikörpers, der mit einem roten Fluorophor markiert ist, kann so spezifisch nekrotisches Gewebe rot angefärbt werden. Zur Kontrastfärbung des Zytoskeletts wurde Phalloidin verwendet, das Aktin in einer grünen Fluoreszenz anfärbt. Die Zellkerne wurden durch eine DAPI-Färbung blau gefärbt. Als Positivkontrolle für diese Färbung wurde Wildtyp-Gewebe von Mäusen drei Tage nach Myokardinfarkt verwendet. In Abbildung 26 sind repräsentative Ausschnitte dieser Färbung dargestellt. Sowohl im Herzgewebe Caspase-1-transgener Mäuse, aber auch in Gewebe von Wildtyp-Tieren fanden sich sehr vereinzelt Ansammlungen aus ca. sechs Nekrose-positiven Zellen, mit einer minimal erhöhten Inzidenz in den analysierten Caspase-1-transgenen Mäusen.

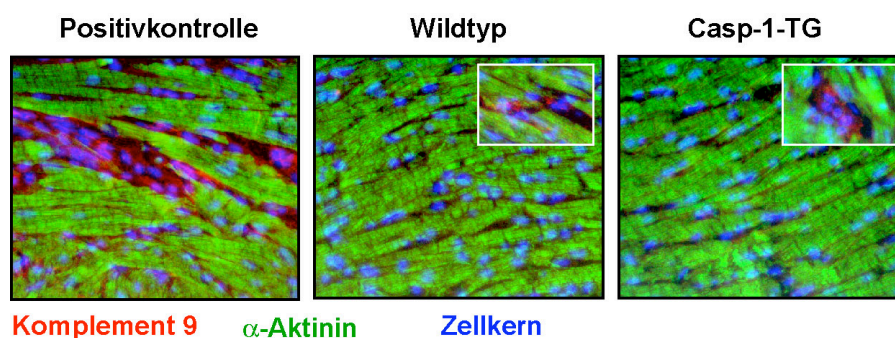


Abbildung 26: Caspase-1-transgene Mäuse zeigen keine verstärkte Nekrose. Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung der Komplementkomponente C9 in Gefrierschnitten. Verwendet wurde linksventrikuläres Myokard zwei Monate alter Caspase-1-transgener Mäuse und entsprechender Wildtyp-Tiere. Als Positivkontrolle wurde Wildtyp-Gewebe von Mäusen drei Tage nach Myokardinfarkt verwendet. Die Komplementkomponente C9 ist mit einer roten Fluoreszenz markiert. Zur Kontrastfärbung des α -Aktinins wurde Phalloidin (grün) verwendet, die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.

2 Apoptose von Kardiomyozyten durch kardiale Caspase-1

Caspasen allgemein sind entweder in inflammatorische (Aktivierung von Cytokinen) oder in proapoptotische Prozesse (Aktivierung des Apoptosesignalweges) involviert. Die bisherigen Ergebnisse veranschaulichen, dass Caspase-1 im Herz nicht als proinflammatorische Caspase fungiert. Obwohl Caspase-1 bisher als inflammatorische Caspase klassifiziert wurde, ist denkbar, dass kardiale Caspase-1 einen proapoptotischen Charakter aufweist. Der Verlust von Herzmuskelzellen durch Apoptose ist ein zentraler Mechanismus zur Induktion und Progression einer Herzinsuffizienz.

2.1 Erhöhte Kardiomyozytenapoptose in Caspase-1-transgenen Mäusen

Zur Detektion von Kardiomyozytenapoptose wurde die TUNEL-Färbung (TUNEL, TdT-mediated dUTP nick end labeling) durchgeführt, die in der Literatur als Standardmethode zur Detektion von Apoptose beschrieben ist. Während des Vollzugs

der Apoptose induzieren Endonukleasen charakteristische DNA-Fragmentierungen die zu freiliegenden 3'OH-Enden führen. An diese werden mit Hilfe einer terminalen Transferase (TdT) fluoreszenzmarkierte Nucleotide angehängt. Auf diese Weise können apoptotische Zellkerne durch eine grüne Fluoreszenz optisch sichtbar gemacht werden (siehe Abb. 27). Propidiumiodid wurde zur Gegenfärbung sämtlicher Zellkerne mit einer roten Fluoreszenz eingesetzt. Bei der Quantifizierung der TUNEL-Färbung konnten durch diese Gegenfärbung TUNEL-positive Zellkerne (in der Überlagerung gelb) von Artefaktfärbungen (in der Überlagerung grün) unterschieden werden. Von diesen TUNEL-positiven Zellkernen wurden ausschließlich solche in die Quantifizierung einbezogen, die zusätzlich eine intrazelluläre Lage im Kardiomyozyten aufwiesen und vereinzelt gelegen waren.

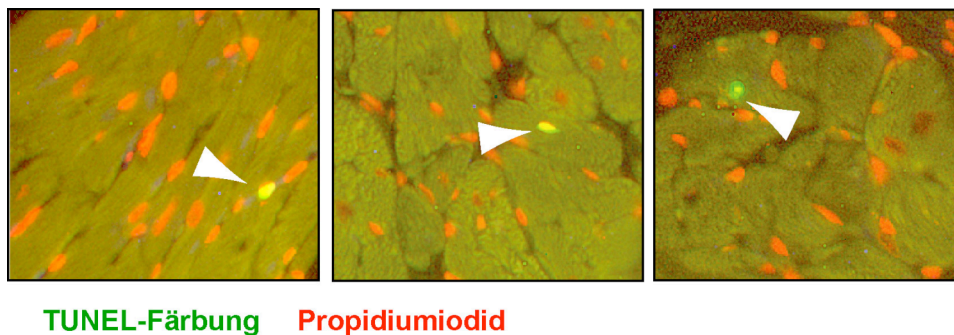


Abbildung 27: Bestimmung der Apoptose von Kardiomyozyten mit Hilfe der TUNEL-Färbung. Exemplarische Darstellung apoptotischer Kardiomyozyten im linksventrikulären Myokard Caspase-1-transgener Mäuse. Im Overlay aus TUNEL-Färbung und Propidiumiodid-Gegenfärbung erscheinen diese gelb gefärbt (weiße Pfeilspitze).

Um Kardiomyozytenapoptose nach transgener Expression der Caspase-1 zu untersuchen, wurde die TUNEL-Färbung einerseits *in vivo* in linksventrikulären Myokardschnitten und *ex vivo* an isolierten adulten Herzmuskelzellen Caspase-1-transgener Mäuse durchgeführt. Als Kontrollgruppe dienten jeweils die entsprechenden Wildtyptiere.

Im linksventrikulären Myokard Caspase-1-transgener Mäuse zeigte sich eine, vom ersten bis vierzehnten Lebensmonat anhaltende, durchwegs stark erhöhte Apoptoserate. Speziell in den jungen, einen und vier Monate alten Tieren war die Apoptoserate mehr als fünf- bzw. sechsfach erhöht (siehe Abb. 28).

Isolierte, adulte Kardiomyozyten wurden nach 40stündiger Kultur, zusätzlich zur TUNEL-Färbung durch Immunfluoreszenz mit einem anti- α -Aktinin Antikörper spezifisch rot angefärbt, sämtliche Zellkerne wurden mit einem blauen Fluoreszenzfarbstoff (Hoechst) gegengefärbt. Die Auswertung zeigte, dass Herzmuskelzellen mit transgener Expression der Caspase-1 zu mehr als 50% apoptotisch waren (siehe Abb. 28). Bei den Wildtyp-Herzmuskelzellen zeigten lediglich 10% der Kardiomyozyten eine TUNEL-

positive Färbung, wobei diese Basalapoptose auf die Isolations- und Kulturbedingungen zurückzuführen ist.

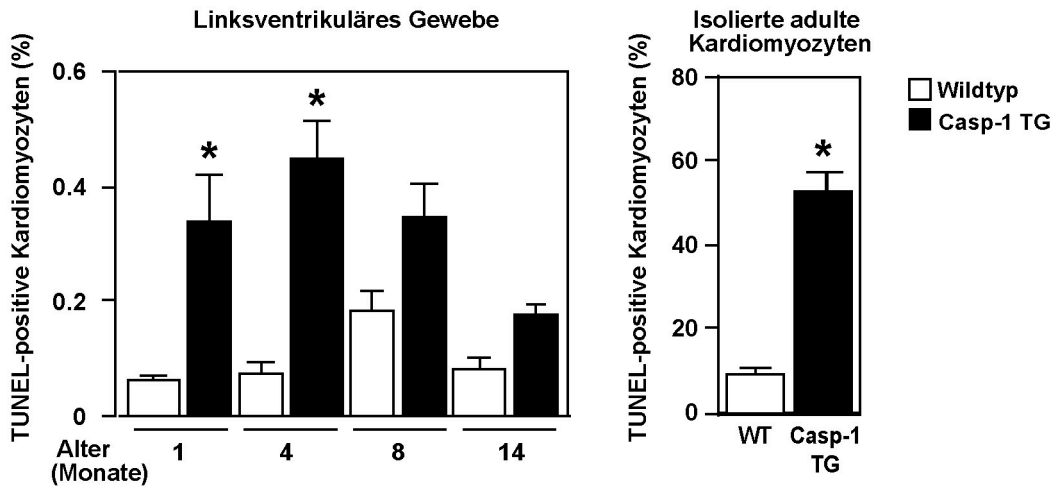


Abbildung 28: Caspase-1-transgene Mäuse zeigen eine erhöhte Kardiomyozytenapoptose. (Links) Quantitative Auswertung der TUNEL-Färbung im Herzgewebe ein, vier, acht und 14 Monate alter Caspase-1-transgenerer Mäuse und entsprechender Wildtypiere (n=3-5). Nur solche TUNEL-positiven Kardiomyozyten mit einer Propidiumiodid-Gegenfärbung und einer intrazellulären Lokalisation der TUNEL-Färbung wurden in die Auswertung aufgenommen. (Rechts) Quantitative Auswertung der TUNEL-Färbung von isolierten adulten Kardiomyozyten von Caspase-1-transgenen Mäusen und Wildtypieren (n=3-6).

2.2 Apoptoseinduktion durch adenoviral exprimierte Caspase-1 in NRCM

Um den direkten proapoptotischen Effekt der Caspase-1 auf Kardiomyozyten zu untermauern, wurden Experimente *in vitro* durchgeführt. Hierzu wurden isolierte neonatale Rattenkardiomyozyten (NRCM) mit einem Caspase-1-exprimierenden Adenovirus (Adv-Caspase-1) infiziert. Als Kontrolle wurde für diese Versuche ein LacZ exprimierender Adenovirus (Adv-LacZ) eingesetzt. LacZ ist das für die β -Galactosidase codierende Gen aus dem Lactose-Operon von *Escherichia coli*. Das Genprodukt spaltet das Disaccharid Lactose in seine Bestandteile Glucose und Galactose.

Nach der Sequenzierung und Titerbestimmung des Adv-Caspase-1 wurde zunächst seine Funktionalität bestätigt. Die Western Blot Analyse mit Proteinlysaten aus NRCM, 48h nach Infektion mit dem Adv-Caspase-1, zeigte neben der korrekten Expression der Caspase-1 (45 kDa) die Prozessierung der Caspase-1.

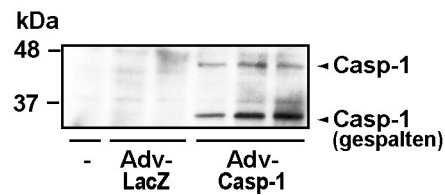


Abbildung 29: Adenovirale Expression und Aktivierung der Caspase-1 in neonatalen Rattenkardiomyozyten. Western Blot Analyse mit Proteinlysaten aus NRCM 48 Stunden nach Infektion mit Adv-LacZ oder Adv-Caspase-1, bzw. ohne adenovirale Infektion. (MOI=10, Detektion mit anti-Caspase-1 Antikörper).

Zur TUNEL-Färbung wurden die NRCM auf Polylysin-beschichtete Glasplättchen ausgesät und 48 Stunden nach Infektion mit dem jeweiligen Adenovirus mit 4%iger Paraformaldehydlösung fixiert. Neben der TUNEL-Färbung wurden die Kardiomyozyten zellspezifisch mit einem anti- α -Aktinin Antikörper durch eine Immunfluoreszenzfärbung rot angefärbt, sämtliche Zellkerne wurden mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff (Hoechst) markiert. Abbildung 30 zeigt einen repräsentativen Ausschnitt der Überlagerung dieser drei Färbungen (MOI, multiplicity of infection, 30). Anhand der TUNEL-Färbung zeigte sich ein dramatischer Anstieg an apoptotischen Herzmuskelzellen nach Infektion mit Adv-Casp-1.

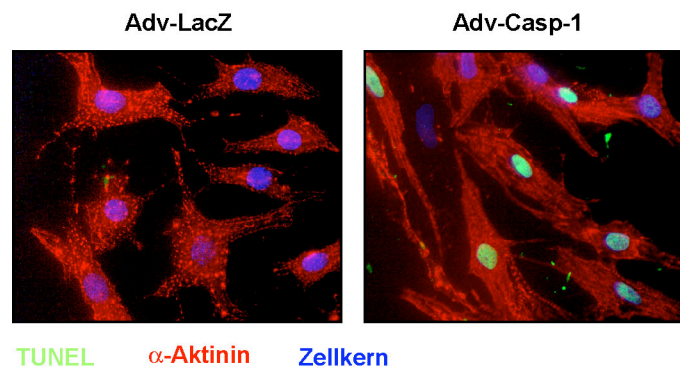


Abbildung 30: Adenovirale Expression der Caspase-1 in neonatalen Rattenkardiomyozyten induziert Apoptose. Exemplarische Darstellung der Überlagerung aus TUNEL-, α -Aktinin-, und Zellkernfärbung in NRCM 48 Stunden nach Virusinfektion mit Adv-LacZ bzw. Adv-Caspase-1 (MOI 30).

Die Quantifizierung der TUNEL-Färbung für aufsteigende Viruskonzentrationen (MOI eins bis 30) zeigte eine Dosis-abhängige Zunahme der Kardiomyozytenapoptose (siehe Abb. 31). Bereits für die geringe MOI 3 waren mehr als 50% der Kardiomyozyten apoptotisch. Der Kontrollvirus Adv-LacZ rief, abgesehen von einer konstanten Basalapoptose, keinen vermehrten apoptotischen Zelltod hervor.

Das komplementäre Ergebnis zeigte sich bei der Analyse der Überlebensrate von NRCM nach 48stündiger Infektion mit dem Adv-Casp-1. Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde die MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Methode angewandt. Die Reduktion von MTT zum blau gefärbten Formazan läuft nur in

metabolisch aktiven Zellen mit intakten Mitochondrien ab. Auch hier wurde durch den Kontrollvirus Adv-LacZ keine Apoptose induziert.

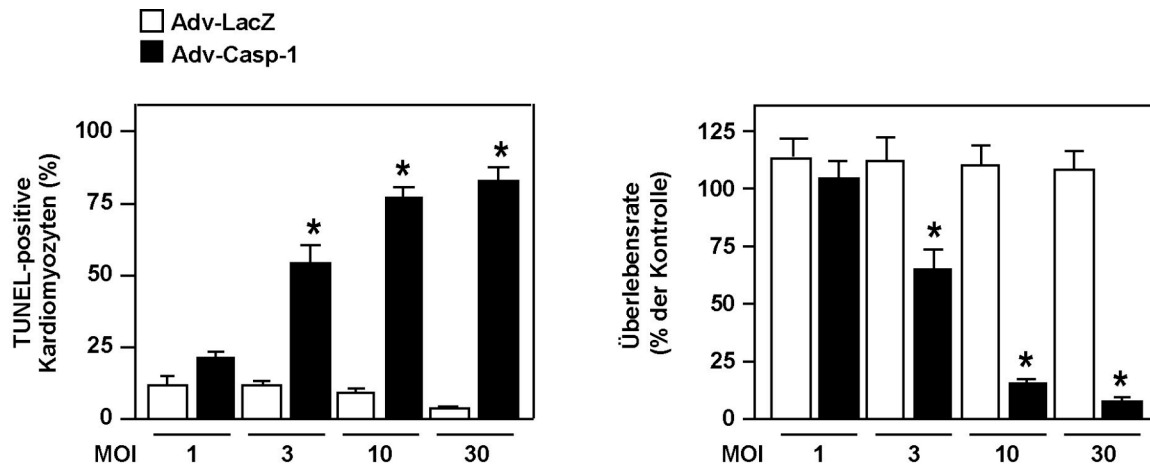


Abbildung 31: Adenovirale Expression der Caspase-1 induziert Dosis-abhängige Apoptose. (Links) Quantitative Auswertung der TUNEL-Färbung von NRCM 48 Stunden nach Virusinfektion mit Adv-LacZ bzw. Adv-Caspase-1 (MOI eins bis 30, zwei unabhängige Versuche mit n=6). (Rechts) Quantitative Auswertung des MTT-Versuches von NRCM 48 Stunden nach Virusinfektion mit Adv-LacZ bzw. Adv-Caspase-1 (MOI ein bis 30, drei unabhängige Versuche mit n=2-6).

2.3 Deutliche Reduktion der Apoptose durch Ausschaltung der endogenen Caspase-1 nach Ischämie/Reperfusion

Wiederum stellte sich die Frage, ob der proapoptotische Effekt der transgen exprimierten kardialen Caspase-1 die Wirkung der endogenen kardialen Caspase-1 reflektiert. Ist demzufolge eine Ausschaltung der endogenen Caspase-1 bezüglich des proapoptotischen Zelltods von Kardiomyozyten protektiv?

Um den proapoptotischen Charakter der endogenen kardialen Caspase-1 zu untersuchen, wurden Caspase-1-defiziente Mäuse und entsprechende Kontrolltiere einem Ischämie/Reperfusion-Modell unterzogen. Ischämie/Reperfusion (I/R) ist ein etabliertes Schädigungsmodell zur potenten Induktion von myokardialer Apoptose. Der 30minütigen Ligation der linken absteigenden Koronararterie folgte eine Reperfusionphase von 24 Stunden. Zur Bestimmung der Infarktgröße wurden die Mäuse nach dieser Reperfusionphase erneut anästhesiert, die Ligation religiert und lebendiges Gewebe durch kardiale Injektion von Evans Blau angefärbt. Die Markierung von ischämischem Gewebe in den fünf transversen Myokardschnitten erfolgte mit der TTC-Färbung. Vitales Gewebe überführt TTC infolge oxidativer Phosphorylierung durch mitochondriale Dehydrogenasen in einen roten Farbstoff. Demzufolge wird vitales Gewebe rot gefärbt, während abgestorbenes Gewebe der Infarktnarbe (IA, infarct area) ungefärbt bleibt. Durch computergestützte Analyse wurde die Fläche des gesamten linken Ventrikels (LV), der ischämischen Bereiche (AAR, area at risk, rot angefärbt) und der Bereich mit abgestorbenem Gewebe (IA, weiß) bestimmt (siehe Abb.32).

Zur Beurteilung der Infarktgrößen wurden in beiden Versuchsgruppen jeweils die Quotienten AAR/LV und IA/LV gebildet. Beide Parameter zeigten identische Werte für die Caspase-1-defizienten Mäuse und die Wildtyp-Kontrollgruppe. Es konnte demnach in der Analyse der Kardiomyozytenapoptose von identisch starken Apoptose-Stimuli in beiden Versuchsgruppen ausgegangen werden.

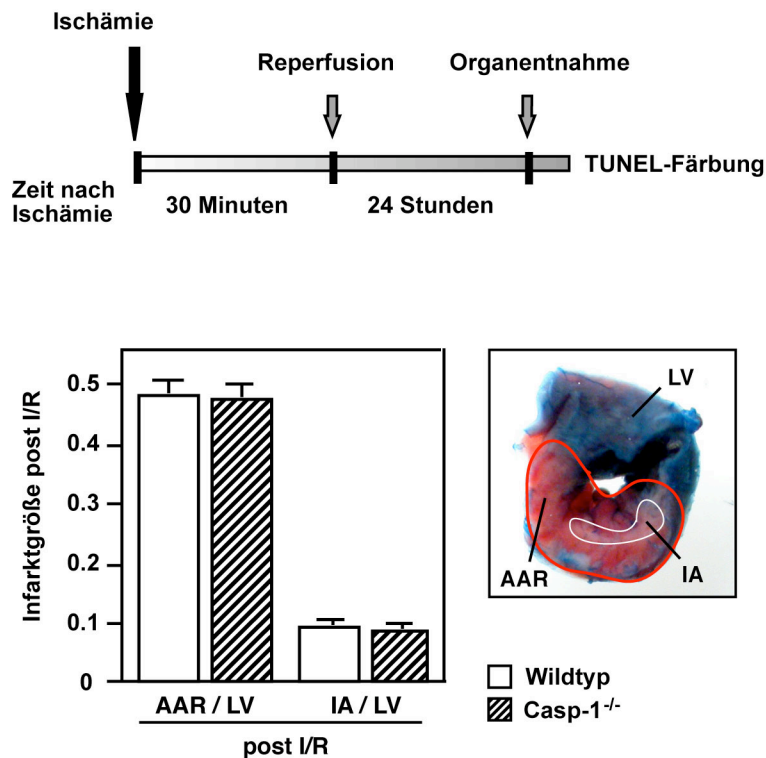


Abbildung 32: Identische Infarktgrößen für Caspase-1-defiziente Mäuse und Wildtypiere nach Ischämie/Reperfusion. (Links) Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchablaufs. (Rechts) Auswertung der Verhältnisse AAR/LV und IA/LV nach 30minütiger Ischämie und 24 Stunden Reperfusion in Caspase-1-defizienten Mäusen und entsprechenden Kontrolltieren (computergestützte planimetrische Auswertung, n=6-9). Exemplarische Darstellung eines transversen, midventrikulären Myokardrings nach Färbung mit Evans Blau und TTC.

Für die Detektion der linksventrikulären Kardiomyozytenapoptose wurde die TUNEL-Färbung durchgeführt. Wie sich in der Quantifizierung zeigte, wurde in den Wildtypieren durch das Ischämie/Reperfusions-Protokoll eine massive Apoptose von Herzmuskelzellen induziert.

Im Gegensatz hierzu war die Kardiomyozytenapoptose in den Caspase-1-defizienten Tieren um knapp 75% reprimiert (siehe Abb.33). Mit diesem Versuch konnte demonstriert werden, dass die endogene kardiale Caspase-1 ein potenter Induktor von Kardiomyozytenapoptose ist und als solcher wesentlich zu apoptotischem Untergang von Herzmuskelzellen unter pathophysiologischen Bedingungen beitragen kann.

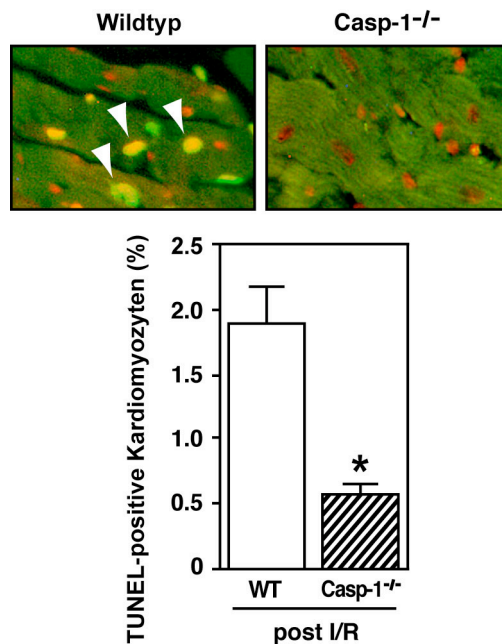


Abbildung 33: Caspase-1-defiziente Mäuse sind vor Apoptose nach Ischämie/Reperfusion geschützt. (Oben) Exemplarische Darstellung der TUNEL-Färbung in der Überlagerung mit der Propidiumiodid Zellkernfärbung. (Unten) Quantifizierung der linksventrikulären Kardiomyozytenapoptose in Caspase-1-defizienten Mäusen und Wildtypen nach Ischämie/Reperfusion (n=3-5).

IV Selektive Aktivierung des mitochondrialen Signalweges durch kardiale Caspase-1

Bei der apoptotischen Signaltransduktion nehmen Caspasen eine Schlüsselfunktion ein, indem sie proapoptotische Signale von der Zellmembran in den Zellkern weiterleiten. Hierbei stellt die sogenannte Caspase-Kaskade ein hierarchisch angeordnetes Steuerungsnetzwerk dar, das prinzipiell aus zwei, teils vernetzten Signaltransduktionswegen besteht: dem extrinsischen, über Todesrezeptoren vermittelten und den intrinsischen, mitochondrial vermittelten Signaltransduktionsweg. Das charakteristische Merkmal des extrinsischen Signalweges ist die Aktivierung der Caspase-8, der intrinsische Signalweg ist durch eine Aktivierung der Caspase-9 charakterisiert. Die Aktivierung beider Signalwege mündet schließlich in einer Aktivierung der Effektorcaspasen. Von besonderer Bedeutung ist die Aktivierung der terminalen Effektorcaspase, Caspase-3, die die Endphase des Apoptose-Prozesses einleitet (Hotchkiss and Nicholson 2006).

1 Aktivierung der intrinsischen Caspase-Kaskade

Abschließend stellte sich die Frage ob der proapoptotische Effekt der Caspase-1 über eine Aktivierung des intrinsischen oder des extrinsischen apoptotischen Signalweges vermittelt wird.

Hierzu wurden NRCM mit dem Adv-LacZ oder Adv-Caspase-1 infiziert und nach 34stündiger Inkubation Proteinlysate hergestellt. Anschließend wurden unter Verwendung von spezifischen Antikörpern für die aktiven, prozessierten Isoformen der Caspasen-3,-8 und -9 Western Blot Analysen durchgeführt. Die quantitative Analyse dieser Experimente zeigte eine signifikante Aktivierung der Caspase-3 und Caspase-9 durch adenovirale Expression der Caspase-1 (siehe Abb. 34). Eine Aktivierung der Caspase-8 durch Caspase-1 konnte hierbei nicht festgestellt werden (Experiment nicht abgebildet).

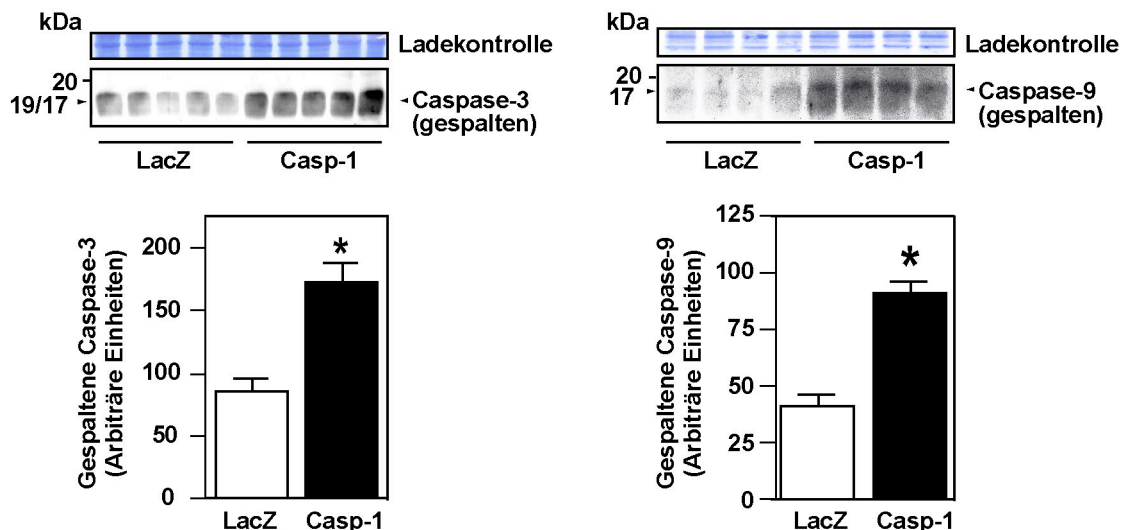


Abbildung 34: Caspase-1 induziert eine Aktivierung der Caspase-3 und -9. Bestimmung der Aktivierung der Caspase-3 (links) und Caspase-9 (rechts) mittels Western Blot Analyse. NRCM wurden mit dem Adv-LacZ oder Adv-Caspase-1 infiziert (MOI 10), nach 24 Stunden Inkubation wurden Proteinlysate hergestellt. Die Membranen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen die gespaltenen Caspasen inkubiert (n=7 aus mindestens zwei individuellen Experimenten).

2 Unveränderte Apoptoseinduktion bei Inhibition des extrinsischen Signalweges

Um die Caspase-1 vermittelte Aktivierung des intrinsischen Signalweges in einem unabhängigen Versuchsaufbau zu bestätigen, wurde der MTT-Versuch mit selektiven Caspase-Inhibitoren durchgeführt.

Die NRCM wurden mit dem Adv-LacZ oder Adv-Caspase-1 infiziert (MOI=3) und der jeweilige Inhibitor wurde gleichzeitig mit dem Adenovirus appliziert. Der MTT-Versuch wurde nach einer anschließenden 34stündigen Inkubation durchgeführt. Die Expression der Caspase-1 führte bei der hier verwendeten geringen Viruskonzentrationen, wie

erwartet, zu einer ca. 40%igen Apoptoseinduktion. Der, durch Caspase-1 induzierte, proapoptotische Effekt konnte durch Zugabe des Breitspektrums-Caspase-inhibitors (zVAD-fmk) und des Caspase-1-spezifischen Inhibitors (RU36384) nahezu komplett unterdrückt werden. Die Applikation eines Caspase-8-spezifischen Inhibitors (zIETD-fmk) zeigte keine Inhibition der durch Caspase-1 induzierten Apoptose.

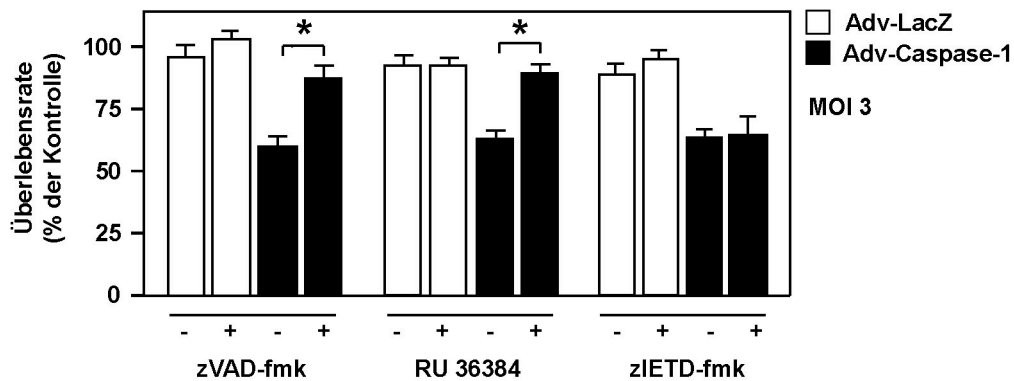


Abbildung 35: Keine Antagonisierung des proapoptotischen Caspase-1-Effekts durch Inhibition der Caspase-8. Quantitative Auswertung der MTT-Versuche mit Caspase-Inhibitoren. NRCM wurden mit dem Adv-LacZ bzw. Adv-Caspase-1 (MOI 3) infiziert und parallel wurde der Breitspektrum Caspase-Inhibitor (zVAD-fmk, 20 mM), der Caspase-8 spezifische Inhibitor (zIETD-fmk, 20 mM) oder der Caspase-1 spezifische Inhibitor (RU36384, 5 mM) zugegeben. Der MTT-Versuch wurde nach 34stündiger Inkubation durchgeführt (je 3-5 individuelle Experimente mit je n=3-4).

Eine Aktivierung der Caspase-8, also des extrinsischen Signalweges durch Caspase-1 konnte somit in zwei unabhängigen Versuchen ausgeschlossen werden. Zusammen mit den Ergebnissen der Westernblot Analyse lässt sich aus diesen Versuchen eine selektive Aktivierung des intrinsischen Signalweges durch Caspase-1 als Mechanismus für die apoptotische Wirkung der Caspase-1 ableiten.

DISKUSSION

I Organspezifität des Wirkmechanismus der Caspase-1

1 Induktion einer Herzinsuffizienz durch kardiale Caspase-1

Mit dieser Arbeit wurde das erste Mal eine kausale Funktion der kardialen Caspase-1 bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz beschrieben.

In einen cDNA-Array zur Analyse differenziell exprimierter Gene bei Herzinsuffizienz wurde Caspase-1 als interessantes Kandidatengen identifiziert. Als etabliertes murines Herzinsuffizienzmodell wurden hierbei die β_1 -AR-transgenen Mäuse verwendet, die ab dem vierten Lebensmonat einen kardialen Phänotyp entwickeln, der dem Krankheitsbild der humanen Herzinsuffizienz sehr ähnlich ist (Engelhardt, Hein et al. 1999). Um Gene zu identifizieren, die im Frühstadium differenziell exprimiert sind und potentiell zur Entstehung einer Herzinsuffizienz beitragen, wurde bei dem cDNA Array die Genexpression von vier Monate alten β_1 -AR-transgenen Mäusen mit der von Wildtyp-Geschwistertieren verglichen.

Ausgehend von der erhöhten Caspase-1-Expression im cDNA-Array wurde zunächst gezeigt, dass Caspase-1 bei muriner Herzinsuffizienz sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene deutlich verstärkt exprimiert wird. Hierdurch konnten Befunde aus der Literatur für eine verstärkte mRNA-Expression der Caspase-1 in verschiedenen murinen Herzinsuffizienz-/Hypertrophie-Modellen wie Calcineurin-, $G\alpha_q$ - und $TNF\alpha$ -transgenen Mäusen und in Wildtypmäusen nach operativen Herzinfarkt bestätigt werden (Aronow, Toyokawa et al. 2001; Kubota, Miyagishima et al. 2001; Woldbaek, Tonnessen et al. 2003).

Um die Relevanz dieses Befundes für die Herzinsuffizienz beim Menschen zu testen, wurde die Proteinexpression der Caspase-1 in Myokardbiopsien von Patienten mit Herzmuskelschwäche im Vergleich zu Myokardproben gesunder Herzen analysiert. Trotz strenger Auswahlkriterien weisen humane Myokardproben eine erhebliche Heterogenität bezüglich des genetischen Hintergrundes, der Anamnese und des Schweregrads der Herzinsuffizienz auf. Selbiges gilt, trotz echocardiographischer Kontrolle, für humane Myokardproben von nicht-herzinsuffizienten Personen. Dennoch konnte für die humane Herzinsuffizienz eine eindeutige Zunahme der Caspase-1 Proteinexpression um ca. 100% demonstriert werden.

Zur funktionellen Analyse *in vivo* wurde Caspase-1 herzspezifisch in Mäusen exprimiert, um so die verstärkte Expression der Caspase-1 bei Herzinsuffizienz zu imitieren. Hierzu wurde die humane α -Isoform der Caspase-1 für die transgene Expression unter die

Kontrolle des α -MHC-Promotors gestellt. Es sind fünf Isoformen (α , β , γ , δ , ϵ) der Caspase-1 bekannt, wobei die Isoformen β , γ , δ und ϵ Splicevarianten mit abnehmender Länge der α -Isoform sind. Allen Splicevarianten fehlt die N-terminale Prodomäne welche die CARD-Domäne enthält. Sie werden daher im Vergleich zur α -Isoform nicht durch Autokatalyse prozessiert (Molineaux, Casano et al. 1993). 2004 wurde eine weitere Caspase-1-Isoform, Caspase-1 ζ identifiziert (Feng, Li et al. 2004).

In den Caspase-1-transgenen Mäusen wird Caspase-1 gewebsspezifisch exprimiert und in ihre aktive Form prozessiert. Dies weist auf eine vorhandene Aktivität der Caspase-1 unter Basalbedingungen hin, wie sie durch das Proximitäts-induzierte Modell der autokatalytischen Aktivierung bedingt sein kann (Wilson, Black et al. 1994; Yamin, Ayala et al. 1996; Dinarello 1997; Dinarello 1998). Es ist bekannt, dass gerade das bei der Prozessierung entstehende Intermediat ganz wesentlich zur fortschreitenden Autoaktivierung beiträgt. Widersprüchlich hierzu sind erst kürzlich veröffentlichte Daten eines Caspase-1-transgenen Mausmodells nach Ischämie/Reperfusion. In dieser Studie von Syed et al. wurde eine Aktivierung der Caspase-1 erst nach Stimulation mit LPS, bzw. in dem Schädigungsmodell beschrieben (Syed, Hahn et al. 2005). Eine geringe Basalaktivität der Caspase-1 war jedoch auch in dieser Studie unter Basalbedingungen detektierbar. Syed et al. beschreiben für ihre Caspase-1-transgenen Mäuse keinen basalen kardialen Phänotyp. Für die Divergenz zu dem hier beschriebenen basalen Phänotyp Caspase-1-transgener Mäusen könnten folgende Ursachen verantwortlich sein. In der Studie von Syed et al. ist nicht das Geschlecht der verwendeten Tiere angegeben. Es ist bekannt, dass es zu Geschlecht-abhängigen Unterschieden in der Ausprägung eines kardialen Phänotyps kommen kann. Ferner kann die Zusammensetzung des Futters Einfluss auf die Entwicklung eines kardialen Phänotyps haben (Stauffer, Konhilas et al. 2006). Schließlich ist in dieser Studie nicht angegeben, welche Isoform der Caspase-1 in der transgenen Maus exprimiert wurde. Da nur die Caspase-1 α die Fähigkeit zur Autoprozessierung besitzt, könnte der Unterschied in der Basalaktivität und dem basalen Phänotyp durch die transgene Expression einer anderen Caspase-1 Isoform begründet sein. Auch Unterschiede in der Intensität der Genexpression können, im Hinblick auf die Proximitäts-induzierte Autoaktivierung der Caspase eine mögliche Erklärung sein. Eine weitere Studie beschreibt eine verstärkte Aktivierung vieler verschiedener Caspasen, u.a. der Caspase-1 nach Endotoxin-Stimulation mit LPS. Eine Basalaktivität der Caspase-1 konnte aber auch in dieser Untersuchung gemessen werden (Fauvel, Marchetti et al. 2001).

Caspase-1-transgene Mäuse entwickeln ab dem vierten Lebensmonat eine mit dem Alter zunehmende, progressive Kardiomyozytenhypertrophie. Diese konnte durch Messungen

der Kardiomyozytendimensionen *in vivo* und *ex vivo* bestimmt werden. Auf mRNA-Ebene wurde eine zeitlich parallele verstärkte Expression Hypertrophie-assoziiierter Markergene wie z.B. *Anf* und *β -Mhc* sichtbar. Diese Aktivierung des fetalen Genexpressionsprogrammes ging mit einer verminderten Expression des Ca^{2+} -Regulators SERCA einher. Wider erwarten zeigte sich im untersuchten Zeitraum vom dem ersten bis 14. Lebensmonat der Caspase-1-transgenen Mäuse trotz der deutlichen Hypertrophie der einzelnen Herzmuskelzellen keine Zunahme des linksventrikulären Gewichtes. Obwohl Kardiomyozyten im Myokard nicht die Zellpopulation mit der höchsten Zellzahl sind stellen sie bezüglich Masse und Volumen den Hauptbestandteil des Herzmuskelgewebes dar. Da sich das signifikante hypertrophe Wachstum der Herzmuskelzellen nicht in einer Zunahme der Myokardmasse widerspiegelte, war dies ein erster Hinweis auf einen deutlichen Verlust an Herzmuskelzellen durch Expression der Caspase-1. Neben der Kardiomyozytenhypertrophie zeigten die Caspase-1-transgenen Mäuse eine, sich ebenfalls ab dem vierten Lebensmonat progressiv entwickelnde Fibrosierung des Herzmuskelgewebes, die wiederum von charakteristischen Expressionsveränderungen Fibrose-assoziiierter Gene (Kollagene, MMPs, TIMPs) begleitet war.

Im fortgeschrittenen Alter (neun Monate alt) waren an Herzen mit verstärkter Caspase-1-Expression schließlich auch die typischen makroskopischen Veränderungen insuffizienter Herzen sichtbar. Neben der Dilatation des linken Ventrikels wurde eine reduzierte linksventrikuläre Wanddicke deutlich. Gelegentlich konnte zudem eine Thrombosierung und Dilatation des linken Vorhofes festgestellt werden. Letzteres ist ein, für eine kardiale Transgenexpression unter Kontrolle des α -MHC-Promotors häufig beschriebenes Phänomen. Durch die bereits vorhandene pränatale Aktivität des α -MHC-Promotors im Vorhof können Veränderungen der Vorhöfe durch die Transgenexpression während der Embryonalentwicklung induziert werden (Ng, Grupp et al. 1991; Palermo, Gulick et al. 1996).

Im Alter von einem Jahr mündet der kardiale Phänotyp Caspase-1-transgener Mäuse in eine manifeste Herzinsuffizienz, was an der deutlichen Einschränkung der kardialen Funktion erkennbar war. Die *in vivo*-Analyse narkotisierter, Caspase-1-transgener Mäuse sowohl durch Linksherzkathetermessungen als auch durch echokardiographische Messungen zeigte eine signifikante Einschränkung der Herzkontraktilität und eine Dilatation des linken Ventrikels.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die herzspezifisch exprimierte Caspase-1 unter Basalbedingungen aktiv ist. Die verstärkte Expression der kardialen Caspase-1 ist ausreichend, spezifisch einen der humanen Herzinsuffizienz ähnlichen kardialen

Phänotyp zu induzieren. Die Tatsache, dass die beschriebenen molekularbiologischen, morphologischen und funktionellen Veränderungen in den Caspase-1-transgenen Mäusen erst ab dem vierten Lebensmonat beginnen, legt jedoch die Vermutung nahe, dass es sich bei diesem Phänotyp vielmehr um einen sekundären Effekt, als um die direkte kausale Konsequenz der Caspase-1-Expression handelt. Was also ist die direkte Funktion der kardialen Caspase-1?

2 Abwesenheit einer proinflammatorischen Wirkung durch kardiale Caspase-1

In der Literatur wird die Caspase-1 als ein, über die Generierung von IL-1 β und IL-18 wirkender, proinflammatorischer Mediator beschrieben (Dinarello 1997; Dinarello 1998; Dinarello 1999; Siegmund 2002). Beides sind proinflammatorischen Zytokine und als solche zentrale Mediatoren bei entzündlichen Prozessen.

IL-1 β und IL-18 können dann als inflammatorische Trigger und generelle Signalverstärker entzündlicher Prozesse über eine Infiltration von Entzündungszellen und einer verstärkten Expression weiterer Zytokine zu einer Zunahme des oxidativen Stresses und zu verstärkter Gewebsnekrose führen. Es ist also denkbar, dass Caspase-1 über die IL-1 β - und IL-18-vermittelten Prozesse in der Summe Geweberemodelling induziert und auf diese Weise zu der Entstehung und dem Voranschreiten einer Herzmuskelschwäche beitragen kann.

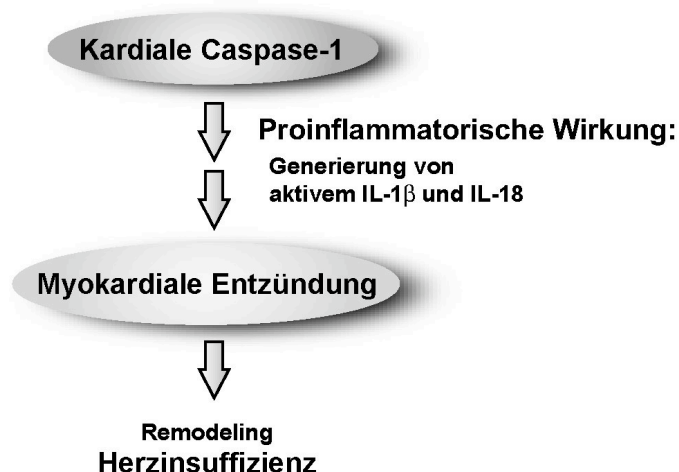


Abbildung 36: Hypothetischer Wirkmechanismus kardialer Caspase-1 als proinflammatorischer Mediator bei Herzinsuffizienz.

Die Analyse der systemischen und lokalen kardialen Konzentration an IL-1 β und IL-18 in Caspase-1-transgenen Mäusen zeigte identische Mengen für beide Zytokine im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Tieren. Für IL-1 β wurde dieser Befund darüber hinaus durch

die sehr sensitive Methode der immunhistochemischen Färbung untermauert. Hierbei ist die unveränderte Bildung von aktivem IL-1 β nicht auf das Unvermögen der exprimierten humanen Caspase-1 zurückzuführen, das endogene murine pro-IL-1 β zu schneiden. Die murine und humane Caspase-1 sind nicht nur in ihren grundlegenden charakteristischen Eigenschaften identisch, sondern weisen neben ihrem hohen Grad an Sequenzhomologie auch eine weitgehende Übereinstimmung in ihrem Verhalten bezüglich Substratspezifität und Inhibierbarkeit auf (Molineaux, Casano et al. 1993). Murines und humanes pro-IL-1 β weist für die Caspase-1 zwei Caspase-spezifische Schnittstellen nach einem Aspartat auf. Lediglich an der zweiten Schnittstelle in der murinen Form ist das dem Aspartat folgende Alanin durch ein Valin ersetzt. Valin unterscheidet sich von Alanin ausschließlich durch zwei zusätzliche Methylgruppen. In einer *in vitro*-Untersuchung ist nachgewiesen worden, dass humane Caspase-1 humanes und murines pro-IL-1 β mit nahezu identischer Effizienz zu aktivem IL-1 β prozessieren kann (Howard, Kostura et al. 1991; Molineaux, Casano et al. 1993).

Sowohl für IL-1 β als auch IL-18 sind erhöhte Serumspiegel bei humaner Herzinsuffizienz beschrieben (Testa, Yeh et al. 1996; Naito, Tsujino et al. 2002). Ferner wurde bei der humanen Herzinsuffizienz in zahlreichen Studien eine gesteigerte lokale und systemische Konzentration an proinflammatorischen Zytokinen, speziell IL-1 β , TNF- α und IL-6 gemessen (Testa, Yeh et al. 1996; Torre-Amione, Kapadia et al. 1996; Francis, Holden et al. 1998; Torre-Amione, Stetson et al. 1999; Deswal, Petersen et al. 2001; Malave, Taylor et al. 2003). Auch in murinen Herzinsuffizienzmodellen wurde eine verstärkte Expression dieser Zytokine gezeigt (Dai, Dheen et al. 2004; Nian, Lee et al. 2004). Kardiales IL-1 β stammt größtenteils von in das Myokard infiltrierenden Makrophagen, aber auch eine gewisse lokale Produktion von IL-1 β in Herzmuskelzellen ist beschrieben. Die InCHIANTI Studie zeigte eine signifikante Korrelation zwischen gemessenen IL-1 β Serumwerten und kongestiver Herzinsuffizienz (Di Iorio, Ferrucci et al. 2003). Im Gegensatz hierzu konnte ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen diesen proinflammatorischen Zytokinen und einer Herzinsuffizienz in einer Studie herzinsuffizienter Ratten nicht bestätigt werden (Lou, Danelisen et al. 2004). Hierbei konnte lediglich eine leicht erhöhte TNF- α -Konzentration im Endstadium gemessen werden, für IL-1 β und IL-6 sind hier keine erhöhten Werte beschrieben.

Um eine Aktivierung entzündlicher Vorgänge durch IL-1 β im Myokard Caspase-1 transgener Mäuse zu untersuchen, wurden Herzmuskelschnitte auf Veränderungen in der Proteinexpression bekannter IL-1 β und IL-18 regulierter Targetgene untersucht. Es gab keinerlei Hinweise auf ein verändertes Expressionsmuster dieser Proteine durch die verstärkte kardiale Expression von Caspase-1. Darüber hinaus zeigten weitere

Untersuchungen, abgesehen von einer leicht erhöhten Makrophageninfiltration keinerlei Hinweise auf eine IL-1 β induzierte erhöhte Infiltration von Zellen des Immunsystems.

IL-1 β stellt neben TNF α , einen potenten Aktivator der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in der Herzmuskelzelle dar. Die somit einhergehende Erhöhung des NO-Spiegels führt in Herzmuskelzellen durch eine Erhöhung des intrazellulären cGMP zu einer Verminderung der kardialen Kontraktilität (Ing, Zang et al. 1999). Für IL-1 β und IL-18 ist neben TNF α in der Literatur ein negativ inotroper Effekt beschrieben (Kumar, Thota et al. 1996; Cain, Meldrum et al. 1999). Neben dieser kardiodepressiven Wirkung kann IL-1 β , neben TNF α , direkt oder NO-vermittelt zu einem Anstieg an intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) führen. ROS selbst kann dann über eine Aktivierung von Tyrosinkinase myokardiale Entzündungsvorgänge triggern, über Ionenkanäle in den Ca²⁺-Haushalt der Herzmuskelzellen eingreifen, zu einer verstärkten Expression proinflammatorischer Gene führen und den MAPKinase-Signalweg aktivieren. In der Summe können so reaktive Sauerstoffspezies besonders über entzündlich-zellschädigende Prozesse DNA-Schäden und Gewebnekrose verursachen und auf diesem Weg zu ventrikulärem Remodeling und somit zum Voranschreiten der Herzmuskelschwäche beitragen (Elahi, Asopa et al. 2007; Takimoto and Kass 2007).

Auch dieser mögliche Aspekt eines IL-1 β -vermittelten Phänotyps in dem von uns untersuchten Herzinsuffizienzmodell Caspase-1-transgener Mäuse konnte ausgeschlossen werden. Sowohl der ROS-Status, als auch ROS-verursachte DNA-Schäden, als auch nekrotische Zellschäden waren im Myokardgewebe Caspase-1-transgener Mäuse im Vergleich zu entsprechendem Kontrollgewebe unverändert.

Der Einfluss von IL-1 β und IL-18 auf myokardiales Remodeling ist in der Literatur teils widersprüchlich beschrieben. Für IL-1 β wurde *in vitro* und *in vivo* gezeigt, dass es, meist NO vermittelt, die Expression von Kollagenen, MMPs und TIMPs beeinflusst, und auf diese Weise zu kardialem Remodeling beitragen kann (Barton, Birks et al. 2003; Murtuza, Suzuki et al. 2004; Siwik and Colucci 2004). Durch ein Verschieben des Gleichgewichts zwischen MMPs und TIMPs wird der Kollagenumbau angetrieben und vermehrt interstitielles Kollagen in das Myokard eingelagert. In der Summe führt dies über einen gesteigerten Kollagenumbau im Myokard zu einer fortschreitenden Fibrosierung des Gewebes. Die folgende langsame Versteifung des Herzmuskels wird in einer Abnahme der Herzkontraktilität sichtbar. Des Weiteren fördert IL-1 β durch Stimulation der kardialen Fibroblasten-Migration myokardiales Remodeling (Mitchell, Laird et al. 2007). *In vitro* wurde an NRCM gezeigt, dass IL-1 β Kardiomyozytenhypertrophie induziert jedoch Proliferation von Fibroblasten

inhibiert (Palmer, Hartogensis et al. 1995). Ebenfalls ist bekannt, dass charakteristische Merkmale kardialen Remodelings wie Kardiomyozytenhypertrophie und der Wechsel zum fetalen Genexpressionsprogramm durch IL-1 β getriggert werden können (Thaik, Calderone et al. 1995). Aber auch eine Rolle für IL-1 β als negativer transkriptioneller Regulator von β -MHC und Aktin ist beschrieben (Patten, Hartogensis et al. 1996). Kardiales IL-18 induziert über die Aktivierung des PI3K/Akt/GATA4-Signalweges eine verstärkte ANF-Expression und Kardiomyozytenhypertrophie (Chandrasekar, Mummidi et al. 2005). In der Studie eines kardialen Drucküberlastungsmodell von IL-18-defizienten Mäusen zeigten diese eine reduzierte reaktive kardiale Hypertrophie (Colston, Boylston et al. 2007).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten sprechen auch hinsichtlich der Induktion von kardialem Remodeling gegen einen IL-1 β bzw. IL-18 assoziierten Phänotyp. In den von uns untersuchten Caspase-1-transgenen Mäusen traten Kardiomyozytenhypertrophie und Fibrose erst ab dem vierten Lebensmonat im Herzgewebe Caspase-1-transgener Mäuse auf. In jungen Caspase-1-transgenen Mäusen konnten selbst auf mRNA-Ebene keine Veränderungen in der Expression fetaler und Fibrose-assoziiierter Gene gemessen werden. Es liegt also eine deutlich sichtbare, zeitliche Diskrepanz zwischen dem Beginn einer möglichen IL-1 β - und IL-18-Generierung durch Caspase-1 mit dem Eintritt der Geburt und dem Auftreten eines möglichen durch IL-1 β oder IL-18 potentiell verursachten kardialen Phänotyps vor.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Befunde deutlich gegen die eingangs von uns aufgestellte Hypothese sprechen. Der Caspase-1-induzierte kardiale Phänotyp wird nicht über die klassische Funktion der Caspase-1 als proinflammatorischer Mediator durch Generierung von aktivem IL-1 β und IL-18 induziert. In der Caspase-transgenen Maus sind weder eine gesteigerte kardiale Entzündungsreaktion noch ein Anstieg von oxidativem Stress oder von Gewebsnekrose detektierbar.

Ob nun die wiederholt beschriebene, verstärkte Expression proinflammatorischer Zytokine bei Herzinsuffizienz kausal mit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz verknüpft ist, oder einen sekundären Effekt durch die im Herzmuskel stattfindenden Prozesse bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz darstellt, ist bis heute nicht endgültig geklärt. Für letzteres spricht die Tatsache, dass die chronische β -adrenerge Stimulation, wie sie charakteristisch für die Entstehung einer Herzinsuffizienz ist, die lokale und myokardiale Expression dieser proinflammatorischen Zytokine (IL-1 β , TNF α , IL-6 und IL-18) induziert (Murray, Prabhu et al. 2000). Diese Tatsache stellt vermutlich einen Teilaspekt der therapeutischen Wirkung von β -Blockern bei der Therapie der Herzinsuffizienz dar (Prabhu, Chandrasekar et al. 2000; Werner, Werdan et al. 2001).

3 Induktion von Apoptose durch Caspase-1 im Myokard

Caspase-1 wurde als Strukturhomolog zu dem in *C.elegans* beschriebenen proapoptotischen Protein CED-3 identifiziert (Yuan, Shaham et al. 1993; Xue, Shaham et al. 1996; Miller, Myerson et al. 1997) und weist eine hohe strukturelle Homologie zu Caspase-3 auf, der zentralen Schlüsselcaspase in der proapoptotischen Caspase-Kaskade. Abgesehen von diesen strukturellen Aspekten gibt es in der Literatur funktionelle Daten, die für eine proapoptotische Funktion der Caspase-1 sprechen. In Untersuchungen in Zellkultur konnte ein Apoptose-induzierender Effekt der Caspase-1 nach Transfektion in Fibroblasten (Rat-1 Zellen) demonstriert werden (Miura, Zhu et al. 1993). In einem Haut-selektiven Caspase-1-transgenen Mausmodell konnte neben erhöhten IL-1 β - und IL-18-Konzentrationen eine erhöhte Apoptoserate detektiert werden (Yamanaka, Tanaka et al. 2000). Während für Caspase-1 in Lymphozyten ein Fas-vermittelter proapoptotischer Effekt nachgewiesen wurde (Enari, Talanian et al. 1996), konnte in Jurkat T-Zellen eine Beteiligung der Caspase-1 bei extrinsisch induzierter Apoptose ausgeschlossen werden (Chow, Slee et al. 1999). Nach Injektion eines α -MHC-Caspase-1-cDNA Konstruktes in dermales Gewebe von Mäusen konnte die nachgeschaltete, starke Entzündungsreaktion durch Gabe eines IL-1 β -Antikörpers unterdrückt werden. Die Ausschaltung von IL-1 β hatte jedoch keinen Einfluss auf die erhöhte Apoptoserate (Asahi, Mizutani et al. 1999). Dieser Befund weist auf einen von IL-1 β und IL-18 unabhängigen proapoptotischen Charakter der Caspase-1 hin, was so auch in der Literatur diskutiert wird (Dinarello 1996). Eine kürzlich publizierte Studie zeigt, dass Caspase-1 für die Spaltung des Autoantigens PM/Scl-75 während Apoptose bei dem Polymyositis/scleroderma overlap syndrome (PM/Scl), einer systemischen Autoimmunerkrankung aus dem Bereich der entzündlichen Bindegewebserkrankungen, verantwortlich ist (Schilders, Raijmakers et al. 2007). Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine wesentliche Rolle der Caspase-1 als Mediator apoptotischer Prozesse im Bereich des Nervensystems und des Gehirns (Hara, Friedlander et al. 1997; Zhang, Wang et al. 2003). Dennoch gibt es in der Literatur auch Untersuchungen, die gegen eine generelle Involvierung der Caspase-1 bei apoptotischen Prozessen sprechen (Kuida, Lippke et al. 1995; Li, Allen et al. 1995).

Während eine Beteiligung der Caspase-1 bei apoptotischen Prozessen bisher primär in Zusammenhang mit entzündlichen Autoimmunerkrankungen oder bei neuronalem Zelltod beschrieben ist, gibt es erst seit kurzem erste Hinweise auf eine proapoptotische Funktion der Caspase-1 im kardiovaskulären Bereich, wobei hierbei die Funktion der Caspase-1 im Schädigungsmodell der operativen Ischämie/Reperfusion untersucht wurde. Caspase-1-defiziente Mäuse zeigen neben einer verminderten Sterblichkeit und

einer geringeren Ventrikeldilatation auch eine Reduktion in der Apoptoserate. Während keine Unterschiede für die Expression von IL-1 β , TNF α und IL-6 gefunden wurden, konnte eine verminderte Expression für IL-18 gemessen werden (Frantz, Ducharme et al. 2003). In der Studie von Syed et al. wurden komplementär hierzu Caspase-1 transgene Mäuse nach operativer Ischämie/Reperfusion untersucht (Syed, Hahn et al. 2005). Es wurde gezeigt, dass eine erhöhte Expression der Caspase-1 in diesem Schädigungsmodell nachteilig ist, da sie zu einer Zunahme der Infarktgröße, einer gesteigerten Apoptoserate und einer verstärkten Aktivierung der Caspase-3 führt. Für den proapoptotischen Effekt der Caspase-1 in dieser Studie wird von Syed et al. eine direkte Aktivierung der Caspase-3 durch die Caspase-1 vorgeschlagen (Syed, Hahn et al. 2005).

Ist der in dieser Arbeit beschriebene kardiale Phänotyp einer Herzinsuffizienz im Caspase-1-transgenen Mausmodell durch eine Caspase-1-vermittelte Induktion von Kardiomyozytenapoptose verursacht? Der apoptotische Zelltod von Herzmuskelzellen wird in der Literatur als ein wesentlicher Faktor für die Entstehung und Progression einer Herzinsuffizienz beschrieben.

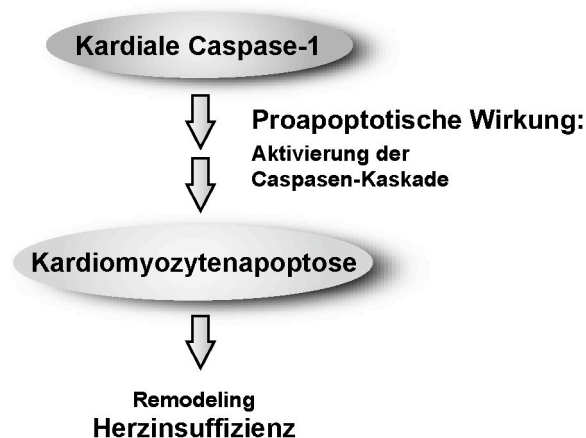


Abbildung 37: Alternativer Wirkmechanismus kardialer Caspase-1 als proapoptotischer Mediator bei Herzinsuffizienz.

Zur Detektion von apoptotischem Zelltod von Herzmuskelzellen wurde die Standardmethode der TUNEL-Färbung (Gavrieli, Sherman et al. 1992) durchgeführt. Durch die TUNEL-Färbung können Einzel- und Doppelstrangbrüche mit freien 3'OH-Enden detektiert werden. Ein nicht zu vernachlässigender Nachteil dieser Methode besteht darin, dass die nekrotisch bedingte DNA-Fragmentierung zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann. Durch die CCC9-Färbung konnte ein möglicher verstärkter Zelltod von Kardiomyozyten durch Nekrose in den Caspase-1-transgenen Tieren ausgeschlossen werden. Die, durch immunhistochemische Färbung

detektierte, leicht erhöhte Makrophageninfiltration im Gewebe der Caspase-1-transgenen Mäuse ist daher nicht durch eine Nekrose-bedingte Infiltration zu erklären. Vielmehr sind die Makrophagen für die vollständige Elimination der apoptotischen Körperchen am Ende eines apoptotischen Prozesses nötig. Beim nekrotischen Zelltod induziert der Verlust der Membranintegrität die Freisetzung lysosomaler Enzyme ins extrazelluläre Milieu. Infolgedessen ist nekrotischer Zelluntergang durch eine starke Involvierung der umliegenden Zellen charakterisiert. Während Nekrose also in der Regel in sogenannten Nekrosenestern von mehreren Zellen auftritt, sind durch apoptotischen Zelltod meist Einzelzellen betroffen. Selbiges galt für apoptotische Zellkerne in unmittelbarer Randlage eines Gewebeschnittes, da diese großteils auf Schädigungsvorgänge bei der Gewebeentnahme zurückzuführen sind.

In den Caspase-1-transgenen Mäusen zeigte sich eine deutliche, konstant erhöhte Kardiomyozytenapoptose im Vergleich zu entsprechendem Wildtyp-Kontrollgewebe. Mit am stärksten ausgeprägt war die Apoptose von Herzmuskelzellen in jungen, einen und vier Monate alten Tieren. In diesem Alter trat eine ca. 7-fache Erhöhung der Apoptoserate (0,06% WT vs. 0,4 % Caspase-1-TG) in Herzen mit transgener Expression der Caspase-1 auf. Diese zunächst gering erscheinende Zunahme an Kardiomyozytenapoptose kann langfristig entscheidend zur Entstehung einer Herzinsuffizienz beitragen. Der zeitliche Rahmen für den apoptotischen Untergang einer Zelle liegt im Bereich von einer bis 24 Stunden. Im Mittel kann das theoretisch bedeuten, dass im adulten, postmitotischen Herzmuskelgewebe auf diese Weise alle zwölf Stunden 0,4% aller Kardiomyozyten unwiederbringlich verloren gehen. Aus Untersuchungen der Apoptoserate bei humaner Herzinsuffizienz ist bekannt, dass eine acht bis 25-fache Zunahme an Kardiomyozytenapoptose ausreichend ist, den Übergang zu einer Herzinsuffizienz zu induzieren (0,01% gesundes Myokard vs. 0,08-0,25% Herzinsuffizienz im Endstadium) (Olivetti, Abbi et al. 1997; Guerra, Leri et al. 1999; Mani and Kitsis 2003). In der Studie eines aktivierbaren Caspase-8-transgenen Mausmodells konnte erstmalig ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Apoptose und der Induktion einer Herzinsuffizienz *in vivo* nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde in dieser Studie demonstriert, dass bereits sehr geringe Apoptoseraten ausreichend für den Übergang in eine Herzinsuffizienz sind (Wencker, Chandra et al. 2003).

Trotz der deutlichen Kardiomyozytenapoptose konnte in dem Caspase-1-transgenen Mausmodell die verstärkte Expression der kardialen Caspase-1 nicht mit einer erhöhten Sterblichkeit korreliert werden. Mögliche Gründe hierfür können sein, dass die generelle Lebenserwartung von Mäusen mit durchschnittlich eineinhalb bis zwei Jahren relativ kurz ist. Ferner war mit zunehmendem Alter eine Abnahme der Apoptoserate von durchschnittlich 0,4% auf 0,17% im Alter von 14 Monaten erkennbar. Es ist bekannt,

dass es bei fortschreitender Herzinsuffizienz im Rahmen der Reexpression fetaler Gene zu einer Reduktion der Expression der α -MHC-Isoform zugunsten der fetalen β -MHC Isoform kommt. Vermutlich dadurch kommt es in den Caspase-1-transgenen Mäusen mit zunehmendem Alter zu einer verminderten Expression der Caspase-1. Dies stellt eine mögliche Erklärung für die etwas geringere Apoptoserate in alten, herzinsuffizienten Caspase-1-transgenen Mäusen dar.

Ein genereller Nachteil transgener Mausmodelle zur Funktionsanalyse von Zielgenen ist, dass weder das Ausmaß der Transgenexpression, noch der Locus der Insertion der Transgenvektors in die DNA gesteuert werden können. Gerade mit dem herzzpezifischen α -MHC-Promotor werden, abhängig von der basalen endogenen Genexpression, meist unphysiologisch hohe Expressionswerte des Zielgenes induziert. Dies birgt die Gefahr der Ausbildung unspezifischer kardialer Phänotypen. Ferner kann der willkürliche Einbau des Transgenvektors in das Genom essentielle endogene Proteine in ihrer Expression oder Funktionalität beeinträchtigen und auf diese Weise einen unspezifischen Phänotyp induzieren.

Für den Nachweis der Spezifität des kardialen Phänotyps für Caspase-1 wurden zwei Transgenlinien (Casp-1 TG1 und Casp-1 TG10) mit unterschiedlich starker Caspase-1-Expression etabliert. Entsprechend der geringeren Expression der Caspase-1 in der zweiten Linie Casp-1 TG1 zeigte sich im Bezug auf Kardiomyozytenhypertrophie, Myokardfibrose und linksventrikulärer Funktion ein milderer kardialer Phänotyp. Durch die geringere Caspase-1-Expression wird in dieser Linie entsprechend weniger Apoptose induziert. Da es sich bei den untersuchten Parametern um solche, die durch Apoptose sekundär induzierten kardialen Phänotyps handelt, ist demzufolge denkbar, dass die Ausbildung des Phänotyps durch den geringeren Stimulus entsprechend zeitverzögert ist. Möglicherweise wird durch die geringere Apoptose ein nötiger Schwellenwert der Myokardschädigung erst viel langsamer erreicht. Ferner ist denkbar, dass durch die geringere Menge an aktiver Caspase-1 die Apoptoseinduktion entsprechend weniger stimuliert wird. Da die Apoptoseinduktion im Zuge der Caspase-Kaskade ein sich selbst verstärkender Mechanismus ist, sind auch diese Mechanismen weniger aktiviert. Eine detaillierte Analyse der Apoptoserate in der Linie Casp-1 TG1 wäre zum genauen Verständnis nötig. Dennoch konnte mit der Linie Casp-1 TG1 belegt werden, dass der kardiale Phänotyp in den Caspase-1-transgenen Mäusen durch Caspase-1 induziert wurde und kein Überexpressions-Artefakt ist.

Um den direkten proapoptotischen Effekt der Caspase-1 auf Herzmuskelzellen zu belegen, wurden neonatale Rattenkardiomyozyten mit einem Caspase-1-exprimierenden Adenovirus (Adv-Casp-1), bzw. einem LacZ-exprimierenden Kontrollvirus (Adv-LacZ) infiziert. In diesen *in vitro*-Versuchen konnte der Caspase-1-

abhängige, proapoptotische Effekt durch dosis-abhängige Zunahme der Apoptoserate nach Infektion mit einem Caspase-1 exprimierenden Adenovirus bestätigt werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Expression der kardialen Caspase-1 *in vitro* und *in vivo* zu einer Induktion des apoptotischen Zelltods von Herzmuskelzellen führt.

Ist der proapoptotische Effekt einer künstlich induzierten, verstärkten Expression der kardialen Caspase-1 auf die endogen exprimierte, kardiale Caspase-1 übertragbar, und stellt die Ausschaltung der endogenen Caspase-1 infolgedessen einen Vorteil in einem Herzinsuffizienzmodell dar?

Zum Nachweis der Spezifität der proapoptotischen Wirkung der Caspase-1 wurde die Konsequenz einer Ausschaltung der endogenen Caspase-1 untersucht. Hierzu wurden Mäuse verwendet, in denen die Caspase-1 ubiquitär durch homozygote Gendeletion ausgeschaltet wurde. Ischämie-Reperfusion ist ein operatives Schädigungsmodell, das effektiv Kardiomyozytenapoptose induziert. Die Ausschaltung der endogenen Caspase-1 erwies sich als eine wirksame Strategie zur Reduktion Ischämie/Reperfusion-induzierter Apoptose von Herzmuskelzellen. Dennoch konnte zu dem untersuchten Zeitpunkt von 24 Stunden Reperfusion nach 30minütiger Ischämie im Gegensatz zu den Befunden von Frantz et al. keine Verminderung der Infarktgröße in den Caspase-1-defizienten Mäusen festgestellt werden (Frantz, Ducharme et al. 2003).

Schließlich wurden die Caspase-1-defizienten Mäuse in einem Herzinsuffizienzmodell untersucht. Dazu wurden sie einem operativen Herzinfarkt (MI) unterzogen und ihr Postinfarkt-Phänotyp mit dem der Wildtyp-Kontrollgruppe verglichen. Die Ausschaltung der endogenen Caspase-1 führte neben einer signifikanten Reduktion der reaktiven Kardiomyozytenhypertrophie auch zu einer funktionellen Verbesserung der Kontraktilität des verbleibenden Myokards. Darüber hinaus zeichnete sich in den Caspase-1-defizienten Mäusen ein deutlicher Trend zu einer erhöhten Überlebensrate bis zu acht Wochen nach MI ab. Unterschiede in der Infarktgröße waren zu dem untersuchten Zeitpunkt nicht erkennbar, was möglicherweise auf das relativ kurze Zeitfenster von acht Wochen zurückzuführen ist. Unsere Untersuchungen untermauern den in einer Studie von Frantz et al. beschriebenen protektiven Effekt einer Ausschaltung der endogenen Caspase-1 nach Herzinfarkt. Caspase-1-defiziente Mäuse sind auch in dieser Studie bezüglich Überlebensrate, linksventrikulärer Dilatation und Apoptoserate deutlich im Vorteil (Frantz, Ducharme et al. 2003).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die kardiale Caspase-1 spezifisch apoptotischen Zelltod von Herzmuskelzellen *in vivo* und *in vitro* induziert. Im Gegenzug kann eine Ausschaltung der Caspase-1 Apoptose signifikant reduzieren. Da Caspase-1-defiziente Mäuse eine normale physiologische Entwicklung aufzeigen, ist Caspase-1 für

die zu einer gesunden Entwicklung nötigen apoptotischen Prozesse offensichtlich nicht essentiell (Li, Allen et al. 1997). Eine generelle Notwendigkeit der Caspase-1 zur Induktion von apoptotischen Prozessen scheint demzufolge nicht der Fall zu sein. Vielmehr muss von einer Induktion bzw. autokatalytischen Aktivierung der kardialen Caspase-1 während pathophysiologischer Umstände, beispielsweise im Anfangsstadium einer Herzinsuffizienz oder nach kardialer Schädigung ausgegangen werden. Kardiale Caspase-1 fungiert möglicherweise selektiv unter pathologischen Bedingungen als starker Aktivator der apoptotischen Caspase-Kaskade.

Schließlich stellte sich somit die Frage, welcher der zugrunde liegende Signalweg für die Induktion der Kardiomyozytenapoptose durch Caspase-1 ist.

Der Vorgang der Apoptose lässt sich in zwei Phasen, die Initiations- und die Effektorphase unterteilen. Die Initiationsphase kann primär über den extrinsischen, (Todesrezeptor vermittelten) Signalweg und den intrinsischen (mitochondrialen) Signalweg ablaufen. Eine Aktivierung der Caspase-8 kann als Charakteristikum einer extrinsisch vermittelten Apoptoseinduktion angesehen werden, eine Aktivierung der Caspase-9 entsprechend für die intrinsisch vermittelte Apoptoseinduktion. Über beide Signalwege wird schließlich die nachgeschaltete, beiden Signalwegen gemeinsame Endstrecke der Caspase-Kaskade initiiert. Die Aktivierung der apoptotischen Caspase-Kaskade endet schließlich in einer Aktivierung der Caspase-3, die als finale Effektorcaspase den Untergang der Zelle durch apoptotische Elimination einleitet.

Um eine möglichst kausale Aussage über die Wirkung der Caspase-1 auf Caspasen-abhängige Signaltransduktionswege zu erhalten, wurde diese Fragestellung in einer Serie von *in vitro* Experimenten mit neonatalen Rattenkardiomyozyten bearbeitet. So kann die Gefahr der Überlagerung mit möglichen Sekundäreffekten, beispielsweise *in vivo* durch das Voranschreiten der Herzinsuffizienz in der Caspase-1-transgenen Maus, ausgeschlossen werden. Durch Verwendung spezifischer Antikörper gegen die jeweils aktivierte, d.h. prozessierte Caspase konnte das Ausmaß der Caspase-Aktivierung im Vergleich zur Kontrollgruppe bestimmt werden. Hierbei zeigte sich, dass Caspase-1 eine Aktivierung der Caspase-3 induziert, was die Involvierung der Caspase-Kaskade für die Apoptoseinduktion durch Caspase-1 verdeutlicht. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass Caspase-1 eine signifikante Aktivierung der Caspase-9 induziert. Eine Aktivierung der Caspase-8 durch Caspase-1 war nicht detektierbar. Dieser Hinweis auf eine selektive Aktivierung des intrinsischen Signalweges durch Caspase-1 konnte durch die Verwendung von Caspase-Inhibitoren belegt werden. Appliziert man den Caspase-1-spezifischen Inhibitor RU36384, der aktive Metabolit des inaktiven Prodrugs Pranalcasan (Sanofi-Aventis), lässt sich der proapoptotische Effekt der Caspase-1 unterdrücken. Dieselbe Wirkung zeigt eine Inkubation mit dem Breitspektrum-Caspase-

Inhibitor zVAD-fmk. Im Gegensatz konnte durch die Inkubation mit dem Caspase-8-spezifischen Inhibitor zIETD-fmk der proapoptotische Effekt der Caspase-1 nicht inhibiert werden.

Welchem der beiden apoptotischen Signaltransduktionswege (intrinsisch und extrinsisch) welche Funktion im Herzen zukommt ist unklar. Ganz allgemein wird davon ausgegangen, dass der extrinsische Signalweg für die Regulation der Gewebshomöostase der vorherrschende ist, während der intrinsische Signalweg als interner Sensor für apoptotische Signale, beispielsweise DNA-Schädigungen dient (Danial and Korsmeyer 2004; Fadeel and Orrenius 2005).

In der Summe weisen diese Ergebnisse darauf hin, daß die proapoptotische Wirkung der Caspase-1 nicht über eine Aktivierung des extrinsischen Signalwegs erfolgt. Vielmehr scheint der proapoptotische Effekt der Caspase-1 über selektive Aktivierung des intrinsischen Signalwegs vermittelt zu sein, wobei die Caspase-1 die Caspase-9 aktiviert.

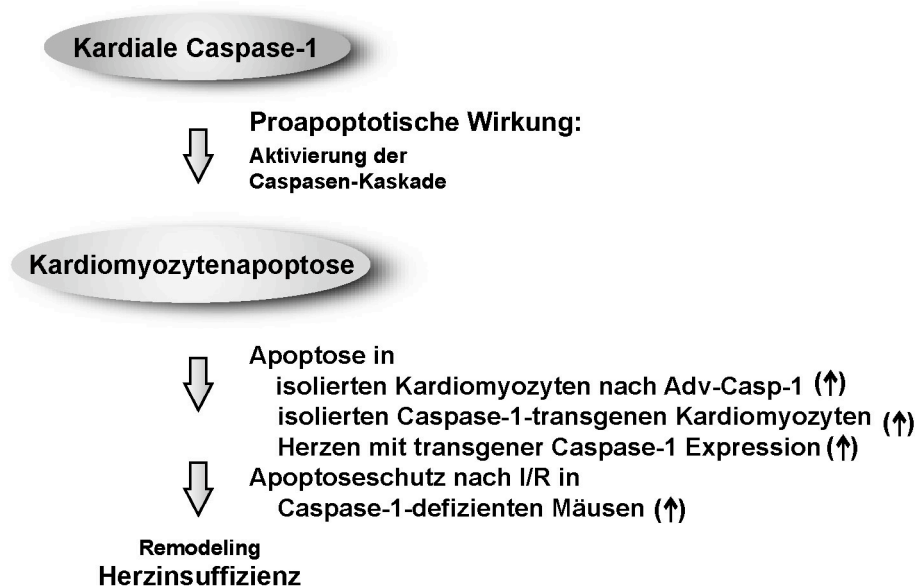


Abbildung 38: Kardiale Caspase-1 ist ein proapoptotischer Mediator.

Widersprüchlich zu dem Befund einer selektiven Aktivierung des intrinsischen Signalweges durch kardiale Caspase-1 postulieren Syed et al. eine direkte Aktivierung der Caspase-3 durch die Caspase-1. In Hypoxie-stimulierten HEK293-Zellen konnte weder eine Caspase-1-abhängige Aktivierung der Caspase-8 noch der Caspase-9 gemessen werden (Syed, Hahn et al. 2005).

Jedoch gibt es in der Literatur indirekte Hinweise, die für eine Involvierung der Caspase-1 bei der Aktivierung des intrinsischen Signalweges sprechen. In einer Studie

mit anti-Fas-stimulierten Zellen konnte eine Aktivierung der Caspase-1 durch den extrinsischen Signalweg nicht gezeigt werden (Chow, Slee et al. 1999).

Die autokatalytische Aktivierung der Caspase-1 und die Spaltung des pro-IL1 β erfolgt wie bereits erwähnt in dem sogenannten Komplex Inflammasome, bestehend aus den beiden Adaptorproteinen ASC und NALP1 der Caspase-1 und vermutlich der Caspase-5 (Martinon and Tschopp 2004; Martinon and Tschopp 2007). In einer 2007 erschienen Studie wird die bisher auf inflammatorische Prozesse reduzierte Aktivierung der Caspase-1 in dem Inflammasom durch NALP1 mit der apoptotischen Signaltransduktion des intrinsischen Signalweges verbunden. In dieser Studie wird demonstriert, dass die NALP1-gesteuerte Aktivierung der Caspase-1 im Inflammasom durch Bindung der antiapoptotischen Proteine der BCL-2 Familie (Bcl-2, Bcl-xl) an NALP1 inhibiert wird (Bruey, Bruey-Sedano et al. 2007). Dieser Befund ist besonders im Hinblick auf die in dieser Arbeit vorgestellten Daten, die für eine proapoptotische Wirkung der kardialen Caspase-1 durch Induktion des intrinsischen Signalweges sprechen, interessant. So ist es theoretisch denkbar, dass Caspase-1 im gesunden Herz durch die antiapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie in seiner apoptotischen Wirkung inhibiert wird. Durch eine Expressionsverschiebung dieser anti-apoptotischen Gene zugunsten proapoptotischer Gene (Bax) unter pathophysiologischen Bedingungen (Condorelli, Morisco et al. 1999; Latif, Khan et al. 2000) kann diese Inhibition aufgehoben werden. Infolgedessen kann Caspase-1 in ihre aktive Form prozessiert werden und ihre proapoptotische Wirkung durch Aktivierung des intrinsischen Signalweges zeigen.

Neben der Aktivierung der Caspase-1 im Inflammasom, sind die RIP-2-Kinase (receptor interacting protein 2 kinase) (Zhang, Wang et al. 2003), Ipaf (ICE-protease-activating factor) (Poyet, Srinivasula et al. 2001) und Caspase-11 (Wang, Miura et al. 1998) in der Literatur als Aktivatoren der Caspase-1 beschrieben. Die Fähigkeit einer RIP-2 oder Ipaf-aktivierten Caspase-1 zur Generierung von aktivem IL-1 β wurde bisher nicht beschrieben.

Im Inflammasom gebunden kann Caspase-1 über seine CARD-Domäne mit RIP2 interagieren, was eine Aktivierung von Nf κ B bewirkt (Lamkanfi, Kalai et al. 2004) (Sarkar, Duncan et al. 2006). RIP2 selbst enthält ebenfalls eine CARD-Domäne und kann über diese Caspase-1 aktivieren. In einer Studie von 2003 in Neuronen konnte ein RIP2-abhängiger proapoptotischer Effekt für Caspase-1 nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass RIP2-aktivierte Caspase-1 Bid in das proapoptotische tBid überführt, das nachfolgend die Freisetzung von proapoptotische Faktoren aus den Mitochondrien stimuliert (Zhang, Wang et al. 2003).

Ipaf ist ein Strukturhomolog zu dem Caspase-9 Aktivator Apaf (Poyet, Srinivasula et al. 2001). Aufgrund der endogenen Expression von Ipaf in Geweben und Zellen des Immunsystems jedoch scheint eine Caspase-1-Aktivierung durch Ipaf bei der proinflammatorischen Funktion der Caspase-1 von Bedeutung zu sein. In einer Studie von 2006 wurde jedoch erstmalig gezeigt, dass neben RIP2 auch eine durch Ipaf aktivierte Caspase-1 Bid in das proapoptotische tBid überführen kann (Thalappilly, Sadasivam et al. 2006).

Aus diesen Befunden ableitend ist folgender Mechanismus für Caspase-1 denkbar: Unter pathophysiologischen Bedingungen wird durch die verminderte Expression antiapoptotischer Mitglieder der Bcl-2 Familie die Inhibition der autokatalytischen Aktivierung der Caspase-1 aufgehoben. Caspase-1 wird verstärkt exprimiert und aktiviert. Die aktive Caspase-1 überführt dann Bid durch Spaltung in das proapoptotische tBid. Dieses induziert nach Translokation an die Mitochondrien die Freisetzung proapoptotischer Faktoren, beispielsweise Cytochrom c aus dem Mitochondrium. Cytochrom c bindet in dem Apoptosom-Komplex, wodurch letztlich Caspase-9 aktiviert wird. Ferner aktiviert tBid weitere proapoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie, die nach Translokation zu einer Signalverstärkung führen. Caspase-1 könnte durch diesen Mechanismus als ein, den Mitochondrien vorgeschalteter, zentraler Regulator des Apoptose-Sensors Bid, und somit einer mitochondrial vermittelten Apoptoseinduktion dienen.

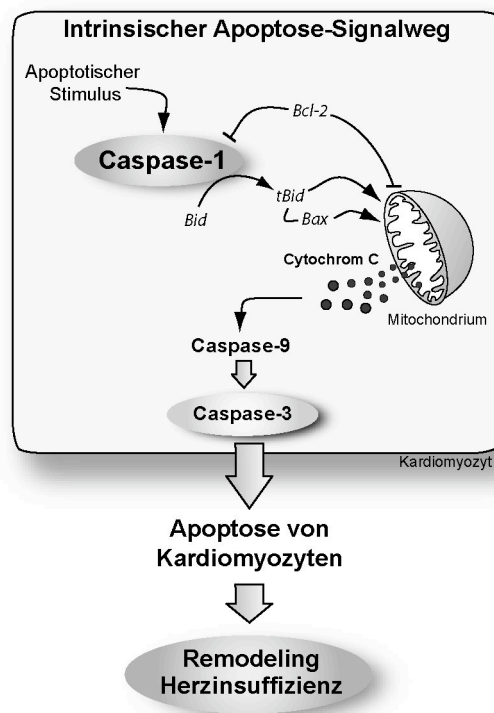


Abb 39: Hypothese zur Wirkung von kardialer Caspase-1 als postmitochondrialer apoptotischer Mediator.

Obwohl die Caspase-1 eine für Initiatorcaspasen charakteristische Struktur aufweist (lange Prodomäne, Interaktionsdomäne CARD) (Shi 2002), gibt es in der Literatur auch Hinweise auf eine Funktion der Caspase-1 im Sinne einer Effektorcaspase. Effektorcaspasen aktivieren bzw. degradieren sekundäre Zielproteine, sogenannte Caspase-Substrate und leiten damit die Endphase, speziell die morphologischen Veränderungen des apoptotischen Zelltods ein. Die funktionelle Konsequenz der Spaltung ist nicht für jedes einzelne Caspase-Substrat bekannt, in der Summe jedoch bedingt die Spaltung der Caspase-Substrate den Arrest des Zellzyklus, das Anhalten aller Reparaturmechanismen, den Zusammenbruch molekularer Strukturen, den Verlust der Zell/Zell-Kontakte und die Markierung der apoptotischen Zelle für die Phagozytose. Zu diesen Caspase-Substraten gehören neben nukleären Proteinen speziell Bausteine des Zytoskeletts und kontraktile Elemente (Schwartzman and Cidlowski 1993; Fischer, Janicke et al. 2003).

Zytoskelett- & Strukturproteine	z.B. Fodrin, Aktin, Gelsolin, Lamine
Zellzyklus & Replikation	z.B. Topoisomerase-I, MDM2/HDM2, Retinoblastomprotein, p21, p27, CyclinA
Transkription & Translation	z.B. STAT1, NFkB, Sp1
Spaltung & Reparatur von DNA	z.B. PARP, ICAD
Signaltransduktion	z.B. PKC, MEKK1, Calmodulin-Kinase IV, Procaspasen, Bcl-2, Bcl-xL, Bid, hsp90

Tabelle 4: Auflistung wichtiger Caspase-Substrate. (Modifiziert aus Fischer 2003)

Die Spaltung von Strukturproteinen wie beispielsweise Aktin oder Fodrin ist vermutlich maßgeblich an der Reorganisation (des Zytoskeletts) während der Apoptose verantwortlich (Mashima, Naito et al. 1997). Die typische internucleosomale DNA-Fragmentation ist eine Folge der Aktivierung und Translokation der Endonuclease CAD in den Zellkern, die über die Degradation der inhibitorischen Untereinheit ICAD durch Caspase-3 ermöglicht wird (Enari, Sakahira et al. 1998; Sakahira, Enari et al. 1998; Fischer, Janicke et al. 2003). Darüber hinaus ist für die Caspase-3 bekannt, dass sie kontraktile Proteine wie TroponinT, Aktin und Aktinin schneidet (Communal, Sumandea et al. 2002; Chandrashekar, Sen et al. 2004). Für Caspase-1 wurde in diesem Zusammenhang beschrieben, dass es α -Aktin, ein für das Zytoskelett essentielles Strukturprotein degradieren kann (Kayalar, Ord et al. 1996; Loppnow, Werdan et al. 1998). Ferner wurde gezeigt, dass die Proform der Caspase-1 durch apoptotische Signale, wie z.B. $\text{TNF}\alpha$ in den Zellkern translozieren kann, dort in seine aktive Form

überführt wird und Apoptose induziert kann (Mao, Jiang et al. 1998). Es ist daher vorstellbar, dass auch Caspase-1 nucleäre apoptotische Caspase-Substrate schneidet. Aus der Literatur gibt es Hinweise, dass auch Caspase-1 PARP (Poly-ADP-ribose polymerase), ein für DNA-Reparaturvorgänge essentielles Enzym, degradiert (Lazebnik, Kaufmann et al. 1994; Dinarello 1996). Ferner ist eine Caspase-1-abhängige Spaltung nukleärer Lamine gezeigt (Lazebnik, Takahashi et al. 1995). Die nukleäre Lokalisation der Caspase-1 könnte so zu einer Verstärkung des apoptotischen Signales führen. Alternativ könnte die subzelluläre Lokalisation der Caspase-1 über ihre Funktion entscheiden. Neben der genauen Analyse der Caspase-1-Aktivierung stellt die Identifizierung von Caspasen-1-Substraten in der Herzmuskelzelle einen wichtigen Aspekt für ein besseres Verständnis der proapoptotischen Funktionsweise der Caspase-1 in der Herzmuskelzelle dar.

Abschließend lassen sich die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wie folgt zusammenfassen:

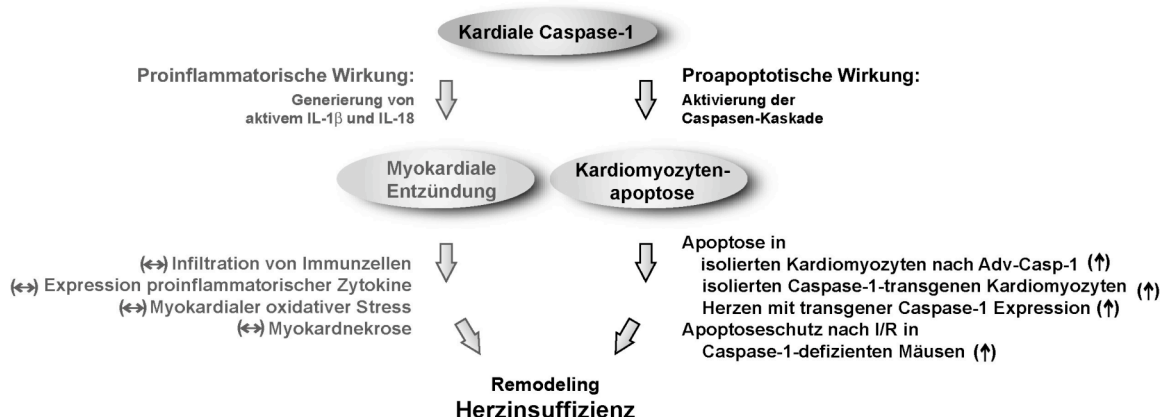


Abbildung 40: Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit.

Caspase-1 ist sowohl bei muriner als auch bei humaner Herzinsuffizienz verstärkt exprimiert. Im Caspase-1-transgenen Mausmodell wird deutlich, dass kardiale Caspase-1 nicht als proinflammatorischer Mediator agiert. Die herzzpezifische Überexpression der Caspase-1 induziert weder lokal noch systemisch eine vermehrte Bildung an aktivem IL-1 β oder IL-18. Auch eine durch diese proinflammatorischen Zytokine induzierte, verstärkte Entzündungsreaktion, ebenso wie eine verstärkte Expression ihrer Targetproteine (TNF α , INF γ , IL-4 und IL-6) bleiben aus. Ebenso kann eine Caspase-1-induzierte Zunahme an oxidativem Stress und nekrotischem Kardiomyozytenverlust in diesem Caspase-1 transgenen Mausmodell ausgeschlossen werden.

Allerdings zeigt sich eine proapoptotische Wirkung der kardialen Caspase-1 auf Herzmuskelzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Über eine Aktivierung des intrinsischen Signalweges induziert Caspase-1 mit Beginn der Transgen-Expression direkt einen deutlichen Anstieg der Apoptoserate. Dem signifikanten Verlust an Herzmuskelzellen folgten, zeitlich versetzt, typische myokardiale Umbauvorgänge, wie sie für den Übergang in eine Herzinsuffizienz charakteristisch sind. Aufgrund des apoptotischen Untergangs an Herzmuskelzellen, versucht das verbleibende Myokard den Kardiomyozytenverlust durch Ersatzfibrosierung und reaktive Hypertrophie der verbleibenden Herzmuskelzellen auszugleichen. Schließlich zeigen Herzen mit transgener Caspase-1-Expression eine dilatative Kardiomyopathie mit signifikant verminderter Herzfunktion. Die Effizienz der endogenen kardialen Caspase-1 bei der Induktion von Kardiomyozytenapoptose und der nachteilige Effekt auf das verbleibende Myokard werden im Schädigungsmodell deutlich. Caspase-1-defiziente Mäuse sind durch eine Reduktion der Kardiomyozytenapoptose nach Ischämie/Reperfusion um nahezu 75% gegenüber der Kontrollgruppe deutlich begünstigt. In dem Herzinsuffizienzmodell des operativen Herzinfarkts bewirkt die Ausschaltung der endogenen Caspase-1 darüber hinaus eine deutliche Verminderung der reaktiven Kardiomyozytenhypertrophie und einen geringeren Verlust der Herzkontraktilität. Die Verbesserung des kardialen Phänotyps durch Ausschalten der Caspase-1 spiegelt sich ferner in einer reduzierten Sterblichkeit gegenüber der Kontrollgruppe wieder.

Entsprechend der Literatur scheint Caspase-1 für die physiologische Apoptose während der Entwicklung nicht notwendig zu sein. Unter Basalbedingungen ist Caspase-1 im Myokard nur gering exprimiert. Unter pathophysiologischen Bedingungen jedoch wird Caspase-1 im Herz verstärkt exprimiert und trägt durch Induktion von Kardiomyozytenapoptose entscheidend zur Entwicklung und zum Voranschreiten einer Herzinsuffizienz bei. Eine Inhibition der Caspase-1 stellt somit ein potentielles therapeutisches Target für die Prävention einer Herzinsuffizienz dar.

II Inhibition kardialer Apoptose als Therapiestrategie

Häufig wird die Elimination von Zellen durch Apoptose als ein pathologischer Vorgang verstanden. Inzwischen ist für eine Vielzahl an Krankheiten bekannt, dass ihnen eine gestörte Regulation der Apoptose zugrunde liegt. Man unterscheidet hierbei Krankheiten, die auf einer unnatürlich hohen Apoptoserate beruhen, sogenannte hyperapoptotische Krankheiten (z.B. Immunschwäche AIDS, Alzheimer-Demenz, Parkinson), und solche, die mit einer verminderten Apoptoserate assoziiert sind, sogenannte hypoapoptotische Krankheiten (Carson and Ribeiro 1993; Thompson 1995; Hetts 1998). Zu den bekanntesten hypoapoptotischen Erkrankungen zählen, neben Autoimmunerkrankungen, maligne Erkrankungen, die durch ein entartetes, malignes Zellwachstum aufgrund einer Störung der Zellzyklusregulation und der Apoptose hervorgerufen werden. In diesem Zusammenhang konnte mittlerweile für die Entstehung bestimmter Tumore eine veränderte mRNA-Expression bestimmter Apoptose-regulierender Gene identifiziert werden.

In diesem Kontext wird leicht vergessen, dass Apoptose ein ganz wesentlicher Regulator für die Entwicklung und Lebensfähigkeit vielzelliger Organismen wie beispielsweise des menschlichen Organismus ist. Somit weist Apoptose neben dem pathophysiologischen Charakter auch einen nicht zu unterschätzenden physiologischen Charakter auf. Physiologische Apoptose ist ein unentbehrlicher Prozess für die gesunde Organbildung während der Embryogenese und, im adulten Organismus, ein unverzichtbarer Regulator für den Erhalt der Gewebshomöostase sowie für die Zellmauserung von Geweben mit hohem Zellumsatz (Thompson 1995). Neben dem Erhalt der gesunden Funktion des Organismus dient Apoptose auch dem essentiellen Schutz vor potentiell schädlichen oder entarteten Zellen. So sind besonders hochentwickelte, vielzellige Organismen darauf angewiesen, überzählige oder gefährliche Zellen auf eine für den restlichen Organismus unschädliche Weise eliminieren zu können. Schätzungen zufolge hätte ein Mensch im Alter von 80 Jahren zwei Tonnen Knochenmark und Lymphknoten sowie einen 16 km langen Darm, wenn für die Zellteilungen nicht durch eine natürliche Absterberate der Zellen kompensiert würden (Melino 2001).

Auch myokardiale Apoptose kann einen physiologischen und einen pathologischen Charakter aufweisen. Während der Organogenese des Herzens ist Apoptose für die Ausbildung beispielsweise der Herzkammern und Herzklappen, aber auch des Sinus- und AV-Knotens und der His-Bündel essentiell. Zusätzlich werden Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten besonders im rechten Ventrikel eliminiert (James 1994; Kajstura, Mansukhani et al. 1995). Im Verlauf des Alterns sind apoptotische Prozesse für den

natürlichen Zelltod adulter Herzmuskelzellen verantwortlich (Kajstura, Cheng et al. 1996). So enthält das Altersherz deutlich weniger Kardiomyozyten als ein gesundes adultes Herz. Die genauen Ursachen, die diesem altersbedingten Zellverlust zugrunde liegen, sind noch nicht geklärt. Diskutiert wird eine natürliche, altersbedingte Zunahme an oxidativem Stress, eine verminderte Funktion der Mitochondrien (verminderte ATP-Synthese) und das veränderte Expressionsmuster Apoptose-assoziiierter Proteine.

Für die humane Herzinsuffizienz wurden mehrfach erhöhte Apoptoseraten (Narula, Haider et al. 1996; Olivetti, Abbi et al. 1997; Di Napoli, Taccardi et al. 2003; Takemura and Fujiwara 2004) und eine verstärkte Aktivierung der Caspase-3 (Narula, Pandey et al. 1999; Abbate, Bussani et al. 2002; Baldi, Abbate et al. 2002), einem Apoptose-Marker, beschrieben. Gerade die scheinbar sehr geringen Apoptoseraten im kranken Herzmuskel sind von entscheidender Relevanz wenn man berücksichtigt, dass so nahezu täglich die entsprechenden Herzmuskellen irreversibel zugrunde gehen. Umso weniger darf die biologische Bedeutung dieses Phänomens unterschätzt werden. Bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz ist eine bis zu 100fach erhöhte Apoptoserate gegenüber der basalen Apoptoserate im gesunden Herz dokumentiert. Apoptose wird demnach als ein zentraler Faktor für die Induktion von reversem Remodeling und die Entstehung einer Herzinsuffizienz angesehen (Saraste, Pulkki et al. 1999; van Empel and De Windt 2004; von Harsdorf 2004). Für die humane Herzinsuffizienz konnte eine deutliche Korrelation zwischen dem Ausmaß an Apoptose und dem Schweregrad einer Herzinsuffizienz aufgezeigt werden, weshalb Apoptose auch als prognostischer Marker an Bedeutung gewinnt (Saraste, Pulkki et al. 1999; Metzger, Higuchi et al. 2002; Zorc, Vraspir-Porenta et al. 2003; Garg, Narula et al. 2005). Auch in verschiedensten Tiermodellen konnte eine deutliche Korrelation zwischen einer erhöhten Kardiomyozytenapoptose und der Entstehung einer Herzinsuffizienz nachgewiesen werden (Gottlieb, Burleson et al. 1994; Sharov, Sabbah et al. 1996; Li, Nijhawan et al. 1997; Condorelli, Morisco et al. 1999). Analog wurde demonstriert, dass eine Inhibition der Apoptose eine Abmilderung des kardialen Phänotyps bei Herzinsuffizienz induziert. Im Rattenmodell einer Sepsis-induzierten Herzinsuffizienz konnte eine gesteigerte Apoptose und eine Depression der Herzfunktion durch eine Caspase-Inhibition mit dem Breitspektrum-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk, jedoch nicht mit einem Caspase-1 Inhibitor reduziert werden (Fauvel, Marchetti et al. 2001; Neviere, Fauvel et al. 2001). In einer weiteren Studie konnte diese protektive Wirkung einer Caspase-Inhibition mit zVAD-fmk in einem Ischämie/Reperfusion-induziertem Herzinsuffizienzmodell bestätigt werden (Yaoita, Ogawa et al. 1998; Hayakawa, Takemura et al. 2003). Der selbe Effekt konnte ebenfalls nach Ischämie/Reperfusion in Schweinen (Yarbrough, Mukherjee et al. 2003) und in einem Myokardinfarkt-induzierten Herzinsuffizienz-Modell in Ratten demonstriert

werden (Chandrashekar, Sen et al. 2004). In der von Wencker et al. durchgeführten Studie eines induzierbaren murinen Apoptose-Modells konnte schließlich erstmalig auch die Effizienz einer Apoptose-Inhibition in einem nicht-ischämischen Herzinsuffizienzmodell demonstriert werden (Wencker, Chandra et al. 2003).

Der Breitspektrum-Caspase-Inhibitor IDN-1965 (IDUN Pharmaceuticals) wird bereits für einige Indikationen (chronische Hepatitis B und C, Lebertransplantation) in klinischen Studien eingesetzt (Natori, Selzner et al. 1999; Fischer and Schulze-Osthoff 2005) (IDUN Pharmaceuticals: www.idun.com). IDN-1965 befindet sich in der präklinischen Phase zur Anwendung als Therapeutikum bei kardiovaskulärer Erkrankungen, seine Struktur ist bisher nicht bekannt gegeben worden (Leung-Toung, Li et al. 2002). IDN-1965 ist ein irreversibler, potenter Inhibitor der apikalen Caspasen Caspase-8 und -9, aber auch der Effektorcaspasen Caspase-3 und -6. Mit einer Plasma-Halbwertszeit von 40 Minuten und einer schlechten oralen Bioverfügbarkeit weist er jedoch ein ungünstiges pharmakologisches Profil auf. Erstmals beschrieben wurde IDN-1965 in Untersuchungen *ex vivo* zur Inhibition apoptotischer Prozesse durch Ischämie/Reperfusion während Lebertransplantationen. Eine Reduktion der Caspase-3-Aktivierung als auch der Apoptoserate wurden beschrieben. In einer 2003 erschienen Studie wurde der Effekt einer chronischen Applikation des Breitspektrum-Caspase-Inhibitors IDN-1965 im murinen Herzinsuffizienzmodell der Peripartum-Kardiomyopathie in $G\alpha_q$ -transgenen Mäusen untersucht (Hayakawa, Chandra et al. 2003; Webster and Bishopric 2003). Durch die chronische Applikation von IDN-1965 mittels osmotischer Minipumpen konnte die Apoptoseeraterate um 90% und die Sterblichkeit um sogar 30% reduziert werden.

Wie bereits mit dem peptidischen Breitspektrum-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk beschrieben, bestätigt diese Studie mit dem peptidomimetischen Breitspektrum-Caspase-Inhibitor IDN-1965 das Potential einer Caspase-Inhibition als Therapiestrategie bei Herzinsuffizienz. Entscheidend für die therapeutische Verwendbarkeit einer Apoptose-Inhibition in der Klinik wird neben einer genauen Analyse von Langzeit-Nebeneffekten, die Optimierung pharmakologischer kinetischer Parameter sein (Nicholson 2000).

Eine globale Inhibition der Apoptose geht aufgrund der prinzipiellen Notwendigkeit apoptotischer Prozesse mit einem sehr hohen Potential an unerwünschten Nebeneffekten einher. Gerade dieser Aspekt der physiologischen Apoptose ist als Gefahrenpotential für eine Apoptose-Inhibition als Therapiestrategie nicht zu unterschätzen. Beispielsweise ist bekannt, dass bestimmte Formen der Krebstherapie, also eine Induktion von apoptotischen Prozessen aufgrund mangelnder Gewebeselektivität kardiotoxische Nebenwirkungen aufzeigen (Perik, de Vries et al.

2005). Somit stellt die Gewährleistung der Gewebespezifität eine zentrale Herausforderung auf dem Weg zur Etablierung einer therapeutischen Apoptoseinhibition dar. Ferner werden die Optimierung der Dargreichungsform, die Dosierung und besonders die Bestimmung der optimalen zeitlichen Parameter für die Umsetzung einer Apoptoseinhibition als therapeutische Strategie von besonderer Relevanz sein.

Ferner bedarf die Verwendung antiapoptotischer Therapien eines guten Patienten-Monitorings, besonders der Kontrolle des apoptotischen Effektes durch nicht-invasive, hochsensitive Methoden (Faddeel and Orrenius 2005; van Empel, Bertrand et al. 2005). Erste Beschreibungen kommen aus dem Bereich der Imaging Technologie, beispielsweise mit Fluoreszenz-markiertem oder Radio-markiertem AnnexinV, einem Marker von apoptotischem Zelltod (Hofstra, Liem et al. 2000; Dumont, Reutelingsperger et al. 2001), durch Magnetresonanz-Messungen (Zhao, Beauregard et al. 2001), aber auch durch Messen der Serumspiegel von Cytochrom c (Barczyk, Kreuter et al. 2005).

Während bei nekrotischem Zelltod mit der Schädigung der Zellmembran der sogenannte „point of no return“ erreicht ist, kann in die apoptotische Signalkaskade bis zur Aktivierung der Effektorcaspasen auf vielfältige Art eingegriffen, und die Auslösung des apoptotischen Zelltodes verhindert werden. Es wird vermutet, dass das Vorhandensein von Kardiomyozyten mit apoptotischer Schädigung besonders kontraktile Proteine jedoch ohne vollzogene apoptotische Elimination wesentlich zur Einschränkung der kardialen Funktion bei Herzinsuffizienz beitragen kann (Narula, Arbustini et al. 2001; Tilly and Kolesnick 2003). Für eine Inhibition der Apoptose zu therapeutischen Zwecken sollte neben einer Inhibition der, den Mitochondrien nachgeschalteten Caspasen besonders auch der Schutz der Mitochondrien berücksichtigt werden. Eine Kardioprotektion durch Schutz der Mitochondrienintegrität wird in der Literatur mehrfach beschrieben (Gottlieb 2003; Weiss, Korge et al. 2003). Durch eine reine Caspasen-Inhibition kann man zwar das Einleiten der Endphase der Apoptose verhindern, dennoch bleibt eine weitere Schädigung der Mitochondrien hierdurch nicht aus, da die Caspase-Kaskade den Mitochondrien nachgeschaltet ist. Es wurde gezeigt, dass es während Apoptose zu einer Caspase-abhängigen Degradation von Bestandteilen der Atmungskette kommt (Ricci, Munoz-Pinedo et al. 2004). Eine Schädigung der Mitochondrien wirkt sich nicht nur negativ auf den Energiehaushalt der Zelle aus, sondern trägt auch zum Voranschreiten weiterer Schädigungsprozesse in der Zelle und schließlich auch im Herzmuskel bei. Daher gewinnt neben der Inhibition der Apoptoseinduktion zusehends der Schutz der Mitochondrien als entscheidender Faktor für den Erhalt der Kardiomyozytenfunktion an Bedeutung. Sollte sich also herausstellen, dass Caspase-1 bei der Aktivierung des intrinsischen Signalweges den Mitochondrien vorgeschaltet ist (beispielsweise über eine Caspase-1-abhängige Spaltung von Bid),

könnte dieser Aspekt bezüglich einer Inhibition der Apoptose besonders interessant sein.

Zur Inhibition kardialer Apoptose bietet die apoptotische Signaltransduktion weitere vielversprechende Therapieansätze für eine Inhibition von apoptotischem Zelltod im Myokard. So stellt der endogen im Herz exprimierte Apoptose-Regulator ARC ein in diesem Zusammenhang interessantes Zielgen dar. Erste präklinische Studien von ARC in Herzinsuffizienzmodellen zeigen eindeutig kardioprotektive Effekt. Durch einen viralen Gentransfer von ARC konnte die Ausbildung einer Herzinsuffizienz nach Ischämie unterdrückt werden (Gustafsson, Sayen et al. 2002; Chatterjee, Bish et al. 2003; Gustafsson, Tsai et al. 2004). Auch für das antiapoptotische Bcl-2 konnte mittels viralem Gentransfer in einem Tiermodell eine signifikante kardioprotektive Wirkung demonstriert werden (Chatterjee, Stewart et al. 2002). Neben diesen Regulatoren der apoptotischen Signaltransduktion sind weitere, Signalweg-unabhängige Substanzen für eine potente Inhibition der Apoptose beschrieben. Die Aurintricarboxylsäure (ATA) ist ein Endonukleasen-Inhibitor und somit ein potenter Inhibitor des apoptotischen Zelltodes (Andrew, Hay et al. 1999; Beery, Haimsohn et al. 2001). Zusätzlich wurde für ATA neben einer Reduktion der Caspase-3-Aktivität und einer Verminderung propoapoptischer Proteine eine Verbesserung der Herzfunktion beschrieben (Zhao, Morris et al. 2003). Doch auch für diese Caspasen-unabhängigen, vielversprechenden Therapieansätze bedarf es weiterer Untersuchungen bezüglich der genauen zugrunde liegenden Signalwege und der Bestimmung zahlreicher pharmakologischer kinetischer Parameter bevor sie in die klinische Phase übergehen können.

Neben der Inhibition der Kardiomyozytenapoptose als Therapiestrategie ist die Aktivierung der kardialen, endogenen Regenerationskapazität ein eleganter Ansatz zur Prävention und Therapie der Herzmuskelschwäche. Prinzipiell sind adulte Herzmuskelzellen noch zur mitotischen Zellteilung in der Lage, da es sich jedoch bei adultem Myokardgewebe um sogenanntes Ruhegewebe handelt, ist das kardiale Regenerationspotential durch Angiogenese sehr limitiert (von Harsdorf 2004). Dennoch steht die Reinduktion der Zellteilung adulter Kardiomyozyten als ein interessanter Therapieansatz für Herzinsuffizienz im Fokus der gegenwärtigen Forschung (Field 2004). Ferner werden unter anderem die Möglichkeiten der kardialen Stammzelltherapie und der Transplantation künstlichen Gewebes als mögliche Therapiestrategien intensiv untersucht (von Harsdorf, Poole-Wilson et al. 2004). Zusammenfassend kann man sagen, dass diese Therapieansätze allesamt vielversprechend sind, obgleich die klinische Anwendbarkeit dieser Strategien noch weit entfernt ist.

III Kardiale Caspase-1 als ein neues therapeutisches Target?

1 Möglichkeiten einer Caspase-1 Inhibition

1.1 Endogene Caspase-1 Inhibitoren

Neben synthetisch generierten Caspase-1 Inhibitoren sind in der Literatur endogene Caspase-1 Inhibitoren beschrieben. CrmA gehört zur Familie der Serpine (serin proteinase inhibitor) und stammt von einem Kuhpockenvirus ab (Rodriguez, Span et al. 2003). Dieser fördert die virale Infektion, indem es der Wirts-Immunantwort durch Abschwächung der inflammatorischen Immunantwort und durch Apoptosehemmung entgegenwirkt. Neben Caspase-1 wird durch CrmA auch Caspase-2, -3, -8 und -10 inaktiviert. Das Säugetieranalog von CrmA ist der Proteinase-Inhibitor 9 (PI9), ein Inhibitor der Caspase-1 (Annand, Dahlen et al. 1999; Young, Sukhova et al. 2000). Caspase-1 ist jedoch nicht die einzige Caspase, die durch PI9 inhibiert wird. Neben der beschriebenen Inhibition der Caspase-1, -4 und -8 ist denkbar, dass eine Vielzahl an Caspasen durch PI9 inhibiert wird. Als Wirkmechanismus ist beschrieben, dass PI9 die Prozessierung der Caspasen inhibiert, indem es wahlweise die Proformen oder deren Intermediate durch Komplexierung bindet und somit deren Prozessierung inhibiert. In Gewebeschnitten von atherosklerotischen Gefäßen konnte eine deutlich verminderte Expression von PI9 mit einer entsprechend erhöhten Expression der Caspase-1 und IL-1 β korreliert werden. Man könnte sich demnach vorstellen, dass die verstärkte Aktivität der Caspase-1 bei Herzinsuffizienz durch eine verminderte Expression von PI9 bei Herzmuskelschwäche zustande kommen könnte.

1.2 Synthetische Caspase-1 Inhibitoren

1.2.1 Peptidische Caspase-1 Inhibitoren

Caspasen sind Cysteinproteasen und können als solche durch eine chemische Reaktion der Thiolgruppe im aktiven Zentrum modifiziert und somit inhibiert werden. Wie bereits erwähnt ist das gruppenspezifische Merkmal der Caspasen die spezifische Spaltung von Peptiden mit einem C-terminalen Aspartat an Position P1 durch Amidhydrolyse.

Die Struktur der peptidischen Inhibitoren der Caspase-1 basiert auf der Tatsache, dass Caspase-1 spezifisch Peptide nach YVHD-Sequenzen, wie sie beispielsweise bei pro-IL-1 β zu finden sind (Tyr-Val-His-Asp116-Ala117; P4-P3-P2-P1*P1') schneidet (Howard, Kostura et al. 1991). Die Aminosäure in Position P2 ist weitgehend austauschbar, sie trägt kaum zur Enzym-Substratbindung bei. Die Substitution an P2 von His nach Ala, wie sie in den Peptidinhibitoren vorliegt, erhöht jedoch die

Substratspezifität, Caspase-1 Inhibitoren weisen daher die Sequenz YVAD auf. Die Position P4 ist entscheidend für die jeweilige Substratspezifität (Earnshaw, Martins et al. 1999). Die Caspasen lassen sich aufgrund dieser Präferenz für Position P4 in ihrem Substrat unterscheiden: Gruppe I (Caspase-1, -4,-5) bevorzugt einen aromatischen Rest, Gruppe II (Caspase-3,-6,-7) bevorzugt Aspartat an P4, Gruppe III (Caspase-8) bevorzugt aliphatische Reste an P4 (Annand, Dahlen et al. 1999). Den entscheidenden Einfluss der Position P4 für die relative Caspasen-Selektivität zeigt sich bei dem Breitspektrum-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk. Im Unterschied zu der Peptidsequenz der Caspase-1 Inhibitoren wurde lediglich die vierte Aminosäure (P4) in der Peptidkette durch den N-terminalen Benzyloxycarbonylrest (z) ersetzt. Durch diese Modifikation kann der Breitspektrum-Caspase-Inhibitor zVAD-FMK unspezifisch an die aktiven Zentren aller bisher bekannten Caspasen binden. Neben der Peptid-Sequenz YVAD ist die WEHD-Sequenz mehrfach in der Literatur als noch bessere Peptid-Erkennungssequenz für Caspase-1 beschrieben (Rano, Timkey et al. 1997). Da WEDH auch für die der Caspase-1 am nächsten verwandten Caspasen-4 und -5 die bevorzugte Substrat-Peptidsequenz darstellt (Chang and Yang 2000), und somit nicht für Caspase-1 spezifisch ist, werden WEHD-basierte Peptidinhibitoren kaum verwendet. Man unterscheidet irreversible und reversible Caspase-1 Inhibitoren, beiden Mechanismen unterliegt ein nukleophiler Angriff durch das Cys285 im aktiven Zentrum der Caspase-1 (Livingston 1997). Die Substratbindungsstelle für die Caspase-1 weist eine Erkennungsseite und eine Reaktionsseite auf. Während die Erkennungsseite des Substrats zur nötigen räumlichen Anlagerung der Caspase-1 durch Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäuren in P1 und P3 dient, kommt es an der Reaktionsseite durch das Cysteine285 im aktiven Zentrum der Caspase-1 zur hydrolytischen Amidspaltung (Verseifung) des Aspartats im Sinne einer SN₂-Reaktion (Garcia-Calvo, Peterson et al. 1998; Wagner and Laufer 2006). Unter physiologischen Bedingungen liegt die Thiolgruppe als Thiolat vor und weist als solche eine sehr hohe Nucleophilie auf. Im aktiven Zentrum der Caspase-1 liegt das, in der kleinen Untereinheit p10 lokalisierte Histidin (His237) in unmittelbarer räumlicher Nähe zu dem Cystein (Cys285) der p20 Untereinheit, wodurch die Nucleophilie des Cystein 285 erhöht wird (Chang and Yang 2000).

Irreversible Caspase-1 Inhibitoren gehen durch Alkylierung der Thiolgruppe im aktiven Zentrum (Cys285) der Caspase-1 eine kovalente Bindung ein und müssen daher eine Abgangsgruppe aufweisen. Am häufigsten werden Halomethylketone verwendet (fmk= Fluoromethylketon, cmk= Chlormethylketon), aber auch Diazomethylketone und Acyloxymethylketone werden eingesetzt. Aus der Nomenklatur der Caspase-Inhibitoren lässt sich deren Struktur ableiten: Der Caspase-1 Inhibitor Ac-YVAD-cmk ist ein Acetyl-

Tyrosin-Valin-Alanin-Aspartat-Chlormethylketon. Reversible Caspase-1 Inhibitoren sind Peptidaldehyde (YVAD-H), sie weisen daher keine Abgangsgruppe auf und können nicht kovalent an das aktive Zentrum der Caspase-1 binden.

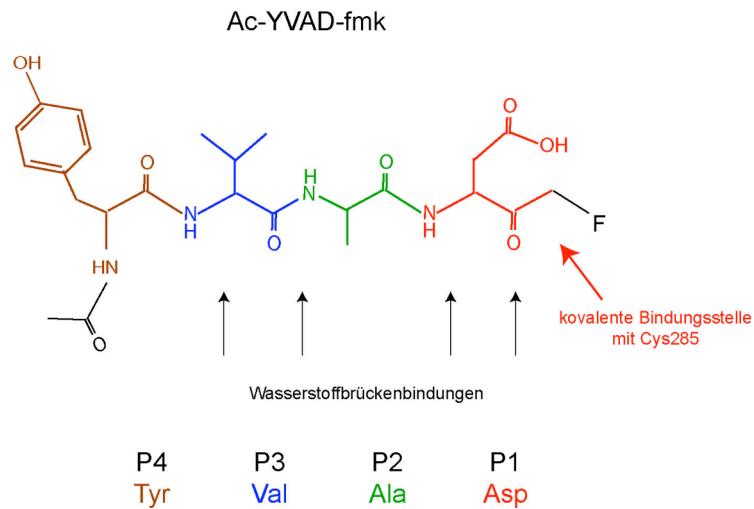


Abbildung 41: Der peptidische Caspase-1 Inhibitor Ac-YVAD-fmk.

Der größte Nachteil dieser Peptidinhibitoren ist, dass sie aufgrund des nicht selektiven Wirkmechanismus unspezifische Bindungen eingehen. Sie sind durch ihre Reaktivität gegenüber Thiolgruppen in Cysteinproteasen und Hydroxygruppen in Serinproteasen toxisch und daher als *in vivo*-Therapeutika ungeeignet. Durch ihre ungenügende Substrat-Spezifität sind die Caspase-1 Inhibitoren trotz ihrer hohen Bindungsaffinität als selektive Inhibitoren nicht ideal.

Für die peptidischen Caspase-1 Inhibitoren wurde *in vitro* mehrfach eine Inhibition der IL-1 β Generierung demonstriert (Thornberry, Bull et al. 1992; Molineaux, Casano et al. 1993; Fletcher, Agarwal et al. 1995; Miller, Krasney et al. 1995). Es gibt nur wenige Studien mit diesen Inhibitoren *in vivo*. Es wurde gezeigt, dass eine LPS-induzierte IL-1 β -Produktion durch Injektion peptidischer Caspase-1 Inhibitoren unterdrückt werden kann (Estrov, Black et al. 1995). In einem Mausmodell chronischer Arthritis können die mit IL-1 β assoziierten Symptome durch Inhibition der Caspase-1 mit einem zVAD-Alkoxymethylketons verbessert werden (Ku, Faust et al. 1996). In einer Studie mit einem Rattenmodell für akute Lungenschädigung während schwerer, akuter Pankreatitis konnte durch Injektion eines Caspase-1 Inhibitors (Ac-YVAD-Alkoxymethylketons) die Produktion an IL-1 β und IL-18 reduziert werden (Zhang, Zhu et al. 2007).

In Einklang mit den hier vorgestellten Daten gibt es in der Literatur in den letzten Jahren Hinweise für eine Verbesserung eines kardialen Herzinsuffizienz-Phänotyps durch eine Caspase-1 Inhibition mit peptidischen Inhibitoren (siehe unten). Dennoch ist die

Studienlage nicht eindeutig. Eine Caspase-1 Inhibition scheint die Herzfunktion und Apoptoserate in Schädigungsmodellen zu verbessern, bei der Interpretation der Daten muss jedoch die mangelnde Selektivität dieser peptidischen Inhibitoren für Caspase-1 berücksichtigt werden. In einer Studie zur Untersuchung der Effizienz einer Caspase-Inhibition bezüglich einer Verbesserung der Herzfunktion und Abnahme der Apoptoserate nach Injektion von LPS, zeigte eine Caspase-1 Inhibition (Ac-YVAD-fmk) keine verbessernde Wirkung (Fauvel, Marchetti et al. 2001). In einem Hypercholesterin-induzierten Ischämie/Reperfusion-Modell in Ratten bewirkte jedoch derselbe Inhibitor eine signifikante Abnahme der Apoptoserate (Wang, Chen et al. 2003). In einem Ischämie/Reperfusion-Modell in Ratten konnte durch eine Caspase-1 Inhibition (YVAD-cho) eine deutlich reduzierte Apoptoserate gemessen werden, ein Einfluß auf die Infarktgröße war nicht detektierbar (Okamura, Miura et al. 2000). In einer weiteren Studie eines Ischämie/Reperfusion-Modells in Ratten wurde durch den Caspase-1 Inhibitor Ac-YVAD-cmk sowohl die Apoptose als auch die Infarktgröße reduziert (Holly, Drincic et al. 1999). In einem *ex vivo* Ischämie/Reperfusion-Modell konnte die Inhibition der Caspase-1 (AC-YVAD-fmk) eine Verminderung der Apoptose und eine Verbesserung der Herzfunktionen bewirkt werden (Kovacs, Bak et al. 2001).

Abschließend bleibt festzuhalten, dass peptidische Caspase-Inhibitoren neben der mangelnden Selektivität und schlechten Membrangängigkeit grundlegende pharmakologische Nachteile aufweisen, die ihre Anwendbarkeit als klinische Therapeutika einschränken. Peptid-Inhibitoren sind oral nur sehr gering bioverfügbar, was ihren Einsatz als Dauermedikation aufgrund schlechter Patientencompliance in Frage stellt. Ferner sind sie metabolisch instabil (werden schnell durch Proteasen durch Amidhydrolyse gespalten), weisen eine kurze Plasma-Halbwertszeit auf und werden schnell vom Organismus eliminiert (Leung-Toung, Li et al. 2002).

1.2.2 Peptidomimetische Caspase-1 Inhibitoren

Aufgrund dieses mangelhaften pharmakologischen Profils ist man bemüht, neue Caspase-Inhibitoren mit einem reduzierten Peptid-Charakter zu entwickeln. Ausgehend von den rein peptidischen Inhibitoren wurden die nötigen Peptid-ähnlichen Strukturen, speziell Position P1 (kovalente Bindung zu Cystein) und die Positionen P1, 2 und 3 (Wasserstoffbrückenbindungen zur räumlichen Anlagerung) in Heterocyclen bzw. aneinandergelagerte Ringsysteme eingebettet. Diese neue Generation an polyaromatischen Heterozyklen verbindet somit die hohe Bindungsaffinität der Peptidinhibitoren mit den pharmakologischen Vorteilen nicht-peptidischer Substanzen weshalb man solche Inhibitoren als peptidomimetische Inhibitoren bezeichnet.

Der von Sanofi-Aventis und Vertex generierte Wirkstoff Pranalcasan (HMR 3480, VX-740) ist der erste, nicht-peptidische für Caspase-1 spezifische Inhibitor (Rudolphi, Gerwin et al. 2003). Die Struktur des aktiven Metaboliten wurde durch Strukturanalysen bisheriger Peptidinhibitoren mit Caspase-1 entworfen.

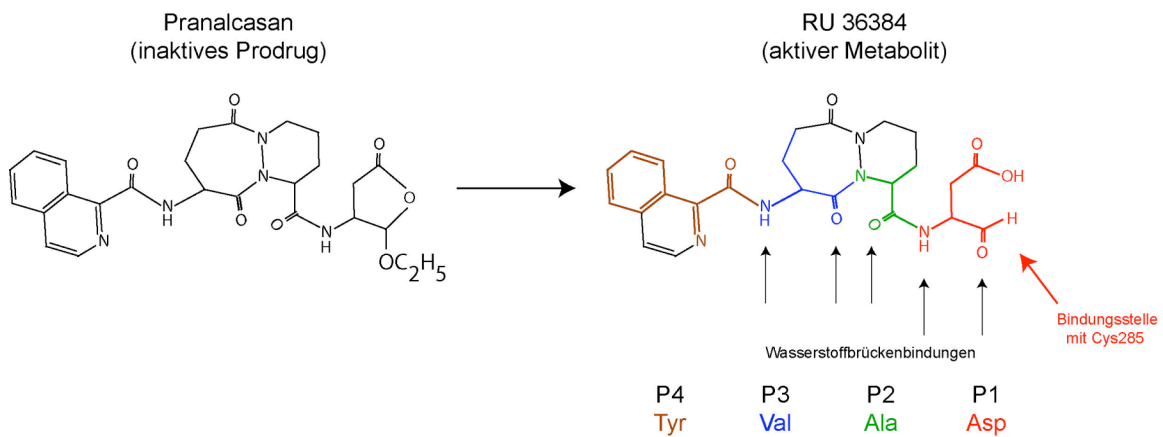


Abbildung 42: Pranalcasan, ein peptidomimetischer Caspase-1 Inhibitor.

Pranalcasan ist ein Pro-Pharmakon mit einer oralen Bioverfügbarkeit von 40-60%, die orale Bioverfügbarkeit des aktiven Metaboliten liegt bei nur 4%. Im Blut wird Pranalcasan nach Absorption aus dem Darm schnell von Plasmaesterasen durch Hydrolyse des cyclischen Acetals in seinen potenten, aktiven Metaboliten (RU36384, $K_i=1,4\text{nM}$) überführt. Durch Pranalcasan kann eine Reduktion der Serumspiegel an IL-1 β nach Stimulation mit LPS *in vitro* (HUVEC-Zellen) und *in vivo* (80%ige Reduktion, 25-100mg/kg Maus, p.o.) erzielt werden. *In vivo* wurde Pranalcasan bisher in Mausmodellen entzündlicher Erkrankungen, wie beispielsweise Osteoarthritis und Kolitis untersucht (Rudolphi, Gerwin et al. 2003; Loher, Bauer et al. 2004). In beiden Untersuchungen war die mit Pranalcasan behandelte Versuchsgruppe bezüglich einer Verbesserung krankheitsspezifischer Symptome der Kontrollgruppe deutlich überlegen. Diese Ergebnisse stehen somit mit denen von Untersuchungen an Caspase-1-defizienten Mäusen in denselben Krankheitsmodellen in Einklang. In diesen präklinischen Studien zeigte die orale Applikation von Pranalcasan keinerlei Hinweise auf eine erhöhte Toxizität und wurde gut toleriert. Pranalcasan befand sich in Phase IIb einer klinischen Studie gegen rheumatoide Arthritis. Auch in dieser Studie mit 285 Patienten mit rheumatoider Arthritis/Osteoarthritis und freiwilligen gesunden Probanden zeigte sich eine gute Verträglichkeit von oral verabreichtem Pranalcasan. Dennoch wurde die Phase IIb-Studie von Sanofi-Aventis laut Firmenhomepage „due to various reasons“ im März 2005 gestoppt (http://en.sanofi-aventis.com/press/ppc_2620.asp).

1.2.3 Nicht-peptidische Caspase-1 Inhibitoren

Ein weder peptidischer noch peptidomimetischer, in der Literatur beschriebener Caspase-1 Inhibitor, NCX 4016, ist ein Nitrosoderivat von Aspirin (Leung-Toung, Li et al. 2002). Nach Aufnahme wird NCX 4016 durch Esterasen in Aspirin und NO gespalten werden und verbindet somit die Wirkungen von Aspirin und NO. NCX 4016 weist eine bessere antiinflammatorische Wirksamkeit als Aspirin mit einem geringen Nebenwirkungsspektrum insbesondere der gastrointestinalen Toxizität auf. Die klassischen Wirkungen von NO, wie die Vasodilatation, sind cGMP vermittelt, jedoch sind für NO auch weitere cGMP-unabhängige sowohl protektive als auch schädigende Wirkungen beschrieben (Napoli and Ignarro 2003; Gresele and Momi 2006).

Durch S-Nitrosylierung des Cysteins im aktiven Zentrum der Caspasen können NO-NSAID als Caspasen-Inhibitoren agieren. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass NCX 4016 ein potenter, jedoch aufgrund des zugrunde liegenden Mechanismus nicht sehr selektiver Caspase-1 Inhibitor ist. Eine Inkubation von Monozyten mit NCX 4016 kann eine LPS-induzierte IL-1 β und IL-18 Generierung durch Inhibition der Caspase-1 unterdrücken (Fiorucci, Santucci et al. 2000). Die in der Literatur beschriebene Inhibition der Caspase-1 könnte nicht nur die verbesserte antiinflammatorische Aktivität und den gastroprotektiven Effekt von NCX 4016 erklären (Fiorucci, Antonelli et al. 1999), sondern auch zu dem beschriebenen antiapoptotischen Effekt von NCX 4016 bei Herzinsuffizienz-Studien in Tieren beitragen. Es ist beschrieben, dass die orale Applikation von NCX 4016 zu einem Anfluten von NO unter anderem im Herzgewebe führt, nach einer i.p. Applikation kann NCX 4016 selbst im Herzgewebe nachgewiesen werden (Carini, Aldini et al. 2004). NCX 4016 führt im Vergleich zu Aspirin zu einer reduzierten Infarktgröße nach Ischämie/Reperfusion in Ratten (Rossoni, Manfredi et al. 2001) und in Schweinen (Wainwright, Miller et al. 2002). In einem Herzinsuffizienzmodell (MI) in Kaninchen konnte durch Gabe von NCX 4016 im Vergleich zu Aspirin sowohl die Mortalität reduziert, als auch eine Verschlechterung der Herzfunktion vermindert werden (Rossoni, Berti et al. 2000). In einer *in vitro*-Studie wurde in HUVEC-Zellen mittels Staurosporin Apoptose durch Schädigung der Mitochondrien (intrinsischer Signalweges) induziert. NCX 4016 inhibiert die Freisetzung von Cytochromc aus den Mitochondrien und greift somit in die Aktivierung des intrinsischen Signalweges ein (Fiorucci, Mencarelli et al. 2002).

Bezüglich potentieller kanzerogener Nebenwirkungen antiapoptotischer Substanzen zeigt NCX 4016 auch hier ein sehr günstiges Profil, es ist bereits mehrfach eine krebsinhibierende Wirkung von NCX 4016 beschrieben. Untersuchungen *in vitro* zeigten im Gegensatz zu Aspirin durch NCX 4016 eine 6000-fach potentere krebsinhibierende

Wirkung für das Voranschreiten von Kolon-, Pankreas-, Prostata-, Lungen-, Haut-, Leukämie- und Brustkrebs (Rigas, Kalofonos et al. 2003). Zusammenfassend weist NCX 4016 im Vergleich zu Aspirin ein deutlich verbessertes antiinflammatorisches und kardioprotektives Wirkspektrum bei guter krebsinhibierender und gastroprotektiver Wirkung auf. NCX 4016 ist damit trotz seiner mangelnden Substratselektivität für Caspase-1 ein interessanter therapeutischer Wirkstoff.

2 Ausblick

Peptid-Aptamere stellen eine neue Klasse von potentiell therapeutisch einsetzbaren Biomolekülen dar. Das Wort Aptamer leitet sich aus den griechischen Wörtern apt = passen und meros = Teilchen ab. (Hoppe-Seyler, Crnkovic-Mertens et al. 2004; Baines and Colas 2006). Peptid-Aptamere sind kurze Oligopeptide, die von einem gut löslichen, verträglichen und möglichst inerten Gerüstprotein präsentiert werden. Das Peptidfragment wird durch das Gerüstprotein in eine solche räumliche Anordnung gebracht, dass die entstehende 3D-Peptid-Struktur möglichst komplementär der des aktiven Zentrums des Zielproteins angepasst ist. Die Stärke der Protein-Protein-Interaktionen ist somit durch die Passgenauigkeit der Interaktionsfläche zwischen dem Aptamer und dem Substrat bestimmt. Neben der räumlichen Passgenauigkeit sind elektrostatische Wechselwirkungen für die Bindungsaffinität entscheidend. Ähnlich wie Antikörper sind Aptamere in der Lage mit dem jeweiligen Bindungspartner zu interagieren und haben durch diese Bindung das Potential, dessen Funktion zu beeinflussen. Aptamere sind somit künstlich hergestellte Bindungspartner, die die günstigen Eigenschaften von Antikörpern und kleinen Molekülen verbinden (Crawford, Woodman et al. 2003). Sie weisen neben einer hohen chemischen Stabilität und einer geringen Immunogenizität eine hohe Spezifität und Bindungsaffinität auf, und sind damit für die gezielte Beeinflussung von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* prinzipiell geeignet. Durch Modifikationen kann die kurze Halbwertszeit von Minuten auf Tage bis Wochen erhöht werden. Neben der Maskierung des aktiven Zentrums des Zielproteins können durch Aptamere beliebige funktionelle Proteindomänen durch Bindung spezifisch inhibiert werden. Es können Translokationsdomänen maskiert werden, um so aktivierte Proteine von ihrem Wirkort fernzuhalten, oder Transkriptionsfaktoren können in ihrer Bindung an DNA gehindert werden.

Die besondere Herausforderung für die therapeutische Anwendbarkeit besteht in der Form der Applikation, bzw. der gewebespezifischen Applikation. Ein spezielles Problem der Anwendbarkeit von Protein-basierten Inhibitoren ist, dass sie, aufgrund ihrer Größe unzureichend die Zellmembran passieren können und somit lediglich extrazellulär wirksam sind. Eine mögliche Strategie zur Einbringung der Aptamerkonstrukte in die

Zielzellen ist die lentivirale Transduktion. Jedoch ist die Anwendbarkeit einer lentiviralen Transduktion für die klinische Anwendung beim Menschen sehr limitiert. Die Verwendung von Viren als therapeutisches Vehikel birgt generelle Risiken, die im Rahmen der Gentherapie vielfach diskutiert werden. Durch die Insertion viraler DNA in das humane Genom kann es beispielsweise zu einer Veränderung der Zellen kommen. Sollte es jedoch in Zukunft gelingen, eine sichere, gewebsspezifische Applikation zu gewährleisten, stellt die Aptamer-Technologie ein für die Entwicklung neuer Therapiestrategien interessantes Werkzeug dar.

Da die apoptotischen Signaltransduktionswege nur wenige der klassischen Zielstrukturen wie Enzyme oder Rezeptoren aufweisen sollten besonders die Strategien der Gentherapie oder der Antisense-Therapie (siRNA-Technologie, small interfering RNA) für eine umfassende Apoptose-Inhibition in Betracht gezogen werden (van Empel, Bertrand et al. 2005). Wie erwähnt, wird der virale Gentransfer für den Apoptose-Inhibitor ARC und die Antisense-Strategie für das antiapoptotische Bcl-2 in präklinischen Studien bereits eingesetzt. Durch die siRNA-Technologie (21-28 Nucleotide lange RNA-Fragmente) kann spezifisch in die Expression des Zielgens inhibierend eingegriffen werden (Nicholson 2000). Damit bietet sie im Gegensatz zu dem Peptidaptameren eine selektive, auf dem Expressionsstufe eingreifende Strategie. siRNAs werden in der Zelle in den Proteinkomplex RISC (RNA-induced silencing complex) eingebaut, der dann komplementär an die entsprechende Ziel-mRNA bindet. Nach dem Entwinden wird die Ziel-mRNA gespalten und anschließend durch intrazelluläre Nucleasen abgebaut. Bis synthetisch hergestellte siRNA als klinische Therapeutika eingesetzt werden können, müssen noch einige Aspekte mittels weiterer Forschung adressiert werden. Ein Nachteil dieser Methodik ist, dass die Expression des Ziels nur deutlich verringert, aber nicht komplett ausgeschaltet werden kann. Die Optimierung der Effizienz und der Stabilität, aber auch die Minimierung unspezifischer Nebenwirkungen, beispielsweise durch chemische Modifikationen, stehen im Fokus der gegenwärtigen Forschung. Wie schon für die Peptid-Aptamere, stellt sich hier ebenfalls das Problem der gewebsspezifischen Applizierbarkeit. Durch die Fusion der siRNAs mit niedriger molekularen Vehikeln, die selektiv von nur einem Zelltyp aufgenommen werden, könnte eine gewebe selektive Applikation möglich werden (He and Sontheimer 2004; Ketting and Plasterk 2004). Lediglich im Bereich der Krebsforschung befindet sich die Antisense-Technologie für das antiapoptotische Bcl-2 bereits in Phase II der klinischen Erprobung (Genasense, Genta).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten demonstrieren, dass kardiale Caspase-1 durch Induktion von Kardiomyozytenapoptose signifikant an der Entwicklung einer Herzmuskelschwäche beteiligt ist. Um Caspase-1 als mögliches Zielprotein für eine

Herzinsuffizienz-Therapie zu etablieren, bedarf es umfassender weiterführender Untersuchungen. Es muss der, der Caspase-1 zugrunde liegende proapoptotische Mechanismus der Caspase-1 detailliert verstanden werden und seine Interaktionspartner und Substrate müssen identifiziert werden. Da die Caspase-1 sowohl in apoptotische Prozesse als auch in die Immunantwort involviert ist, bedarf es einer gewebsspezifischen Inhibition. Nur so kann das Nebenwirkungspotential, besonders das Risiko der Tumorentwicklung und eine Beeinträchtigung der Immunantwort minimiert werden. Da Caspasen in zahlreichen Organen exprimiert werden, könnte eine Gewebsspezifität über die Interaktion zu einem herzspezifischen Interaktionspartner erzielt werden. Alternativ müsste eine herzspezifische Applikation mit Hilfe der Arzneimitteltechnologie angestrebt werden. Um die Effizienz der Apoptose-Inhibition zu maximieren, wäre es ferner sinnvoll, auf mehreren Ebenen der Caspase-Kaskade spezifisch einzugreifen. Das mögliche Nebenwirkungspotential solcher Inhibitoren-Cocktails muss hierfür durch Maximierung der Substratspezifität und Gewebeselektivität minimiert werden. Schließlich sollte nicht nur die Inhibition der apoptotischen Elimination von Kardiomyozyten gewährleistet sein. Da Kardiomyozyten die kontraktilen Einheiten des Herzmuskelgewebes sind, muss ebenso die Funktion der durch Apoptoseinhibition erhaltenen Kardiomyozyten gewährleistet sein. Dazu sollte die Prävention der Kardiomyozytenapoptose durch Caspase-Inhibition beispielsweise durch einen gezielten Schutz der Mitochondrien (durch Inhibition proapoptotischer Gene wie Bad oder durch mPTP-Inhibitoren) komplettiert werden (Webster and Bishopric 2003).

LITERATURVERZEICHNIS

- Abbate, A., R. Bussani, et al. (2002). "Persistent infarct-related artery occlusion is associated with an increased myocardial apoptosis at postmortem examination in humans late after an acute myocardial infarction." Circulation **106**(9): 1051-4.
- Abraham, W. T. (2000). "Beta-blockers: the new standard of therapy for mild heart failure." Arch Intern Med **160**(9): 1237-47.
- Adams, J. M. and S. Cory (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." Science **281**(5381): 1322-6.
- AHA (2005). "American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics - 2005 Update."
- Akita, K., T. Ohtsuki, et al. (1997). "Involvement of caspase-1 and caspase-3 in the production and processing of mature human interleukin 18 in monocytic THP.1 cells." J Biol Chem **272**(42): 26595-603.
- Alnemri, E. S. (1997). "Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases." J Cell Biochem **64**(1): 33-42.
- Alnemri, E. S., D. J. Livingston, et al. (1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature." Cell **87**(2): 171.
- Andrew, D. J., A. W. Hay, et al. (1999). "Aurintricarboxylic acid inhibits apoptosis and supports proliferation in a haemopoietic growth-factor dependent myeloid cell line." Immunopharmacology **41**(1): 1-10.
- Annand, R. R., J. R. Dahlen, et al. (1999). "Caspase-1 (interleukin-1beta-converting enzyme) is inhibited by the human serpin analogue proteinase inhibitor 9." Biochem J **342 Pt 3**: 655-65.
- Anversa, P., J. Kajstura, et al. (1996). "Myocyte death in heart failure." Curr Opin Cardiol **11**(3): 245-51.
- Aoki, H., S. Izumo, et al. (1998). "Angiotensin II activates RhoA in cardiac myocytes: a critical role of RhoA in angiotensin II-induced premyofibril formation." Circ Res **82**(6): 666-76.
- Arai, M., N. R. Alpert, et al. (1993). "Alterations in sarcoplasmic reticulum gene expression in human heart failure. A possible mechanism for alterations in systolic and diastolic properties of the failing myocardium." Circ Res **72**(2): 463-9.
- Aronow, B. J., T. Toyokawa, et al. (2001). "Divergent transcriptional responses to independent genetic causes of cardiac hypertrophy." Physiol Genomics **6**(1): 19-28.
- Asahi, K., H. Mizutani, et al. (1999). "Intradermal transfer of caspase-1 (CASP1) DNA into mouse dissects: role of CASP1 in interleukin-1beta associated skin inflammation and apoptotic cell death." J Dermatol Sci **21**(1): 49-58.
- Baines, I. C. and P. Colas (2006). "Peptide aptamers as guides for small-molecule drug discovery." Drug Discov Today **11**(7-8): 334-41.
- Baldi, A., A. Abbate, et al. (2002). "Apoptosis and post-infarction left ventricular remodeling." J Mol Cell Cardiol **34**(2): 165-74.
- Barczyk, K., M. Kreuter, et al. (2005). "Serum cytochrome c indicates in vivo apoptosis and can serve as a prognostic marker during cancer therapy." Int J Cancer **116**(2): 167-73.
- Barton, P. J., E. J. Birks, et al. (2003). "Increased expression of extracellular matrix regulators TIMP1 and MMP1 in deteriorating heart failure." J Heart Lung Transplant **22**(7): 738-44.
- Beery, R., M. Haimsohn, et al. (2001). "Activation of the insulin-like growth factor 1 signaling pathway by the antiapoptotic agents aurintricarboxylic acid and evans blue." Endocrinology **142**(7): 3098-107.

- Bers, D. M. and S. Despa (2006). "Cardiac myocytes Ca²⁺ and Na⁺ regulation in normal and failing hearts." *J Pharmacol Sci* **100**(5): 315-22.
- Best, P. J., D. Hasdai, et al. (1999). "Apoptosis. Basic concepts and implications in coronary artery disease." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(1): 14-22.
- Bialik, S., D. L. Geenen, et al. (1997). "Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53." *J Clin Invest* **100**(6): 1363-72.
- Boatright, K. M., M. Renatus, et al. (2003). "A unified model for apical caspase activation." *Mol Cell* **11**(2): 529-41.
- Boatright, K. M. and G. S. Salvesen (2003). "Mechanisms of caspase activation." *Curr Opin Cell Biol* **15**(6): 725-31.
- Bristow, M. R. (1984). "The adrenergic nervous system in heart failure." *N Engl J Med* **311**(13): 850-1.
- Brodde, O. E., M. C. Michel, et al. (1995). "Signal transduction mechanisms controlling cardiac contractility and their alterations in chronic heart failure." *Cardiovasc Res* **30**(4): 570-84.
- Brough, D. and N. J. Rothwell (2007). "Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death." *J Cell Sci* **120**(Pt 5): 772-81.
- Bruey, J. M., N. Bruey-Sedano, et al. (2007). "Bcl-2 and Bcl-X(L) Regulate Proinflammatory Caspase-1 Activation by Interaction with NALP1." *Cell* **129**(1): 45-56.
- Budihardjo, I., H. Oliver, et al. (1999). "Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis." *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 269-90.
- Buitrago, M., K. Lorenz, et al. (2005). "The transcriptional repressor Nab1 is a specific regulator of pathological cardiac hypertrophy." *Nat Med* **11**(8): 837-44.
- Cain, B. S., D. R. Meldrum, et al. (1999). "Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta synergistically depress human myocardial function." *Crit Care Med* **27**(7): 1309-18.
- Carini, M., G. Aldini, et al. (2004). "Nitric oxide release and distribution following oral and intraperitoneal administration of nitroaspirin (NCX 4016) in the rat." *Life Sci* **74**(26): 3291-305.
- Carson, D. A. and J. M. Ribeiro (1993). "Apoptosis and disease." *Lancet* **341**(8855): 1251-4.
- Cerretti, D. P., L. T. Hollingsworth, et al. (1994). "Molecular characterization of the gene for human interleukin-1 beta converting enzyme (IL1BC)." *Genomics* **20**(3): 468-73.
- Chandrasekar, B., S. Mummidi, et al. (2005). "Interleukin-18 is a pro-hypertrophic cytokine that acts through a phosphatidylinositol 3-kinase-phosphoinositide-dependent kinase-1-Akt-GATA4 signaling pathway in cardiomyocytes." *J Biol Chem* **280**(6): 4553-67.
- Chandrasekar, B., K. Vemula, et al. (2004). "Activation of intrinsic and extrinsic proapoptotic signaling pathways in interleukin-18-mediated human cardiac endothelial cell death." *J Biol Chem* **279**(19): 20221-33.
- Chandrashekar, Y., S. Sen, et al. (2004). "Long-term caspase inhibition ameliorates apoptosis, reduces myocardial troponin-I cleavage, protects left ventricular function, and attenuates remodeling in rats with myocardial infarction." *J Am Coll Cardiol* **43**(2): 295-301.
- Chang, D. W., Z. Xing, et al. (2003). "Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation." *Embo J* **22**(16): 4132-42.
- Chang, H. Y. and X. Yang (2000). "Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases." *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(4): 821-46.
- Chatterjee, S., L. T. Bish, et al. (2003). "Blocking the development of postischemic cardiomyopathy with viral gene transfer of the apoptosis repressor with caspase recruitment domain." *J Thorac Cardiovasc Surg* **125**(6): 1461-9.

- Chatterjee, S., A. S. Stewart, et al. (2002). "Viral gene transfer of the antiapoptotic factor Bcl-2 protects against chronic postischemic heart failure." *Circulation* **106**(12 Suppl 1): I212-7.
- Cheng, E. H., M. C. Wei, et al. (2001). "BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis." *Mol Cell* **8**(3): 705-11.
- Cheng, W., B. Li, et al. (1995). "Stretch-induced programmed myocyte cell death." *J Clin Invest* **96**(5): 2247-59.
- Chien, K. R., H. Zhu, et al. (1993). "Transcriptional regulation during cardiac growth and development." *Annu Rev Physiol* **55**: 77-95.
- Chinnaiyan, A. M. and V. M. Dixit (1996). "The cell-death machine." *Curr Biol* **6**(5): 555-62.
- Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, et al. (1995). "FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis." *Cell* **81**(4): 505-12.
- Chow, S. C., E. A. Slee, et al. (1999). "Caspase-1 is not involved in CD95/Fas-induced apoptosis in Jurkat T cells." *Exp Cell Res* **246**(2): 491-500.
- CIBIS-II (1999). "The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial." *Lancet* **353**(9146): 9-13.
- Cigola, E., J. Kajstura, et al. (1997). "Angiotensin II activates programmed myocyte cell death in vitro." *Exp Cell Res* **231**(2): 363-71.
- Cikala, M., B. Wilm, et al. (1999). "Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra." *Curr Biol* **9**(17): 959-62.
- Clarke, P. G. and S. Clarke (1996). "Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena." *Anat Embryol (Berl)* **193**(2): 81-99.
- Cohen, G. M. (1997). "Caspases: the executioners of apoptosis." *Biochem J* **326** (Pt 1): 1-16.
- Cohn, J. N. (1990). "Abnormalities of peripheral sympathetic nervous system control in congestive heart failure." *Circulation* **82**(2 Suppl): I59-67.
- Cohn, J. N., R. Ferrari, et al. (2000). "Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling." *J Am Coll Cardiol* **35**(3): 569-82.
- Colston, J. T., W. H. Boylston, et al. (2007). "Interleukin-18 knockout mice display maladaptive cardiac hypertrophy in response to pressure overload." *Biochem Biophys Res Commun* **354**(2): 552-8.
- Communal, C., K. Singh, et al. (1998). "Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway." *Circulation* **98**(13): 1329-34.
- Communal, C., M. Sumandea, et al. (2002). "Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(9): 6252-6.
- Condorelli, G., C. Morisco, et al. (1999). "Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax and bcl-2 during left ventricular adaptations to chronic pressure overload in the rat." *Circulation* **99**(23): 3071-8.
- CONSENSUS (1987). "Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). The CONSENSUS Trial Study Group." *N Engl J Med* **316**(23): 1429-35.
- Cowie, M. R., A. Mosterd, et al. (1997). "The epidemiology of heart failure." *Eur Heart J* **18**(2): 208-25.
- Crawford, M., R. Woodman, et al. (2003). "Peptide aptamers: tools for biology and drug discovery." *Brief Funct Genomic Proteomic* **2**(1): 72-9.
- Crow, M. T., K. Mani, et al. (2004). "The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis." *Circ Res* **95**(10): 957-70.

- Dai, R. P., S. T. Dheen, et al. (2004). "Differential expression of cytokines in the rat heart in response to sustained volume overload." *Eur J Heart Fail* **6**(6): 693-703.
- Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer (2004). "Cell death: critical control points." *Cell* **116**(2): 205-19.
- Denault, J. B. and G. S. Salvesen (2002). "Caspases: keys in the ignition of cell death." *Chem Rev* **102**(12): 4489-500.
- Denolin, H., H. Kuhn, et al. (1983). "The definition of heart failure." *Eur Heart J* **4**(7): 445-8.
- Deswal, A., N. J. Petersen, et al. (2001). "Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST)." *Circulation* **103**(16): 2055-9.
- Deveraux, Q. L. and J. C. Reed (1999). "IAP family proteins--suppressors of apoptosis." *Genes Dev* **13**(3): 239-52.
- Di Iorio, A., L. Ferrucci, et al. (2003). "Serum IL-1beta levels in health and disease: a population-based study. 'The InCHIANTI study'." *Cytokine* **22**(6): 198-205.
- Di Napoli, P., A. A. Taccardi, et al. (2003). "Left ventricular wall stress as a direct correlate of cardiomyocyte apoptosis in patients with severe dilated cardiomyopathy." *Am Heart J* **146**(6): 1105-11.
- Dinarello, C. A. (1996). "Biologic basis for interleukin-1 in disease." *Blood* **87**(6): 2095-147.
- Dinarello, C. A. (1997). "Interleukin-1." *Cytokine Growth Factor Rev* **8**(4): 253-65.
- Dinarello, C. A. (1998). "Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme." *Ann N Y Acad Sci* **856**: 1-11.
- Dinarello, C. A. (1999). "Interleukin-18." *Methods* **19**(1): 121-32.
- Dinarello, C. A. (2001). "Novel targets for interleukin 18 binding protein." *Ann Rheum Dis* **60 Suppl 3**: iii18-24.
- Donath, S., P. Li, et al. (2006). "Apoptosis repressor with caspase recruitment domain is required for cardioprotection in response to biomechanical and ischemic stress." *Circulation* **113**(9): 1203-12.
- Dragovich, T., C. M. Rudin, et al. (1998). "Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death." *Oncogene* **17**(25): 3207-13.
- Du, C., M. Fang, et al. (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." *Cell* **102**(1): 33-42.
- Dumont, E. A., C. P. Reutelingsperger, et al. (2001). "Real-time imaging of apoptotic cell-membrane changes at the single-cell level in the beating murine heart." *Nat Med* **7**(12): 1352-5.
- Dzau, V. J., W. S. Colucci, et al. (1981). "Relation of the renin-angiotensin-aldosterone system to clinical state in congestive heart failure." *Circulation* **63**(3): 645-51.
- Earnshaw, W. C., L. M. Martins, et al. (1999). "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis." *Annu Rev Biochem* **68**: 383-424.
- Edinger, A. L. and C. B. Thompson (2004). "Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy." *Curr Opin Cell Biol* **16**(6): 663-9.
- Eguchi, Y., S. Shimizu, et al. (1997). "Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis." *Cancer Res* **57**(10): 1835-40.
- Eisenhofer, G., P. Friberg, et al. (1996). "Cardiac sympathetic nerve function in congestive heart failure." *Circulation* **93**(9): 1667-76.
- Ekhterae, D., Z. Lin, et al. (1999). "ARC inhibits cytochrome c release from mitochondria and protects against hypoxia-induced apoptosis in heart-derived H9c2 cells." *Circ Res* **85**(12): e70-7.
- Elahi, M., S. Asopa, et al. (2007). "NO-cGMP and TNF-alpha counter regulatory system in blood: understanding the mechanisms leading to myocardial dysfunction and failure." *Biochim Biophys Acta* **1772**(1): 5-14.
- Ellis, R. E., J. Y. Yuan, et al. (1991). "Mechanisms and functions of cell death." *Annu Rev Cell Biol* **7**: 663-98.

- Enari, M., H. Sakahira, et al. (1998). "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." *Nature* **391**(6662): 43-50.
- Enari, M., R. V. Talanian, et al. (1996). "Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis." *Nature* **380**(6576): 723-6.
- Engelhardt, S., L. Hein, et al. (1999). "Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 7059-64.
- Esposti, M. D. (2002). "The roles of Bid." *Apoptosis* **7**(5): 433-40.
- Estrov, Z., R. A. Black, et al. (1995). "Effect of interleukin-1 beta converting enzyme inhibitor on acute myelogenous leukemia progenitor proliferation." *Blood* **86**(12): 4594-602.
- Fadeel, B. and S. Orrenius (2005). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease." *J Intern Med* **258**(6): 479-517.
- Fadok, V. A., D. R. Voelker, et al. (1992). "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages." *J Immunol* **148**(7): 2207-16.
- Fantuzzi, G., A. J. Puren, et al. (1998). "Interleukin-18 regulation of interferon gamma production and cell proliferation as shown in interleukin-1beta-converting enzyme (caspase-1)-deficient mice." *Blood* **91**(6): 2118-25.
- Fantuzzi, G., D. A. Reed, et al. (1999). "IL-12-induced IFN-gamma is dependent on caspase-1 processing of the IL-18 precursor." *J Clin Invest* **104**(6): 761-7.
- Fauvel, H., P. Marchetti, et al. (2001). "Differential effects of caspase inhibitors on endotoxin-induced myocardial dysfunction and heart apoptosis." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**(4): H1608-14.
- Feng, Q., P. Li, et al. (2004). "Caspase-1zeta, a new splice variant of the caspase-1 gene." *Genomics* **84**(3): 587-91.
- Fernandes-Alnemri, T., R. C. Armstrong, et al. (1996). "In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(15): 7464-9.
- Field, L. J. (2004). "Modulation of the cardiomyocyte cell cycle in genetically altered animals." *Ann N Y Acad Sci* **1015**: 160-70.
- Fiers, W., R. Beyaert, et al. (1999). "More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage." *Oncogene* **18**(54): 7719-30.
- Fiorucci, S., E. Antonelli, et al. (1999). "Gastrointestinal safety of nitric oxide-derived aspirin is related to inhibition of ICE-like cysteine proteases in rats." *Gastroenterology* **116**(5): 1089-106.
- Fiorucci, S., A. Mencarelli, et al. (2002). "NCX-4016, a nitric oxide-releasing aspirin, protects endothelial cells against apoptosis by modulating mitochondrial function." *Faseb J* **16**(12): 1645-7.
- Fiorucci, S., L. Santucci, et al. (2000). "IL-1 beta converting enzyme is a target for nitric oxide-releasing aspirin: new insights in the antiinflammatory mechanism of nitric oxide-releasing nonsteroidal antiinflammatory drugs." *J Immunol* **165**(9): 5245-54.
- Fischer, U., R. U. Janicke, et al. (2003). "Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates." *Cell Death Differ* **10**(1): 76-100.
- Fischer, U. and K. Schulze-Osthoff (2005). "Apoptosis-based therapies and drug targets." *Cell Death Differ* **12 Suppl 1**: 942-61.
- Fletcher, D. S., L. Agarwal, et al. (1995). "A synthetic inhibitor of interleukin-1 beta converting enzyme prevents endotoxin-induced interleukin-1 beta production in vitro and in vivo." *J Interferon Cytokine Res* **15**(3): 243-8.
- Francis, G. S. (2001). "Pathophysiology of chronic heart failure." *Am J Med* **110 Suppl 7A**: 37S-46S.
- Francis, S. E., H. Holden, et al. (1998). "Interleukin-1 in myocardium and coronary arteries of patients with dilated cardiomyopathy." *J Mol Cell Cardiol* **30**(2): 215-23.

- Frantz, S., A. Ducharme, et al. (2003). "Targeted deletion of caspase-1 reduces early mortality and left ventricular dilatation following myocardial infarction." J Mol Cell Cardiol **35**(6): 685-94.
- Frey, N. and E. N. Olson (2003). "Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly." Annu Rev Physiol **65**: 45-79.
- Friedlander, R. M., V. Gagliardini, et al. (1997). "Expression of a dominant negative mutant of interleukin-1 beta converting enzyme in transgenic mice prevents neuronal cell death induced by trophic factor withdrawal and ischemic brain injury." J Exp Med **185**(5): 933-40.
- Friedlander, R. M., V. Gagliardini, et al. (1996). "Functional role of interleukin 1 beta (IL-1 beta) in IL-1 beta-converting enzyme-mediated apoptosis." J Exp Med **184**(2): 717-24.
- Gaballa, M. A. and S. Goldman (2002). "Ventricular remodeling in heart failure." J Card Fail **8**(6 Suppl): S476-85.
- Garcia-Calvo, M., E. P. Peterson, et al. (1998). "Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors." J Biol Chem **273**(49): 32608-13.
- Garg, S., J. Narula, et al. (2005). "Apoptosis and heart failure: clinical relevance and therapeutic target." J Mol Cell Cardiol **38**(1): 73-9.
- Gavrieli, Y., Y. Sherman, et al. (1992). "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation." J Cell Biol **119**(3): 493-501.
- Gerschenson, L. E. and R. J. Rotello (1992). "Apoptosis: a different type of cell death." Faseb J **6**(7): 2450-5.
- Gottlieb, R. A. (2003). "Mitochondrial signaling in apoptosis: mitochondrial daggers to the breaking heart." Basic Res Cardiol **98**(4): 242-9.
- Gottlieb, R. A., K. O. Bureson, et al. (1994). "Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes." J Clin Invest **94**(4): 1621-8.
- Gracie, J. A., S. E. Robertson, et al. (2003). "Interleukin-18." J Leukoc Biol **73**(2): 213-24.
- Gresele, P. and S. Momi (2006). "Pharmacologic profile and therapeutic potential of NCX 4016, a nitric oxide-releasing aspirin, for cardiovascular disorders." Cardiovasc Drug Rev **24**(2): 148-68.
- Grutter, M. G. (2000). "Caspases: key players in programmed cell death." Curr Opin Struct Biol **10**(6): 649-55.
- Gu, Y., K. Kuida, et al. (1997). "Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme." Science **275**(5297): 206-9.
- Gu, Y., J. Wu, et al. (1995). "Interleukin-1 beta converting enzyme requires oligomerization for activity of processed forms in vivo." Embo J **14**(9): 1923-31.
- Guerra, S., A. Leri, et al. (1999). "Myocyte death in the failing human heart is gender dependent." Circ Res **85**(9): 856-66.
- Gustafsson, A. B. and R. A. Gottlieb (2003). "Mechanisms of apoptosis in the heart." J Clin Immunol **23**(6): 447-59.
- Gustafsson, A. B., M. R. Sayen, et al. (2002). "TAT protein transduction into isolated perfused hearts: TAT-apoptosis repressor with caspase recruitment domain is cardioprotective." Circulation **106**(6): 735-9.
- Gustafsson, A. B., J. G. Tsai, et al. (2004). "Apoptosis repressor with caspase recruitment domain protects against cell death by interfering with Bax activation." J Biol Chem **279**(20): 21233-8.
- Hall, S. A., C. G. Cigarroa, et al. (1995). "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**(5): 1154-61.
- Hara, H., R. M. Friedlander, et al. (1997). "Inhibition of interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 2007-12.

- Hayakawa, K., G. Takemura, et al. (2003). "Inhibition of granulation tissue cell apoptosis during the subacute stage of myocardial infarction improves cardiac remodeling and dysfunction at the chronic stage." *Circulation* **108**(1): 104-9.
- Hayakawa, Y., M. Chandra, et al. (2003). "Inhibition of cardiac myocyte apoptosis improves cardiac function and abolishes mortality in the peripartum cardiomyopathy of Galpha(q) transgenic mice." *Circulation* **108**(24): 3036-41.
- He, Z. and E. J. Sontheimer (2004). ""siRNAs and miRNAs": a meeting report on RNA silencing." *Rna* **10**(8): 1165-73.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." *Nature* **407**(6805): 770-6.
- Hetts, S. W. (1998). "To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease." *Jama* **279**(4): 300-7.
- Hiroe, M., Y. Hirata, et al. (1991). "Plasma endothelin-1 levels in idiopathic dilated cardiomyopathy." *Am J Cardiol* **68**(10): 1114-5.
- Ho, K., J. Pinsky, et al. (1993). "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.
- Hofstra, L., I. H. Liem, et al. (2000). "Visualisation of cell death in vivo in patients with acute myocardial infarction." *Lancet* **356**(9225): 209-12.
- Holly, T. A., A. Drincic, et al. (1999). "Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo." *J Mol Cell Cardiol* **31**(9): 1709-15.
- Hoppe, U. C., M. Bohm, et al. (2005). "[Guidelines for therapy of chronic heart failure]." *Z Kardiol* **94**(8): 488-509.
- Hoppe, U. C. and E. Erdmann (2001). "[Guidelines for the treatment of chronic heart failure. Issued by the Executive Committee of the German Society of Cardiology-Heart and Circulation Research, compiled on behalf of the Commission of Clinical Cardiology in cooperation with Pharmaceutic Commission of the German Physicians' Association]." *Z Kardiol* **90**(3): 218-37.
- Hoppe-Seyler, F., I. Crnkovic-Mertens, et al. (2004). "Peptide aptamers: specific inhibitors of protein function." *Curr Mol Med* **4**(5): 529-38.
- Hotchkiss, R. S. and D. W. Nicholson (2006). "Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis." *Nat Rev Immunol* **6**(11): 813-22.
- Howard, A. D., M. J. Kostura, et al. (1991). "IL-1-converting enzyme requires aspartic acid residues for processing of the IL-1 beta precursor at two distinct sites and does not cleave 31-kDa IL-1 alpha." *J Immunol* **147**(9): 2964-9.
- Hunter, J. J. and K. R. Chien (1999). "Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure." *N Engl J Med* **341**(17): 1276-83.
- Huot, J., F. Houle, et al. (1997). "Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells." *Circ Res* **80**(3): 383-92.
- Ing, D. J., J. Zang, et al. (1999). "Modulation of cytokine-induced cardiac myocyte apoptosis by nitric oxide, Bcl-x, and Bcl-2." *Circ Res* **84**(1): 21-33.
- Irmler, M., M. Thome, et al. (1997). "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP." *Nature* **388**(6638): 190-5.
- Izumo, S., A. M. Lompre, et al. (1987). "Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals." *J Clin Invest* **79**(3): 970-7.
- Izumo, S., B. Nadal-Ginard, et al. (1988). "Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(2): 339-43.
- Jackson, G., C. R. Gibbs, et al. (2000). "ABC of heart failure. Pathophysiology." *Bmj* **320**(7228): 167-70.
- Jacotot, E., P. Costantini, et al. (1999). "Mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process." *Ann N Y Acad Sci* **887**: 18-30.

- James, T. N. (1994). "Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. From postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias." Circulation **90**(1): 556-73.
- Jiang, X. and X. Wang (2000). "Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1." J Biol Chem **275**(40): 31199-203.
- Jiang, X. and X. Wang (2004). "Cytochrome C-mediated apoptosis." Annu Rev Biochem **73**: 87-106.
- Kajstura, J., W. Cheng, et al. (1996). "Necrotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of Fischer 344 rats." Am J Physiol **271**(3 Pt 2): H1215-28.
- Kajstura, J., M. Mansukhani, et al. (1995). "Programmed cell death and expression of the protooncogene bcl-2 in myocytes during postnatal maturation of the heart." Exp Cell Res **219**(1): 110-21.
- Kamens, J., M. Paskind, et al. (1995). "Identification and characterization of ICH-2, a novel member of the interleukin-1 beta-converting enzyme family of cysteine proteases." J Biol Chem **270**(25): 15250-6.
- Kannel, W. B. and M. Larson (1993). "Long-term epidemiologic prediction of coronary disease. The Framingham experience." Cardiology **82**(2-3): 137-52.
- Katz, A. M. (1990). "Cardiomyopathy of overload. A major determinant of prognosis in congestive heart failure." N Engl J Med **322**(2): 100-10.
- Katz, A. M. (1994). "The cardiomyopathy of overload: an unnatural growth response in the hypertrophied heart." Ann Intern Med **121**(5): 363-71.
- Kayalar, C., T. Ord, et al. (1996). "Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(5): 2234-8.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-57.
- Ketting, R. F. and R. H. Plasterk (2004). "What's new about RNAi? Meeting on siRNAs and miRNAs." EMBO Rep **5**(8): 762-5.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, et al. (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." Embo J **14**(22): 5579-88.
- Koseki, T., N. Inohara, et al. (1998). "ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 5156-60.
- Kovacs, P., I. Bak, et al. (2001). "Non-specific caspase inhibition reduces infarct size and improves post-ischaemic recovery in isolated ischaemic/reperfused rat hearts." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **364**(6): 501-7.
- Kroemer, G. (1997). "The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis." Nat Med **3**(6): 614-20.
- Kroemer, G., B. Dallaporta, et al. (1998). "The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis." Annu Rev Physiol **60**: 619-42.
- Ku, G., T. Faust, et al. (1996). "Interleukin-1 beta converting enzyme inhibition blocks progression of type II collagen-induced arthritis in mice." Cytokine **8**(5): 377-86.
- Kubota, T., M. Miyagishima, et al. (2001). "Overexpression of tumor necrosis factor-alpha activates both anti- and pro-apoptotic pathways in the myocardium." J Mol Cell Cardiol **33**(7): 1331-44.
- Kuida, K., J. A. Lippke, et al. (1995). "Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme." Science **267**(5206): 2000-3.
- Kumar, A., V. Thota, et al. (1996). "Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum." J Exp Med **183**(3): 949-58.
- Kunapuli, S., S. Rosanio, et al. (2006). "How do cardiomyocytes die?" apoptosis and autophagic cell death in cardiac myocytes." J Card Fail **12**(5): 381-91.
- Lamkanfi, M., M. Kalai, et al. (2004). "Caspase-1 activates nuclear factor of the kappa-enhancer in B cells independently of its enzymatic activity." J Biol Chem **279**(23): 24785-93.

- Latif, N., M. A. Khan, et al. (2000). "Upregulation of the Bcl-2 family of proteins in end stage heart failure." J Am Coll Cardiol **35**(7): 1769-77.
- Lazebnik, Y. A., S. H. Kaufmann, et al. (1994). "Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE." Nature **371**(6495): 346-7.
- Lazebnik, Y. A., A. Takahashi, et al. (1995). "Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9042-6.
- Leist, M., B. Single, et al. (1997). "Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis." J Exp Med **185**(8): 1481-6.
- Leung-Toung, R., W. Li, et al. (2002). "Thiol-dependent enzymes and their inhibitors: a review." Curr Med Chem **9**(9): 979-1002.
- Li, H., H. Zhu, et al. (1998). "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." Cell **94**(4): 491-501.
- Li, P., H. Allen, et al. (1995). "Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock." Cell **80**(3): 401-11.
- Li, P., H. Allen, et al. (1997). "Characterization of mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme." J Cell Biochem **64**(1): 27-32.
- Li, P., D. Nijhawan, et al. (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." Cell **91**(4): 479-89.
- Li, P. F., J. Li, et al. (2002). "Phosphorylation by protein kinase CK2: a signaling switch for the caspase-inhibiting protein ARC." Mol Cell **10**(2): 247-58.
- Liston, P., W. G. Fong, et al. (2003). "The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2." Oncogene **22**(53): 8568-80.
- Liu, X., C. N. Kim, et al. (1996). "Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c." Cell **86**(1): 147-57.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-8.
- Livingston, D. J. (1997). "In vitro and in vivo studies of ICE inhibitors." J Cell Biochem **64**(1): 19-26.
- Loher, F., C. Bauer, et al. (2004). "The interleukin-1 beta-converting enzyme inhibitor pralnacasan reduces dextran sulfate sodium-induced murine colitis and T helper 1 T-cell activation." J Pharmacol Exp Ther **308**(2): 583-90.
- Lohse, M. J., S. Engelhardt, et al. (2003). "What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure?" Circ Res **93**(10): 896-906.
- Lopnow, H., K. Werdan, et al. (1998). "The interleukin-1 and interleukin-1 converting enzyme families in the cardiovascular system." Eur Cytokine Netw **9**(4): 675-80.
- Lou, H., I. Danelisen, et al. (2004). "Cytokines are not upregulated in adriamycin-induced cardiomyopathy and heart failure." J Mol Cell Cardiol **36**(5): 683-90.
- Malave, H. A., A. A. Taylor, et al. (2003). "Circulating levels of tumor necrosis factor correlate with indexes of depressed heart rate variability: a study in patients with mild-to-moderate heart failure." Chest **123**(3): 716-24.
- Mani, K. and R. N. Kitsis (2003). "Myocyte apoptosis: programming ventricular remodeling." J Am Coll Cardiol **41**(5): 761-4.
- Mann, D. L. (1999). "Mechanisms and models in heart failure: A combinatorial approach." Circulation **100**(9): 999-1008.
- Mann, D. L. and H. Taegtmeyer (2001). "Dynamic regulation of the extracellular matrix after mechanical unloading of the failing human heart: recovering the missing link in left ventricular remodeling." Circulation **104**(10): 1089-91.
- Mao, P. L., Y. Jiang, et al. (1998). "Activation of caspase-1 in the nucleus requires nuclear translocation of pro-caspase-1 mediated by its prodomain." J Biol Chem **273**(37): 23621-4.

- Martinon, F. and J. Tschopp (2004). "Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases." *Cell* **117**(5): 561-74.
- Martinon, F. and J. Tschopp (2007). "Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation." *Cell Death Differ* **14**(1): 10-22.
- Martinou, J. C. and D. R. Green (2001). "Breaking the mitochondrial barrier." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(1): 63-7.
- Mashima, T., M. Naito, et al. (1997). "Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis." *Oncogene* **14**(9): 1007-12.
- Melino, G. (2001). "The Sirens' song." *Nature* **412**(6842): 23.
- MERIT-HF (1999). "Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF)." *Lancet* **353**(9169): 2001-7.
- Metzger, M., M. L. Higuchi, et al. (2002). "Relevance of apoptosis and cell proliferation for survival of patients with dilated cardiomyopathy undergoing partial left ventriculectomy." *Eur J Clin Invest* **32**(6): 394-9.
- Meyer, M., W. Schillinger, et al. (1995). "Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy." *Circulation* **92**(4): 778-84.
- Miller, B. E., P. A. Krasney, et al. (1995). "Inhibition of mature IL-1 beta production in murine macrophages and a murine model of inflammation by WIN 67694, an inhibitor of IL-1 beta converting enzyme." *J Immunol* **154**(3): 1331-8.
- Miller, D. K., J. Myerson, et al. (1997). "The interleukin-1 beta converting enzyme family of cysteine proteases." *J Cell Biochem* **64**(1): 2-10.
- Mitchell, M. D., R. E. Laird, et al. (2007). "IL-1beta stimulates rat cardiac fibroblast migration via MAP kinase pathways." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**(2): H1139-47.
- Miura, M., H. Zhu, et al. (1993). "Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*." *Cell* **75**(4): 653-60.
- Molineaux, S. M., F. J. Casano, et al. (1993). "Interleukin 1 beta (IL-1 beta) processing in murine macrophages requires a structurally conserved homologue of human IL-1 beta converting enzyme." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(5): 1809-13.
- Mosley, B., D. L. Urdal, et al. (1987). "The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor." *J Biol Chem* **262**(7): 2941-4.
- Murray, D. R., S. D. Prabhu, et al. (2000). "Chronic beta-adrenergic stimulation induces myocardial proinflammatory cytokine expression." *Circulation* **101**(20): 2338-41.
- Murtuza, B., K. Suzuki, et al. (2004). "Transplantation of skeletal myoblasts secreting an IL-1 inhibitor modulates adverse remodeling in infarcted murine myocardium." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(12): 4216-21.
- Muzio, M., A. M. Chinnaiyan, et al. (1996). "FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex." *Cell* **85**(6): 817-27.
- Muzio, M., B. R. Stockwell, et al. (1998). "An induced proximity model for caspase-8 activation." *J Biol Chem* **273**(5): 2926-30.
- Naito, Y., T. Tsujino, et al. (2002). "Increased circulating interleukin-18 in patients with congestive heart failure." *Heart* **88**(3): 296-7.
- Nakagawa, T., H. Zhu, et al. (2000). "Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta." *Nature* **403**(6765): 98-103.
- Nam, Y. J., K. Mani, et al. (2004). "Inhibition of both the extrinsic and intrinsic death pathways through nonhomotypic death-fold interactions." *Mol Cell* **15**(6): 901-12.
- Napoli, C. and L. J. Ignarro (2003). "Nitric oxide-releasing drugs." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**: 97-123.
- Narula, J., E. Arbustini, et al. (2001). "Apoptosis and the systolic dysfunction in congestive heart failure. Story of apoptosis interruptus and zombie myocytes." *Cardiol Clin* **19**(1): 113-26.

- Narula, J., N. Haider, et al. (1996). "Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure." N Engl J Med **335**(16): 1182-9.
- Narula, J., P. Pandey, et al. (1999). "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**(14): 8144-9.
- Natori, S., M. Selzner, et al. (1999). "Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism." Transplantation **68**(1): 89-96.
- Nett, M. A., D. P. Cerretti, et al. (1992). "Molecular cloning of the murine IL-1 beta converting enzyme cDNA." J Immunol **149**(10): 3254-9.
- Neuss, M., R. Monticone, et al. (2001). "The apoptotic regulatory protein ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain) prevents oxidant stress-mediated cell death by preserving mitochondrial function." J Biol Chem **276**(36): 33915-22.
- Neviere, R., H. Fauvel, et al. (2001). "Caspase inhibition prevents cardiac dysfunction and heart apoptosis in a rat model of sepsis." Am J Respir Crit Care Med **163**(1): 218-25.
- Ng, W. A., I. L. Grupp, et al. (1991). "Cardiac myosin heavy chain mRNA expression and myocardial function in the mouse heart." Circ Res **68**(6): 1742-50.
- Nhan, T. Q., W. C. Liles, et al. (2006). "Physiological functions of caspases beyond cell death." Am J Pathol **169**(3): 729-37.
- Nian, M., P. Lee, et al. (2004). "Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling." Circ Res **94**(12): 1543-53.
- Nicholson, D. W. (1999). "Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death." Cell Death Differ **6**(11): 1028-42.
- Nicholson, D. W. (2000). "From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents." Nature **407**(6805): 810-6.
- Nicholson, D. W. and N. A. Thornberry (1997). "Caspases: killer proteases." Trends Biochem Sci **22**(8): 299-306.
- Nunez, G., M. A. Benedict, et al. (1998). "Caspases: the proteases of the apoptotic pathway." Oncogene **17**(25): 3237-45.
- Okamura, T., T. Miura, et al. (2000). "Effect of caspase inhibitors on myocardial infarct size and myocyte DNA fragmentation in the ischemia-reperfused rat heart." Cardiovasc Res **45**(3): 642-50.
- Olivetti, G., R. Abbi, et al. (1997). "Apoptosis in the failing human heart." N Engl J Med **336**(16): 1131-41.
- Oltvai, Z. N., C. L. Milliman, et al. (1993). "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death." Cell **74**(4): 609-19.
- Ott, M., J. D. Robertson, et al. (2002). "Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(3): 1259-63.
- Packer, M., M. R. Bristow, et al. (1996). "The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group." N Engl J Med **334**(21): 1349-55.
- Palermo, J., J. Gulick, et al. (1996). "Transgenic remodeling of the contractile apparatus in the mammalian heart." Circ Res **78**(3): 504-9.
- Palmer, J. N., W. E. Hartogensis, et al. (1995). "Interleukin-1 beta induces cardiac myocyte growth but inhibits cardiac fibroblast proliferation in culture." J Clin Invest **95**(6): 2555-64.
- Pasumarthi, K. B. and L. J. Field (2002). "Cardiomyocyte cell cycle regulation." Circ Res **90**(10): 1044-54.
- Patten, M., W. E. Hartogensis, et al. (1996). "Interleukin-1beta is a negative transcriptional regulator of alpha1-adrenergic induced gene expression in cultured cardiac myocytes." J Biol Chem **271**(35): 21134-41.

- Pelegri, P., E. Chaves-Pozo, et al. (2004). "Production and mechanism of secretion of interleukin-1beta from the marine fish gilthead seabream." Dev Comp Immunol **28**(3): 229-37.
- Perik, P. J., E. G. de Vries, et al. (2005). "The dilemma of the strive for apoptosis in oncology: mind the heart." Crit Rev Oncol Hematol **53**(2): 101-13.
- Pfeffer, M. A., E. Braunwald, et al. (1992). "Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators." N Engl J Med **327**(10): 669-77.
- Pichler, M. (1999). "Epidemiologie, Pathophysiologie und Klinik der Herzinsuffizienz." Österreichische Zeitschrift für Herz-Kreislaferkrankungen **6**(12): 604.
- Polyak, K., Y. Xia, et al. (1997). "A model for p53-induced apoptosis." Nature **389**(6648): 300-5.
- Poyet, J. L., S. M. Srinivasula, et al. (2001). "Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1." J Biol Chem **276**(30): 28309-13.
- Prabhu, S. D., B. Chandrasekar, et al. (2000). "beta-adrenergic blockade in developing heart failure: effects on myocardial inflammatory cytokines, nitric oxide, and remodeling." Circulation **101**(17): 2103-9.
- Rano, T. A., T. Timkey, et al. (1997). "A combinatorial approach for determining protease specificities: application to interleukin-1beta converting enzyme (ICE)." Chem Biol **4**(2): 149-55.
- Rao, R. V., E. Hermel, et al. (2001). "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation." J Biol Chem **276**(36): 33869-74.
- Regula, K. M. and L. A. Kirshenbaum (2005). "Apoptosis of ventricular myocytes: a means to an end." J Mol Cell Cardiol **38**(1): 3-13.
- Ricci, J. E., C. Munoz-Pinedo, et al. (2004). "Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain." Cell **117**(6): 773-86.
- Rigas, B., H. Kalofonos, et al. (2003). "NO-NSAIDs and cancer: promising novel agents." Dig Liver Dis **35 Suppl 2**: S27-34.
- Rodriguez, J. A., S. W. Span, et al. (2003). "Subcellular localization of CrmA: identification of a novel leucine-rich nuclear export signal conserved in anti-apoptotic serpins." Biochem J **373**(Pt 1): 251-9.
- Ross, J., Jr. (1983). "Mechanisms of cardiac contraction. What roles for preload, afterload and inotropic state in heart failure?" Eur Heart J **4 Suppl A**: 19-28.
- Rossoni, G., M. Berti, et al. (2000). "Myocardial protection by the nitroderivative of aspirin, NCX 4016: in vitro and in vivo experiments in the rabbit." Ital Heart J **1**(2): 146-55.
- Rossoni, G., B. Manfredi, et al. (2001). "The nitroderivative of aspirin, NCX 4016, reduces infarct size caused by myocardial ischemia-reperfusion in the anesthetized rat." J Pharmacol Exp Ther **297**(1): 380-7.
- Rudolphi, K., N. Gerwin, et al. (2003). "Pralnacasan, an inhibitor of interleukin-1beta converting enzyme, reduces joint damage in two murine models of osteoarthritis." Osteoarthritis Cartilage **11**(10): 738-46.
- Sadoshima, J., L. Jahn, et al. (1992). "Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy." J Biol Chem **267**(15): 10551-60.
- Sakahira, H., M. Enari, et al. (1998). "Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis." Nature **391**(6662): 96-9.
- Saleh, A., S. M. Srinivasula, et al. (1999). "Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation." J Biol Chem **274**(25): 17941-5.
- Salvesen, G. S. and V. M. Dixit (1999). "Caspase activation: the induced-proximity model." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 10964-7.

- Saraste, A., K. Pulkki, et al. (1999). "Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation." *Eur J Clin Invest* **29**(5): 380-6.
- Sarkar, A., M. Duncan, et al. (2006). "ASC directs NF-kappaB activation by regulating receptor interacting protein-2 (RIP2) caspase-1 interactions." *J Immunol* **176**(8): 4979-86.
- Schilders, G., R. Raijmakers, et al. (2007). "Caspase-mediated cleavage of the exosome subunit PM/Sci-75 during apoptosis." *Arthritis Res Ther* **9**(1): R12.
- Schmidt, U., R. J. Hajjar, et al. (1998). "Contribution of abnormal sarcoplasmic reticulum ATPase activity to systolic and diastolic dysfunction in human heart failure." *J Mol Cell Cardiol* **30**(10): 1929-37.
- Schwartzman, R. A. and J. A. Cidlowski (1993). "Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death." *Endocr Rev* **14**(2): 133-51.
- Schwinger, R. H., M. Bohm, et al. (1994). "The failing human heart is unable to use the Frank-Starling mechanism." *Circ Res* **74**(5): 959-69.
- Schwinger, R. H., J. Wang, et al. (1999). "Reduced sodium pump alpha1, alpha3, and beta1-isoform protein levels and Na⁺,K⁺-ATPase activity but unchanged Na⁺-Ca²⁺ exchanger protein levels in human heart failure." *Circulation* **99**(16): 2105-12.
- Scorrano, L., S. A. Oakes, et al. (2003). "BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis." *Science* **300**(5616): 135-9.
- Sharov, V. G., H. N. Sabbah, et al. (1996). "Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure." *Am J Pathol* **148**(1): 141-9.
- Shi, Y. (2002). "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis." *Mol Cell* **9**(3): 459-70.
- Shizukuda, Y., P. M. Buttrick, et al. (1998). "beta-adrenergic stimulation causes cardiocyte apoptosis: influence of tachycardia and hypertrophy." *Am J Physiol* **275**(3 Pt 2): H961-8.
- Siegmund, B. (2002). "Interleukin-1beta converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation." *Biochem Pharmacol* **64**(1): 1-8.
- Sims, J. E., M. A. Gayle, et al. (1993). "Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(13): 6155-9.
- Sims, J. E., J. G. Giri, et al. (1994). "The two interleukin-1 receptors play different roles in IL-1 actions." *Clin Immunol Immunopathol* **72**(1): 9-14.
- Singer, II, S. Scott, et al. (1995). "The interleukin-1 beta-converting enzyme (ICE) is localized on the external cell surface membranes and in the cytoplasmic ground substance of human monocytes by immuno-electron microscopy." *J Exp Med* **182**(5): 1447-59.
- Singh, K., C. Communal, et al. (2000). "Adrenergic regulation of myocardial apoptosis." *Cardiovasc Res* **45**(3): 713-9.
- Siwik, D. A. and W. S. Colucci (2004). "Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium." *Heart Fail Rev* **9**(1): 43-51.
- SOLVD (1991). "Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. The SOLVD Investigators." *N Engl J Med* **325**(5): 293-302.
- Srinivasula, S. M., M. Ahmad, et al. (1998). "Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization." *Mol Cell* **1**(7): 949-57.
- Srinivasula, S. M., M. Ahmad, et al. (1996). "Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(25): 14486-91.
- Srinivasula, S. M., R. Hegde, et al. (2001). "A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis." *Nature* **410**(6824): 112-6.
- Starling, E. (1908). "The linacre lecture on the law of the heart."

- Stauffer, B. L., J. P. Konhilas, et al. (2006). "Soy diet worsens heart disease in mice." J Clin Invest **116**(1): 209-16.
- Stennicke, H. R., Q. L. Deveraux, et al. (1999). "Caspase-9 can be activated without proteolytic processing." J Biol Chem **274**(13): 8359-62.
- Stennicke, H. R. and G. S. Salvesen (1998). "Properties of the caspases." Biochim Biophys Acta **1387**(1-2): 17-31.
- Studer, R., H. Reinecke, et al. (1994). "Gene expression of the cardiac Na(+)-Ca²⁺ exchanger in end-stage human heart failure." Circ Res **75**(3): 443-53.
- Subramaniam, S., C. Stansberg, et al. (2004). "The interleukin 1 receptor family." Dev Comp Immunol **28**(5): 415-28.
- Sugawara, S., A. Uehara, et al. (2001). "Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells." J Immunol **167**(11): 6568-75.
- Susin, S. A., H. K. Lorenzo, et al. (1999). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor." Nature **397**(6718): 441-6.
- Suzuki, K., B. Murtuza, et al. (2001). "Overexpression of interleukin-1 receptor antagonist provides cardioprotection against ischemia-reperfusion injury associated with reduction in apoptosis." Circulation **104**(12 Suppl 1): I308-I3.
- Swynghedauw, B. (1999). "Molecular mechanisms of myocardial remodeling." Physiol Rev **79**(1): 215-62.
- Syed, F. M., H. S. Hahn, et al. (2005). "Proapoptotic Effects of Caspase-1/Interleukin-1 Converting Enzyme Dominate in Myocardial Ischemia." Circ Res.
- Takemura, G. and H. Fujiwara (2004). "Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction." Pharmacol Ther **104**(1): 1-16.
- Takemura, G. and H. Fujiwara (2006). "Morphological aspects of apoptosis in heart diseases." J Cell Mol Med **10**(1): 56-75.
- Takimoto, E. and D. A. Kass (2007). "Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling." Hypertension **49**(2): 241-8.
- Testa, M., M. Yeh, et al. (1996). "Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension." J Am Coll Cardiol **28**(4): 964-71.
- Thaik, C. M., A. Calderone, et al. (1995). "Interleukin-1 beta modulates the growth and phenotype of neonatal rat cardiac myocytes." J Clin Invest **96**(2): 1093-9.
- Thalappilly, S., S. Sadasivam, et al. (2006). "Involvement of caspase 1 and its activator IpaF upstream of mitochondrial events in apoptosis." Febs J **273**(12): 2766-78.
- The Digitalis Investigation Group (1997). "The effect of digoxin on mortality and morbidity in patients with heart failure. The Digitalis Investigation Group." N Engl J Med **336**(8): 525-33.
- Thompson, C. B. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." Science **267**(5203): 1456-62.
- Thornberry, N. A., H. G. Bull, et al. (1992). "A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes." Nature **356**(6372): 768-74.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." Science **281**(5381): 1312-6.
- Tilly, J. L. and R. N. Kolesnick (2003). "Realizing the promise of apoptosis-based therapies: separating the living from the clinically undead." Cell Death Differ **10**(5): 493-5.
- Torre-Amione, G., S. Kapadia, et al. (1996). "Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD)." J Am Coll Cardiol **27**(5): 1201-6.
- Torre-Amione, G., S. J. Stetson, et al. (1999). "Decreased expression of tumor necrosis factor-alpha in failing human myocardium after mechanical circulatory support: A potential mechanism for cardiac recovery." Circulation **100**(11): 1189-93.
- Towbin, J. A. and N. E. Bowles (2002). "The failing heart." Nature **415**(6868): 227-33.

- van Empel, V. P., A. T. Bertrand, et al. (2005). "Myocyte apoptosis in heart failure." *Cardiovasc Res* **67**(1): 21-9.
- van Empel, V. P. and L. J. De Windt (2004). "Myocyte hypertrophy and apoptosis: a balancing act." *Cardiovasc Res* **63**(3): 487-99.
- Vantrimpont, P., J. L. Rouleau, et al. (1998). "Two-year time course and significance of neurohumoral activation in the Survival and Ventricular Enlargement (SAVE) Study." *Eur Heart J* **19**(10): 1552-63.
- Vaux, D. L., S. Cory, et al. (1988). "Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells." *Nature* **335**(6189): 440-2.
- Verhagen, A. M., P. G. Ekert, et al. (2000). "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins." *Cell* **102**(1): 43-53.
- von Harsdorf, R. (2004). "'Fas-ten' your seat belt: anti-apoptotic treatment in heart failure takes off." *Circ Res* **95**(6): 554-6.
- von Harsdorf, R., P. A. Poole-Wilson, et al. (2004). "Regenerative capacity of the myocardium: implications for treatment of heart failure." *Lancet* **363**(9417): 1306-13.
- Waagstein, F., M. R. Bristow, et al. (1993). "Beneficial effects of metoprolol in idiopathic dilated cardiomyopathy. Metoprolol in Dilated Cardiomyopathy (MDC) Trial Study Group." *Lancet* **342**(8885): 1441-6.
- Wagner, G. and S. Laufer (2006). "Small molecular anti-cytokine agents." *Med Res Rev* **26**(1): 1-62.
- Wainwright, C. L., A. M. Miller, et al. (2002). "NCX4016 (NO-aspirin) reduces infarct size and suppresses arrhythmias following myocardial ischaemia/reperfusion in pigs." *Br J Pharmacol* **135**(8): 1882-8.
- Wang, C., M. W. Wang, et al. (2005). "IL-1beta acts in synergy with endogenous IL-1beta in A375-S2 human melanoma cell apoptosis through mitochondrial pathway." *J Korean Med Sci* **20**(4): 555-61.
- Wang, K., X. M. Yin, et al. (1996). "BID: a novel BH3 domain-only death agonist." *Genes Dev* **10**(22): 2859-69.
- Wang, S., M. Miura, et al. (1998). "Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE." *Cell* **92**(4): 501-9.
- Wang, T. D., W. J. Chen, et al. (2003). "Attenuation of increased myocardial ischaemia-reperfusion injury conferred by hypercholesterolaemia through pharmacological inhibition of the caspase-1 cascade." *Br J Pharmacol* **138**(2): 291-300.
- Webster, K. A. and N. H. Bishopric (2003). "Apoptosis inhibitors for heart disease." *Circulation* **108**(24): 2954-6.
- Wei, M. C., T. Lindsten, et al. (2000). "tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c." *Genes Dev* **14**(16): 2060-71.
- Wei, M. C., W. X. Zong, et al. (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." *Science* **292**(5517): 727-30.
- Weil, J. and H. Schunkert (2006). "[Pathophysiology of chronic heart failure.]." *Clin Res Cardiol* **95** Suppl 4: 1-17.
- Weiss, J. N., P. Korge, et al. (2003). "Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease." *Circ Res* **93**(4): 292-301.
- Wencker, D., M. Chandra, et al. (2003). "A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure." *J Clin Invest* **111**(10): 1497-504.
- Werner, C., K. Werdan, et al. (2001). "Impaired beta-adrenergic control of immune function in patients with chronic heart failure: reversal by beta1-blocker treatment." *Basic Res Cardiol* **96**(3): 290-8.
- Wigginton, J. M., J. K. Lee, et al. (2002). "Synergistic engagement of an ineffective endogenous anti-tumor immune response and induction of IFN-gamma and Fas-ligand-dependent tumor eradication by combined administration of IL-18 and IL-2." *J Immunol* **169**(8): 4467-74.

- Wilson, K. P., J. A. Black, et al. (1994). "Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme." *Nature* **370**(6487): 270-5.
- Woldbaek, P. R., T. Tonnessen, et al. (2003). "Increased cardiac IL-18 mRNA, pro-IL-18 and plasma IL-18 after myocardial infarction in the mouse; a potential role in cardiac dysfunction." *Cardiovasc Res* **59**(1): 122-31.
- Wolny, A., J. P. Clozel, et al. (1997). "Functional and biochemical analysis of angiotensin II-forming pathways in the human heart." *Circ Res* **80**(2): 219-27.
- Wright, G. A. and A. D. Struthers (2006). "Natriuretic peptides as a prognostic marker and therapeutic target in heart failure." *Heart* **92**(2): 149-51.
- Wyllie, A. H., J. F. Kerr, et al. (1980). "Cell death: the significance of apoptosis." *Int Rev Cytol* **68**: 251-306.
- Xue, D., S. Shaham, et al. (1996). "The *Caenorhabditis elegans* cell-death protein CED-3 is a cysteine protease with substrate specificities similar to those of the human CPP32 protease." *Genes Dev* **10**(9): 1073-83.
- Yamanaka, K., M. Tanaka, et al. (2000). "Skin-specific caspase-1-transgenic mice show cutaneous apoptosis and pre-endotoxin shock condition with a high serum level of IL-18." *J Immunol* **165**(2): 997-1003.
- Yamin, T. T., J. M. Ayala, et al. (1996). "Activation of the native 45-kDa precursor form of interleukin-1-converting enzyme." *J Biol Chem* **271**(22): 13273-82.
- Yang, E. and S. J. Korsmeyer (1996). "Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death." *Blood* **88**(2): 386-401.
- Yaoita, H., K. Ogawa, et al. (1998). "Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor." *Circulation* **97**(3): 276-81.
- Yarbrough, W. M., R. Mukherjee, et al. (2003). "Pharmacologic inhibition of intracellular caspases after myocardial infarction attenuates left ventricular remodeling: a potentially novel pathway." *J Thorac Cardiovasc Surg* **126**(6): 1892-9.
- Yin, X. M. (2006). "Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death." *Gene* **369**: 7-19.
- Yin, X. M., Z. N. Oltvai, et al. (1994). "BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax." *Nature* **369**(6478): 321-3.
- Young, J. L., G. K. Sukhova, et al. (2000). "The serpin proteinase inhibitor 9 is an endogenous inhibitor of interleukin 1beta-converting enzyme (caspase-1) activity in human vascular smooth muscle cells." *J Exp Med* **191**(9): 1535-44.
- Yuan, J., S. Shaham, et al. (1993). "The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme." *Cell* **75**(4): 641-52.
- Zamzami, N., P. Marchetti, et al. (1995). "Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo." *J Exp Med* **181**(5): 1661-72.
- Zhang, W. H., X. Wang, et al. (2003). "Fundamental role of the Rip2/caspase-1 pathway in hypoxia and ischemia-induced neuronal cell death." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26): 16012-7.
- Zhang, X. H., R. M. Zhu, et al. (2007). "Therapeutic effects of Caspase-1-Inhibitors on acute lung injury in experimental severe acute pancreatitis." *World J Gastroenterol* **13**(4): 623-7.
- Zhao, M., D. A. Beauregard, et al. (2001). "Non-invasive detection of apoptosis using magnetic resonance imaging and a targeted contrast agent." *Nat Med* **7**(11): 1241-4.
- Zhao, Z. Q., C. D. Morris, et al. (2003). "Inhibition of myocardial apoptosis reduces infarct size and improves regional contractile dysfunction during reperfusion." *Cardiovasc Res* **59**(1): 132-42.
- Zipes, D.P., P. Libby, et al. (2004). "Braunwald's heart disease: A textbook of cardiovascular disease" Philadelphia, W.B. Saunders Co..

- Zong, W. X., C. Li, et al. (2003). "Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis." J Cell Biol **162**(1): 59-69.
- Zorc, M., O. Vraspir-Porenta, et al. (2003). "Apoptosis of myocytes and proliferation markers as prognostic factors in end-stage dilated cardiomyopathy." Cardiovasc Pathol **12**(1): 36-9.
- Zou, H., W. J. Henzel, et al. (1997). "Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3." Cell **90**(3): 405-13.
- Zou, H., Y. Li, et al. (1999). "An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9." J Biol Chem **274**(17): 11549-56.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	– Abbildung
Adv-Casp-1	– Caspase-1-exprimierender Adenovirus
Adv-LacZ	– LacZ-exprimierender Adenovirus
AEC – 3	– Amino-9-Ethyl-Carbazol
ANF	– Atrieller natriuretischer Faktor, atrial natriuretic factor
Apaf	– apoptotic protease activation factor
APS	– Ammoniumpersulfat
ARC	– Apoptosis repressor with a CARD
BCA	– Bicinchoninsäure
Bid	– BH3 interacting domain death agonist
tBid	– Truncated Bid
bp	– Basenpaar
BrdU	– Bromodeoxyuridin
BSA	– Bovines Serum Albumin
C.elegans	– Caenorhabditis elegans
CAD	– Caspase-activated DNase
CARD	– Caspase activation and recruitment domain
Casp-1	– Caspase-1, Interleukin Konversions-Enzym, interleukin converting-enzyme
Casp-1-TG	– Caspase-1-transgen
CBFHH	– Calcium- and bicarbonate-free Hanks with Hepes-Medium
CCC9	– Komplement Komponente C9, complement component C9
CD	– Cluster of differentiation
CD31	– PECAM-1, Plattelet endothelial cell adhesion molecule-1
cDNA	– CopyDNA
cFLIP	– Cellular FLICE-inhibitory protein
Col	– Kollagen, collagen
COX	– Cyclooxygenase
CrmA	– Cytokine response modifier A
CTSD	– Cathepsin D
DAB	– Diaminobenzidin
dATP	– Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	– Desoxycytosintriphosphat
DD	– Todesdomäne, death domain
DED	– Death Effector Domain

dGTP	– Desoxyguanidintriphosphat
DHE	– Dihydroethidium
DIABOLO	– direct IAP binding protein with low pI
DISC	– Todessignal-Komplex, Death Inducing Signaling Complex
DMSO	– Dimethylsulfoxid
DNA	– Desoxyribonukleinsäure
DNase	– Desoxyribonuklease
dNTP	– Desoxyribonukleotide
dp/dtmax	– Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit, erste Ableitung der Druckkurve
DTT	– Dithiothreitol
dTTP	– Desoxythymidintriphosphat
EDA	– Enddiastolische, intraventrikuläre Fläche des linken Ventrikles, end-diastolic area
EDTA	– Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	– Enzyme-linked immunosorbent assay
ESA	– Endsystolische (intraventrikuläre) Fläche des linken Ventrikles, end-systolic area
FADD	– Fas-Associated Death Domain
FasL	– Fas-Ligand
FCS	– Fetal Calf Serum, Fötale Kälberserum
FS	– Verkürzungsefraktion, fractional shortening
g	– 1) Erdbeschleunigung 2) Gramm
GAPDH	– Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	– Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GPCR	– G-Protein gekoppelter Rezeptor, G protein coupled receptor
HUVEC	– Humane, venöse Nabelschnurendothelien, human umbilical vein endothelial cells
IAP	– Inhibitor of apoptosis proteins
I/R	– Ischämie/Reperfusion, ischemia/reperfusion
ICAD	– Inhibitor of CAD
IFN	– Interferon
IGF	– Insulin-like growth factor
IL	– Interleukin
iNOS	– Induzierbare NO-Synthase, inducible NO-synthase
kDa	– KiloDalton

LacZ	– Für die β -Galactosidase codierendes Gen aus dem Lactose-Operon von E.coli
LAD	– Linke absteigende Koronararterie, left anterior decending coronary artery
LPS	– Lipopolysaccharid, Endotoxin
LVEDP	– Linksventrikulärer end-diastolischer Druck, left-ventricular end-diastolic pressure
LVP	– Linksventrikulärer Druck, left ventricular pressure
M	– Mol/Liter
m/v	– Masse pro Volumen
MEM	– Modified Eagle´s Medium
μ g	– Mikrogramm
MHC	– myosin-heavy-chain
MI	– Herzinfarkt, Myokardinfarkt, myocardial infarction
MMP	– Matrix Metalloproteinasen, matrix metalloproteinases
MOI	– Multiplcity of infection
MOPS	– 3-(Morpholino)propansulfonsäure
mPTP	– Mitochondrial permeability transction pore
mRNA	– Boten-Ribonukleinsäure, „messenger RNA“
MTT	– 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	– Anzahl
NaCl	– Natriumchlorid
NaN ₃	– Natriumazid
NaOH	– Natriumhydroxid
NGF	– Nerve growth factor
NO	– Stickstoffmonooxid, Nitric oxide
NP-40	– Nonidet-P40, Detergens
NRCM	– Neonatale Rattenkardiomyozyten, neonatal rat cardiomyocytes
NSAID	– Nichtsteroidales Antiphlogistikum, non steroidal anti-inflammatory drug
OD	– Optische Dichte
8-OHdG	– 8-Hydroxydeoxyguanosin
PARP	– Poly-ADP-ribose polymerase
PBS	– Phosphat-gepufferte Salzlösung, phosphate buffered saline
PCD	– Programmierter Zelltod, Apoptose, programmed cell death
PCR	– Polymerasekettenreaktion
PECAM	– Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1, CD31
PI9	– Proteinase Inhibitor 9, proteinase-inhibitor 9

Polylysin	– Poly-D-lysinbromid
PVDF	– Polyvinylfluorid
RAAS	– Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RISC	– RNA-induced silencing complex
ROS	– Reaktive Sauerstoffspezies, reactive oxygen species
RT	– Reverse Transkriptase
SDS	– Natriumdodecylsulfat
SEM	– Mittlere Standardabweichung
SERCA	– Sarkoplasmatische Kalzium ATPase, sarcoplasmic reticulum calcium ATPase
siRNA	– Small interfering RNA
Smac	– second mitochondrial activator of caspases
SN2	– Bimolekulare nucleophile Substitution
SV40	– Simian Virus 40
Tab.	– Tabelle
TAE-Puffer	– Tris-Acetat-Laufpuffer für Elektrophorese
TEMED	– Tetramethylethylendiamin
TIMP	– Gewebshemmer der Metalloproteinasen, tissue inhibitors of metalloproteinases
TMB	– Tetramethylbenzidin
TNF	– Tumornekrosefaktor, tumor necrosis factor
TRAIL	– TNF-related apoptosis-inducing ligand
Tris	– Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTC	– 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchloridlösung
TUNEL	– TdT-mediated dUTP nick end labeling
V	– Volt
v/v	– Volumen pro Volumen
vMLC1	– ventricular essential myosin light chain
WT	– Wildtyp

DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Stefan Engelhardt für die stets engagierte und persönliche Betreuung während meiner Promotion bedanken. Im Besonderen bin ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und stete Förderung dieser Arbeit, aber auch meiner persönlichen Entwicklung sehr dankbar.

Ferner möchte ich mich bei Prof. Martin J. Lohse für die gute Betreuung bedanken. Besonders die ideenreichen Diskussionen haben meine Arbeit stets positiv vorangetrieben.

Prof. Utz Fischer danke ich für die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie.

Mein ganz besonderer Dank gilt den beiden ehemaligen Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe, Silke Oberdorf-Maass und Dr. Francesca Rochais. Nicht nur durch eure große kollegiale Hilfsbereitschaft, sondern besonders durch unsere Freundschaft habe ich mich sehr schnell im Labor eingelebt und die gemeinsamen Stunden mit euch inner- und außerhalb des Labors sehr genossen.

Ferner möchte ich mich ganz besonders bei Claudia Jentsch und Andrea Ahles aber auch bei Julia Schittl, Nadine Yurdagül-Hemrich, Silke Mühlstedt und Petra Göbel für die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und besonders für die gute Stimmung und die schöne Zeit während der Arbeit, aber auch im Privaten, bedanken.

Mein Dank geht ferner an Frau Dr. Lydia Vlaskin für ihre Hilfe und Rat bei allen Fragen der Tierhaltung.

Bei Dr. Monika Buitrago möchte ich mich für die gute Einarbeitung in mein Projekt bedanken.

Bei Frau Dr. Eva Schmitteckert möchte ich mich für die Generierung der transgenen Mäuse bedanken.

Ebenso danke ich Dr. Moritz Bünemann und Prof. Lutz Hein für die anregenden Diskussionen .

Schließlich möchte ich mich bei allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie und des Rudolf-Virchow-Zentrums bedanken, die hier nicht namentlich erwähnt sind, die mir aber in verschiedensten Fragen bei der Durchführung dieser Arbeit geholfen haben.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Julia Stross, Caroline Schäfer und Kerstin Prikler bedanken, die mich als externe Stützen stets liebevoll motiviert haben und immer ein offenes Ohr für meine "Laborproblemchen" hatten.

Schließlich gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern, Hubert und Elisabeth Merkle. Ich danke euch für euer anhaltendes Vertrauen in mich und meine Arbeit, eure Geduld mit meiner Ungeduld und nicht zuletzt für die finanzielle Unterstützung meiner Lebenspläne.