

Mechanismen und funktionelle Bedeutung des cAMP-second messenger Signalweges in der Konservierung suboptimaler Spenderlebern

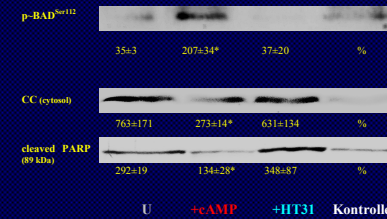
S. Akbar und T. Minor

Sektion Chirurgische Forschung, Klinik für Chirurgie, Universität Bonn

Einleitung:

Der wachsende Mangel an vitalen Spenderorganen hat weltweit dazu geführt, einer Erweiterung der Spenderkriterien und die Nutzung von 'less than optimal' Spenderlebern in Betracht zu ziehen. Die Verwendung solcher marginaler Spenderlebern wird jedoch durch eine erhöhte Inzidenz primärer Dys- oder gar Nichtfunktion beeinträchtigt. Ziel dieser Studie war es, die Bedeutung des cycloAMP second messenger Signalweges in Hinblick auf die Integrität vorgeschädigter Spenderlebern unter der hypothermen Konservierung zu untersuchen.

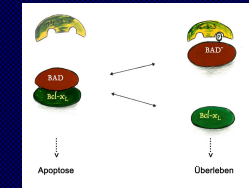
Ergebnisse:



Einfluß von cAMP auf BAD Phosphorylierung und Induktion von Apoptose nach Leberkonservierung (zytosolisches Cytochrom C bzw. 'cleaved' PARP-Fragment)

- deutliche Steigerung der BAD-Phosphorylierung an Ser 112 durch cAMP Stimulation (Immunpräzipitation und Immunoblot mit monoklonalem AK, spezifisch für P~Ser112)

BAD Phosphorylierung führt zu Bindung an Protein 14-3-3 (Harada et al, Mol Cell 1999)
-> Freisetzung von antiapoptotischen Proteinen (z.B. Bcl-x_l) aus Dimerisierung mit BAD
-> Schutz vor mitochondrialer Apoptose?



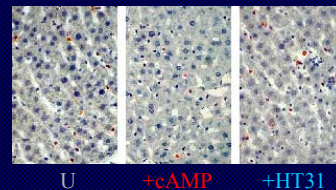
- entsprechend erkennbare Reduzierung mitochondrialer Cytochrom C Freisetzung ins Zytosol
- Verminderung apoptotischer 89 kDa Spaltprodukte von PARP
- Lokalisation apoptotischer Schäden nach TUNEL Färbung in sinusoidalen lining cells (SLC's)
- Aufhebung der beschriebenen Effekte von cAMP durch simultane Inhibition der PKA Verankerung an der Mitochondrienmembran durch HT31.
- globale Verbesserung der vaskulären Konduktivität im Gesamtorgan und dessen funktioneller Integrität durch cAMP Stimulation

Methoden:

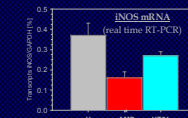
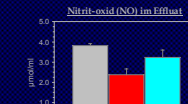
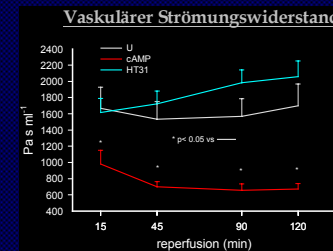
Modell: isolierte Lebern männlicher Wistaratten (250-300g KG)

Leberentnahme 45 min nach Herzstillstand

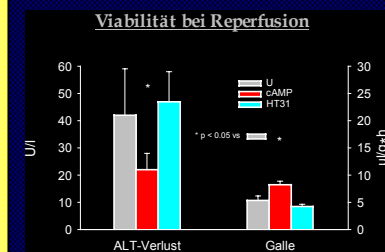
portaler Flush mit 60 ml HTK-Lösung
hypotherme Lagerung bei 4°C für 24h



TUNEL pos. Färbung von SLC's in unbehandelten (U) Lebern, vermindert nach Zusatz von db-cAMP, aber nicht in Gegenwart von HT31



Trotz besserer Leberperfusion fanden sich nach cAMP Gabe geringere Konzentrationen von NO im Effluent. Realtime RT-PCR zeigte analog signifikant erhöhte RNA-Transkription von iNOS in Lebern der Gruppen U und HT31
=> Vaskuläre Effekte von cAMP mutmaßlich auch durch relaxierende Wirkung auf Ito-Zellen, deren postischämische Kontraktion (Thimgan/ Yee, AJP 1999) den sinusoidalen Widerstand beeinflusst.



Schlußfolgerung:

Exogene Stärkung des zellulären cAMP Signalweges scheint geeignet, die hepatische Integrität unter hypothermer Konservierung zu verbessern.

Als ein wesentlicher molekularer Mechanismus kann die PKA abhängige Phosphorylierung von BAD mit konsekutiver Reduktion mitochondrial initierter Apoptose sinusoidaler lining cells angesehen werden.

- unbehandelt: U
- Zusatz eines membranpermeablen cAMP-Analog (db-cAMP; 2µM): cAMP
- Zusatz von db-cAMP bei gleichzeitiger Blockade mitochondrialer Verankerung von Proteinkinase A durch steariertes Peptid HT31 (10µM): HT31

-> Beurteilung der Leberintegrität durch isolierte Reperfusion in vitro (3ml/g/min) für 2h