

**Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B ist essentiell für die Angiotensin II- und die Isoproterenol-induzierte Hypertrophie *in vivo***

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Christian Freund  
aus Mainz  
Oktober 2005

1. Gutachter: Professor Claus Scheidereit

2. Gutachter: Professor Günter Korge

Disputation am: 22. Dezember 2005

<b>I. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 ANATOMIE UND PHYSIOLOGIE DES HERZENS .....	1
1.1.1 <i>Der makroskopische Aufbau des Herzens und die Pumpfunktion</i> .....	1
1.1.2 <i>Die Zellularität des Herzens</i> .....	3
1.2 DAS WACHSTUM DES HERZENS VOR UND NACH DER GEBURT: MITOSE UND PHYSIOLOGISCHE HYPERTROPHIE .....	3
1.2.1 <i>Das embryonale Herz wächst durch Zellteilung (Mitose)</i> .....	3
1.2.2 <i>Postnatal wächst das Herz nur noch durch Zellvolumenzunahme (Hypertrophie)</i> .....	5
1.2.3 <i>Ein gesteigerter Stoffwechsel verursacht die physiologische Hypertrophie im neugeborenen und adulten Organismus.....</i>	5
1.3 DIE PATHOLOGISCHE HYPERTROPHIE: URSACHEN UND MERKMALE.....	5
1.3.1 <i>Dauerstress verursacht die pathologische Hypertrophie im adulten Herzen</i> .....	5
1.3.2 <i>Extrinsische Ursachen der pathologischen Hypertrophie</i> .....	6
1.3.3 <i>Intrinsische Ursachen der pathologischen Hypertrophie</i> .....	7
1.3.4 <i>Phänotypische Merkmale der pathologischen Hypertrophie</i> .....	7
1.3.5 <i>Die pathologische Hypertrophie stellt ein erhöhtes Risiko für die Herzinsuffizienz dar</i> .....	9
1.3.5.1 <i>Die Ursachen der Herzinsuffizienz</i> .....	10
1.3.5.2 <i>Der Verlust von Kardiomyozyten durch Apoptose und Nekrose</i> .....	11
1.3.5.3 <i>Die Beeinträchtigung der Herzfunktion durch Fibrose</i> .....	11
1.4 REZEPTOREN UND SIGNALMOLEKÜLE, DIE ZUR HYPERTROPHIE FÜHREN (S. AUCH TABELLE 2) .....	12
1.4.1 <i>Die Initialisierung des Hypertrophiesignals an der Zellmembran</i> .....	12
1.4.1.1 <i>Mechanosensoren</i> .....	12
1.4.1.2 <i>G-Protein gekoppelte 7-Helixtransmembranrezeptoren (GPCR)</i> .....	13
1.4.1.2.1 <i>Das Renin-Angiotensin-System (RAS)</i> .....	13
1.4.1.2.2 <i>Katecholamine und die Rezeptoren des sympathischen Nervensystems</i> .....	14
1.4.1.2.3 <i>gp130: Die signalvermittelnde Untereinheit der Rezeptoren der IL-6 Familie</i> .....	14
1.4.2 <i>Intrazelluläre Signalmoleküle, die mit der Hypertrophie-Entstehung assoziiert sind</i> .....	15
1.4.2.1 <i>Rezeptorassoziierte Signalmoleküle</i> .....	15
1.4.2.1.1 <i>Heterotrimere G-Proteine</i> .....	15
1.4.2.2 <i>Intermediäre Signalmoleküle</i> .....	16
1.4.2.2.1 <i>Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)</i> .....	16
1.4.2.2.2 <i>Phosphoinositide 3-Kinase (PI3 Kinase)/Akt</i> .....	16
1.4.2.2.3 <i>Calcineurin</i> .....	17
1.4.2.3 <i>Transkriptionsfaktoren</i> .....	17
1.4.2.3.1 <i>NFAT und GATA</i> .....	17
1.4.2.3.2 <i>STAT</i> .....	18
1.5 DIE INHIBITION VON HYPERTROPHIE-INDUZIERENDEN SIGNALWEGEN IM TIERMODELL UND BISHERIGE PHARMAKOLOGISCHE BEHANDLUNGSMETHODEN BEIM MENSCHEN .....	19
1.6 DER TRANSKRIPTIONSFAKTOR NF-κB .....	21
1.6.1 <i>Die Mitglieder der NF-κB-Familie</i> .....	21
1.6.2 <i>Durch genetische Modifikationen belegte in vivo-Funktionen von NF-κB</i> .....	22

1.6.3 Die gestörte NF- $\kappa$ B-Regulation ist mit der Pathogenese verschiedener menschlicher Krankheiten assoziiert.....	23
1.6.4 Funktionen von NF- $\kappa$ B im Herzen.....	24
1.6.4.1 NF- $\kappa$ B und Apoptose.....	24
1.6.4.2 NF- $\kappa$ B induziert Hypertrophie <i>in vitro</i> .....	24
1.7 ZIELSETZUNG DER DOKORARBEIT .....	25
<b>II. ERGEBNISSE .....</b>	<b>27</b>
2.1 UNTERSUCHUNG DER PATHOGENETISCHEN FUNKTION VON NF- $\kappa$ B BEI DER HYPERTROPHIE-ENTSTEHUNG.....	27
2.1.1 Die Generierung von Mäusen mit herzspezifischer Inhibition von NF- $\kappa$ B durch Anwendung des Cre/loxP-Systems.....	27
2.1.2 Cre <sup>MHC</sup> -Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase herzspezifisch.....	29
2.1.3 Die Kardiomyozyten-spezifische Inhibition von NF- $\kappa$ B in $\Delta$ N <sup>MHC</sup> -Mäusen.....	30
2.1.3.1 Die Kardiomyozyten-spezifische Entfernung des Stop-Codons durch die Cre-Rekombinase <i>in vivo</i> .....	30
2.3.1.2 Das I $\kappa$ B $\alpha$ $\Delta$ N-Protein wird herzspezifisch exprimiert.....	31
2.3.1.3 I $\kappa$ B $\alpha$ $\Delta$ N inhibiert die Translokation von p65- NF- $\kappa$ B nach TNF- $\alpha$ Stimulation in Kardiomyozyten von $\Delta$ N <sup>MHC</sup> -Mäusen.....	31
2.2 DIE FUNKTION VON NF- $\kappa$ B BEI DER HYPERTROPHIE <i>IN VIVO</i> .....	33
2.2.1 AngII erhöht die NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität <i>in vivo</i> .....	33
2.2.2 Die Inhibition von NF- $\kappa$ B verhindert die Ausbildung von Angiotensin II (AngII)-induzierter Hypertrophie <i>in vivo</i> .....	34
2.2.3 Histologische Schnitte zeigen bei $\Delta$ N <sup>MHC</sup> -Mäusen eine reduzierte Hypertrophie nach AngII-Gabe..	34
2.2.4 In $\Delta$ N <sup>MHC</sup> -Mäusen induziert AngII keine Zunahme der Wanddicken von Septum und linksventrikulärer Hinterwand.....	35
2.2.5 $\Delta$ N <sup>MHC</sup> -Mäuse haben nach AngII-Gabe ein geringeres Verhältnis von Herzgewicht/Tibiallänge im Vergleich zur Kontrollgruppe.....	36
2.2.6 $\Delta$ N <sup>MHC</sup> -Mäuse entwickeln nach AngII-Behandlung keine Steigerung der Herzfunktion.....	37
2.2.7 In $\Delta$ N <sup>MHC</sup> -Mäusen ist auch die Isoproterenol-induzierte Hypertrophie inhibiert.....	39
2.2.8 Die Inhibition von NF- $\kappa$ B <i>in vivo</i> verhindert teilweise die Expression von Hypertrophie markern....	40
2.2.9 Die Inhibition von NF- $\kappa$ B <i>in vivo</i> bewirkt keine Steigerung der Apoptoserate bei Kardiomyozyten unter basalen Bedingungen oder kurzzeitigem Stress .....	42
2.2.10 Die AngII-induzierte perivaskuläre Entzündung ist in $\Delta$ N <sup>MHC</sup> -Mäusen nicht verändert .....	43
2.2.11 Die Wirkung der Kardiomyozyten-spezifischen Inhibition von NF- $\kappa$ B bei Hypertrophie nach Langzeitstress .....	44
2.3. VERSUCHE MIT ISOLIERTEN KARDIOMYOZYTEN IN KULTUR.....	46
2.3.1 <i>In vitro</i> induziert AngII direkt die Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B-p65 und p50 an die DNA. ....	46
2.3.2 Bekannte Hypertrophiestimuli wirken unterschiedlich auf die DNA-Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B in adulten Kardiomyozyten.....	47
2.3.3 Prohypertrophische Zytokine der IL-6 Familie steigern die DNA-Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B <i>in vitro</i> .....	49
2.3.4 In adulten Kardiomyozyten ist die FCS-induzierte Hypertrophie unabhängig von NF- $\kappa$ B.....	51

2.3.5 In neonatalen Kardiomyozyten verhindert die Inhibition von NF- $\kappa$ B nicht die Hypoxie/Reperfusion-induzierte Hypertrophie.....	52
2.3.6 In isolierten, adulten Kardiomyozyten bewirkt die Inhibition von NF- $\kappa$ B durch I $\kappa$ B $\alpha$ $\Delta$ N keine Steigerung der Apoptose nach TNF- $\alpha$ Stimulation.....	54
2.4 DIE INHIBITION VON NF- $\kappa$ B BEWIRKT DIE REDUZIERTE MRNA-EXPRESSION VON GP130 <i>IN VITRO</i> UND <i>IN VIVO</i> .....	56
<b>III. DISKUSSION .....</b>	<b>60</b>
3.1 EXPERIMENTELLE MODELLE.....	60
3.1.1. Die Verwendung des Cre/loxP-System zur Generierung von $\Delta$ N <sup>MHC</sup> -Mäusen .....	60
3.1.2. <i>In vitro</i> Modelle: Adulte versus neonatale Kardiomyozyten.....	63
3.2 DIE INHIBITION DER NF- $\kappa$ B-AKTIVITÄT HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE PHYSIOLOGISCHE HYPERTROPHIE, SCHÜTZT ABER VOR PATHOLOGISCHER HYPERTROPHIE .....	64
3.3 NF- $\kappa$ B UND GP 130: EIN MODELL FÜR DIE VERBINDUNG ZWEIER KARDIALER ZELLTYPEN UND ZWEIER PROHYPERTROPHISCHER SIGNALWEGE .....	66
3.4 NF- $\kappa$ B: EIN ÜBERLEBENSFAKTOR FÜR KARDIOMYOZYTEN <i>IN VIVO</i> UND <i>IN VITRO</i> ?.....	67
3.5 NF- $\kappa$ B UND ANDERE HYPERTROPHIEMOLEKÜLE: WELCHE EIGNEN SICH POTENTIELL FÜR DIE PHARMAKOLOGISCHE INHIBITION? .....	69
<b>IV. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>71</b>
4.1 MAUSMODELLE.....	71
4.2 GENOTYPISIERUNG DER MÄUSE MITTELS POLYMERASE-KETTENREAKTION (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR).....	71
PCR-Programm: .....	73
4.3 <i>IN VIVO</i> EXPERIMENTE MIT MÄUSEN .....	74
4.3.1 Die Induktion von kardialer Hypertrophie im Tiermodell mittels microosmotischer Pumpen.....	74
4.3.2 Die Induktion von Hypertrophie im Tiermodell mittels partieller Aortenligatur (transaortic constriction, TAC) .....	75
4.3.3 Echokardiographie .....	75
4.4 PRÄPARATION VON PRIMÄRZELLEN UND ZELLKULTUR .....	76
4.4.1 Präparation adulter links-ventrikulärer Kardiomyocyten und Nichtmyocyten aus der Ratte .....	76
4.4.2 Präparation adulter, linksventrikulärer Mauskardiomyozyten.....	77
4.4.3 Präparation neonataler Kardiomyozyten aus der Ratte.....	78
4.4.4 Zellkultur und Infektion mit Adenovirus .....	78
4.5 ISOLATION VON DNA UND RNA .....	79
4.5.1 Isolation von genomischer DNA aus Mausorganen .....	79
4.5.2 Isolation von genomischer DNA aus isolierten Mauskardiomyozyten.....	80
4.5.3 Isolation von Gesamt-RNA aus Mausherzen oder isolierten Kardiomyozyten .....	80
4.6 HERSTELLUNG VON PROTEINEXTRAKTEN .....	81
4.6.1 Herstellung zytoplasmatischer und nukleärer Extrakte aus Kardiomyozyten .....	81
4.6.2 Herstellung zytoplasmatischer und nukleärer Extrakte aus Mausorganen .....	81

4.6.3 Herstellung von Gesamtorganextrakten und Immunopräzipitation.....	82
4.6.4 Proteinquantifizierung.....	82
4.7 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE) UND WESTERNBLOT.....	83
4.8 NACHWEIS DER DNA-BINDUNGSAKTIVITÄT VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN.....	84
4.8.1 Radioaktive Markierung von Oligonukleotidsonden.....	84
4.8.2 Nachweis der DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren mittels Gelelektrophorese (EMSA: electrophoresis mobility shift assay).....	84
4.9 HISTOLOGIE.....	85
4.9.1 Masson's Trichrome, PAS und H/E-Färbung.....	85
4.9.2 $\beta$ -Galactosidase-Farbreaktion (X-Gal Test).....	85
4.9.3 TUNEL-Test.....	86
4.9.4 Immunhistochemischer Nachweis von NF- $\kappa$ B-p65 oder Myomesin in adulten Mauskardiomyozyten.....	86
4.10 EXPRESSIONSANALYSEN.....	87
4.10.1 Gen-Chip Analyse.....	87
4.10.2 Realtime Reverse Transkriptase (RT)-PCR.....	87
4.10.3 Klonierung des PCR-Fragmentes.....	89
4.11 MESSUNG DER PROTEINSYNTHESE VON ADULTEN KARDIOMYOZYTEN MITTELS $^3$ H LEUCIN-EINBAU.....	89
4.12 DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FLUORESCENCE-ACTIVATED CELL SORTER, FACS).....	89
4.13 STATISTIK.....	90
4.14 LÖSUNGEN/PUFFER.....	90
4.15 ZELLKULTURMEDIEN.....	94
4.16 GELE.....	95
<b>V. LISTE DER ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>97</b>
<b>VI. LITERATUR.....</b>	<b>102</b>
<b>VII. ANHANG.....</b>	<b>114</b>
7.1 ZUSAMMENFASSUNG.....	114
7.2. SUMMARY.....	116
7.3 PUBLIKATIONEN.....	118
7.4. DANKSAGUNG.....	119