

II. Ergebnisse

2.1 Untersuchung der pathogenetischen Funktion von NF- κ B bei der Hypertrophie-Entstehung

2.1.1 Die Generierung von Mäusen mit herzspezifischer Inhibition von NF- κ B durch Anwendung des Cre/loxP-Systems

Zur Untersuchung der Funktion von NF- κ B bei der kardialen Hypertrophie und Apoptose *in vivo* wurden Mäuse mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Inhibition von NF- κ B (Δ N^{MHC}-Mäuse) durch Anwendung des Cre/loxP-Systems generiert (Abb. 5 A).

Die Cre-Rekombinase (Cre) ist das Enzym des Bakteriophagen P1, eines Escherichia coli infizierenden Virus. Cre hat die Aufgabe während der Infektion zusammenhängende Phagen Genome zu trennen, indem es kurze Phagen-DNA-Sequenzen (sogenannte loxP-Sequenzen) erkennt und die dazwischenliegende DNA mitsamt einer der flankierenden loxP-Sequenzen ausschneidet. Das Cre/loxP-System kann auch zur Modifikation des Genoms von Säugetieren eingesetzt werden (143). Die Cre-vermittelte Rekombination kann zeitlich und räumlich moduliert werden, indem für die Cre-Expression Liganden-induzierbare und/oder gewebespezifische Promotoren eingesetzt werden.

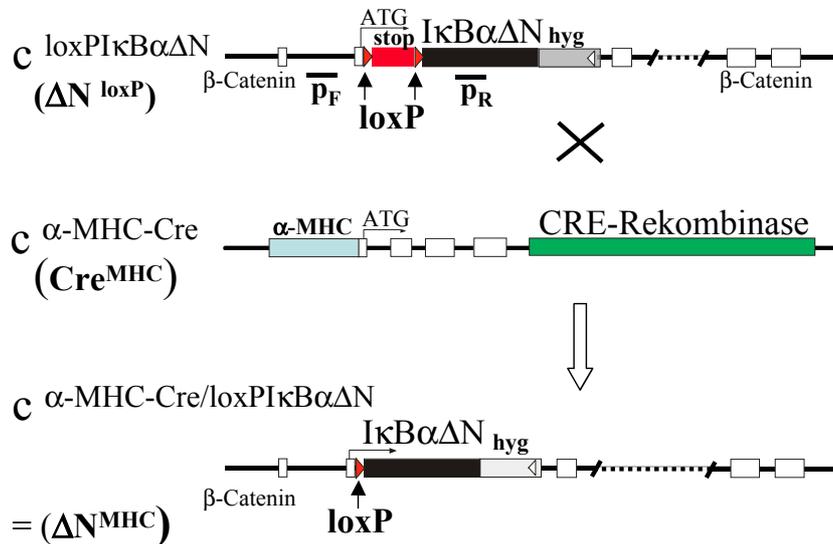
Zur Generierung der Δ N^{MHC}-Mäuse wurden zwei verschiedene Mausstämme miteinander gekreuzt (Abb. 5A):

1. c^{loxPI κ B α Δ N}-Mäuse (Δ N^{loxP}) besitzen durch homologe Rekombination die I κ B α Δ N-cDNA als Insert in einem Allel des ubiquitär exprimierten β -Catenin-Lokus. Dabei wurden die β -Catenin Exons 3-6 durch das I κ B α Δ N-Insert ersetzt. Das zweite Allel muss intakt bleiben, da der vollständige Verlust von β -Catenin letal ist (144). Die Transkription von I κ B α Δ N unterliegt dem β -Catenin-Promotor. Dem Insert sind jedoch zwei loxP-Sequenzen vorgeschaltet, die ein Stop-Codon flankieren („gefloxt“), das die Translation von I κ B α Δ N verhindert. Dem I κ B α Δ N-Protein fehlen die ersten 70 N-terminalen Aminosäuren des endogenen Moleküls, darunter auch die für die Phosphorylierung, Ubiquitinylierung und anschließende Degradation notwendigen Serine 32 und 36, so dass I κ B α Δ N als NF- κ B-Suppressor fungiert (145).

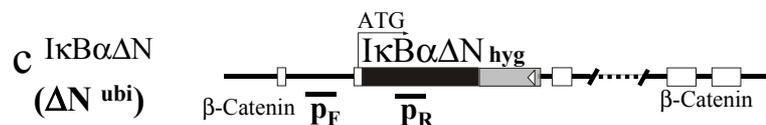
2. Bei den Cre^{MHC}-Mäusen unterliegt die Expression von Cre dem kardiomyozytenspezifischen Promotor des α -myosin heavy chain (α -MHC)-Gens (Abb. 5A). Der Promotor wird im Herzen während der Embryogenese parallel zur im Embryo dominierenden β -Isoform und nach der Geburt im Zuge des Wechsels von der fötalen β - zur adulten α -Isoform aktiviert, und ist auch in adulten Kardiomyozyten aktiv (146). Bei den

Cre^{MHC}-Mäusen ist das Transgen an einer beliebigen Stelle im Genom integriert (147). Durch die Cre-Aktivität wird eine loxP-Sequenz zusammen mit dem Stop-Codon beseitigt. Dies ermöglicht die Translation von IκBαΔN.

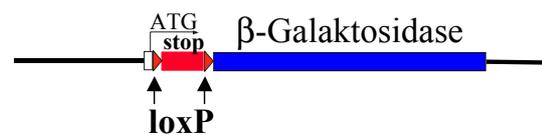
A



B



C



B6; 129S-Gtrosa26^{TM1sor}
 $(\text{lacZ}^{\text{loxP}})$

Abb. 5: Übersicht der genetisch veränderten Mausstämme

(A) Kreuzungsschema zur Generierung von Mäusen mit Kardiomyozyten-spezifischer Expression von IκBαΔN (ΔN^{MHC}). Bei den $\text{c}^{\text{loxP I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}}$ -Mäusen ($\Delta\text{N}^{\text{loxP}}$) wurde die IκBαΔN cDNA, die für die Aminosäuren 71-317 von IκBα kodiert, durch homologe Rekombination in den β-Catenin-Locus eingefügt. IκBαΔN fehlen die Phosphorylierungs- und Ubiquitylierungsstellen, die für den Signal-induzierten Abbau von IκBα notwendig sind. IκBαΔN fungiert demnach als Superrepressor von NF-κB. Am Startcodon des β-Catenin-Gens befinden sich bei den $\Delta\text{N}^{\text{loxP}}$ -Mäusen zwei loxP-Sequenzen, die ein Stopcodon umrahmen. Die Translation von IκBαΔN findet nur nach Entfernung des Stop-Codons durch die Cre-Recombinase statt. Zur Generierung von $\Delta\text{N}^{\text{MHC}}$ -Mäusen mit herzspezifischer Rekombination wurden $\Delta\text{N}^{\text{loxP}}$ -Mäuse mit Cre^{MHC} Mäusen (Michael Schneider, Houston) gekreuzt, bei denen die Cre-Expression dem kardiomyozytenspezifischen Promotor des α-

myosin heavy chain (α -MHC)-Gens unterliegt. Die Bindestellen der Primer zur Detektion der (gefloxten) $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -Sequenz sind mit p_F (forward, 5') und p_R (reverse, 3') gekennzeichnet. **(B) $\Delta\text{N}^{\text{ubi}}$ -Mäuse exprimieren $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ ubiquitär.** Entsprechend den $\Delta\text{N}^{\text{loxP}}$ -Mäusen wurde die $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ cDNA durch homologe Rekombination in den β -Catenin-Locus eingefügt. In diesem Fall fehlt das vorgeschaltete, geflochte Stop-Codon, was zu ubiquitärer Expression von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ führt. **(C) B6; 129S-Gtrosa26^{TM1sor}-Mäuse ($\text{lacZ}^{\text{loxP}}$) tragen eine geflochte lacZ -Sequenz.** Bei den $\text{lacZ}^{\text{loxP}}$ -Mäusen wird die β -Galaktosidase nur nach Entfernung des Stop-Codons durch die Cre-Rekombinase exprimiert.

2.1.2 Cre^{MHC}-Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase herzspezifisch

In einem Vorversuch wurde getestet, ob Cre^{MHC}-Mäuse Cre tatsächlich herzspezifisch exprimieren. Dazu wurden Cre^{MHC}-Mäuse mit gefloxten lacZ-Mäusen ($\text{lacZ}^{\text{loxP}}$) gekreuzt. Dem lacZ-Gen, das für das bakterielle Enzym β -Galactosidase kodiert, ist ein gefloxtes Stopcodon vorgeschaltet, das analog zu dem Konstrukt der $\Delta\text{N}^{\text{loxP}}$ -Mäuse die Translation verhindert (Abb. 5C). Die aus der Rekombination durch Cre resultierende β -Galactosidaseaktivität wird mittels enzymatischem Test als Blaufärbung (X-Gal) nachgewiesen. Von Cre^{MHC}/ $\text{lacZ}^{\text{loxP}}$ doppelt positiven Tieren sowie von Kontrollmäusen (WT, Cre^{MHC} oder $\text{lacZ}^{\text{loxP}}$) wurden Herz, Leber und Lunge einer X-Gal-Färbung unterzogen (Abb. 6). Herz und Lunge der Kontrolltiere waren ungefärbt, während die Leber eine grünliche, unspezifische Färbung aufwies. Abbildung 6 zeigt als Beispiel eine Wildtyp (WT)-Maus. Im Gegensatz dazu waren bei den Cre^{MHC}/ $\text{lacZ}^{\text{loxP}}$ -Tieren die Atria und Ventrikel des Herzens deutlich blau gefärbt, wobei die Blaufärbung mosaikartig verteilt war und nicht alle Zellen erfasste. Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass der Cre-assoziierte α -MHC-Promotor nur in Kardiomyozyten exprimiert wird (148), die zwar ca. 75% des Herzmuskelvolumens bilden, zahlenmäßig im Vergleich zu den Nichtmyozyten jedoch eine Minderheit (30%) darstellen. Hinzukommt, dass ca. 10% oder mehr Kardiomyozyten aus unbekanntem Gründen keine Cre-Rekombinase exprimieren (149). Die Leber der Cre^{MHC}/ $\text{lacZ}^{\text{loxP}}$ -Tiere zeigte wie die der Kontrollen nur Hintergrundfärbung. Im Gegensatz dazu waren bei den Cre^{MHC}/ $\text{lacZ}^{\text{loxP}}$ -Tieren einige Gefäße der Lunge blau gefärbt. Die Existenz von Kardiomyozyten in Lungenvenen ist bereits beschrieben worden (150).

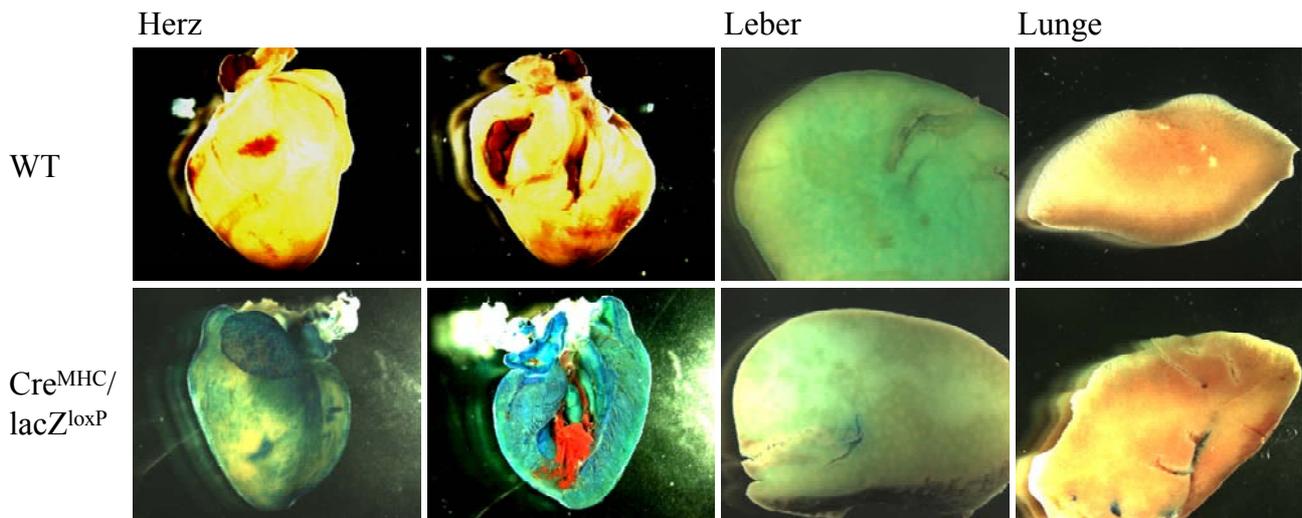


Abb. 6: Die Cre-Rekombinase wird herzspezifisch exprimiert.

Cre^{MHC} Mäuse wurden mit lacZ^{loxP}-Mäusen gekreuzt. Die β -Galactosidase wird nur in Geweben exprimiert, in denen die Cre-Rekombinase das von loxP-Sequenzen flankierte Stopcodon entfernt hat. Die Aktivität der β -Galactosidase wird mit Hilfe des X-Gal Substrates nachgewiesen, das in ein blaues Präzipitat überführt wird. Dargestellt ist der Farbttest in verschiedenen Organen von einer Wildtyp (WT) und einer Cre^{MHC}/lacZ^{loxP}-Maus. Das Herz (Längsschnitt) ist in der Aussenansicht (links) und in der Innenansicht (rechts) dargestellt. Vergrößerung 20fach.

2.1.3 Die Kardiomyozyten-spezifische Inhibition von NF- κ B in Δ N^{MHC}-Mäusen

Bevor die Rolle von NF- κ B bei der Hypertrophie *in vivo* untersucht werden konnte, musste nachgewiesen werden, dass die Aktivierung von NF- κ B in Herzen von Δ N^{MHC}-Mäusen inhibiert ist.

2.1.3.1 Die Kardiomyozyten-spezifische Entfernung des Stop-Codons durch die Cre-Rekombinase *in vivo*

Um die Rekombinationsaktivität von Cre bei Δ N^{MHC}-Mäusen zu testen, wurde eine PCR zum Nachweis des geflochtenen I κ B α Δ N-Konstruktes mit isolierter DNA aus Herz und Leber durchgeführt. Die Bindestellen der Primer sind in Abb. 5A mit p_F (forward, 5') und p_R (reverse, 3') gekennzeichnet. Bei den Δ N^{MHC}-Mäusen führte Cre zur Entfernung des Stop-Codons und einer loxP-Sequenz spezifisch im Herzen, nicht jedoch in der Leber (Abb. 7A, Δ N^{MHC}). Wegen der verbliebenen zweiten loxP-Sequenz läuft diese Bande etwas langsamer als bei Δ N^{ubi}-Mäusen (Abb. 7A, Δ N^{MHC} versus Δ N^{ubi}). Die hier als Positivkontrolle eingesetzten Δ N^{ubi}-Mäuse (Abb. 5B) exprimieren I κ B α Δ N unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven β -Catenin Promotors (128). Wie erwartet, konnte in Δ N^{loxP}-Mäusen nur das geflochte I κ B α Δ N-Fragment amplifiziert werden (Abb. 7A, Δ N^{loxP}). Diese Bande wurde auch in Herzen aus Δ N^{MHC}-Mäusen detektiert, zum einen wegen des relativ hohen Anteils an Nichtmyozyten, zum anderen wegen der Nichtexpression von Cre in einigen, wenigen

Kardiomyozyten. In Kulturen von isolierten Mauskardiomyozyten, die kaum Nichtmyozyten enthalten, ist der Anteil an rekombinierter DNA entsprechend vergrößert (Abb. 7B, ΔN^{MHC}). In diesem Fall wurde eine zusätzliche PCR für β -Catenin zur Ladungskontrolle durchgeführt.

2.1.3.2 Das $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -Protein wird herzspezifisch exprimiert

Zur Detektion von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ auf Proteinebene wurden Organextrakte von ΔN^{loxP} -, ΔN^{MHC} -, sowie ΔN^{ubi} -Mäusen als Positivkontrolle mit einem Antikörper, der gegen den C-Terminus von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ gerichtet ist, inkubiert. Der Antikörper bindet sowohl das endogene Protein als auch den im N-Terminus verkürzten Superrepressor $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$. Der Immunpräzipitation folgte ein Westernblot mit demselben Antikörper (Abb. 7C). $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ war bei ΔN^{MHC} -Mäusen nur im Herzen nicht jedoch in der Leber oder der Niere nachweisbar. Erwartungsgemäß wurde $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ in Herzen von ΔN^{ubi} -Mäusen stärker exprimiert, da es in allen Zelltypen präsent ist. Hingegen wurde $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ bei ΔN^{loxP} -Mäusen in keinem Organ exprimiert.

2.1.3.3 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ inhibiert die Translokation von p65- NF- κB nach TNF- α Stimulation in Kardiomyozyten von ΔN^{MHC} -Mäusen

Um die Inhibition der NF- κB -Aktivität *in vivo* zu testen, wurden WT- und ΔN^{MHC} -Mäuse mit TNF- α injiziert, und Herz und Leber nach 30 min Inkubation entnommen. TNF- α ist ein gängiger, potenter Aktivator von NF- κB . In den Organextrakten wurde die DNA-Bindungsaktivität von NF- κB mit Hilfe eines EMSA überprüft (Abb. 7D). TNF- α führte sowohl in der Leber als auch im Herzen zu einer verstärkten DNA-Bindungsaktivität von NF- κB , wobei bei den Herzen der ΔN^{MHC} -Mäusen nur eine sehr geringe Reduktion festgestellt werden konnte. Dies ist auf die starke Aktivierung von NF- κB durch TNF- α in Nichtmyozyten zurückzuführen, deren Anteil am Herzgewebe ca. 70% beträgt. Bei isolierten Nichtmyozyten induziert TNF- α die DNA-Bindungsaktivität von NF- κB (siehe Abb. 15 A). Aus diesem Grund wurden Kardiomyozyten aus Herzen von WT- und ΔN^{MHC} -Mäusen isoliert und Immunfluoreszenzfärbungen mit Hilfe eines Antikörpers gegen NF- κB p65 (TRITC, rot) sowie Kernfärbungen (DAPI, blau) angefertigt (Abb. 7 E). Als Nachweis für die Aktivität von NF- κB diente die nukleäre Translokation nach TNF- α -Stimulation. Für jede Versuchsbedingung sind zwei Zellen abgebildet. In unbehandelten Zellen von WT (7E, oben) oder von ΔN^{MHC} -Mäusen (nicht gezeigt) war im Kern nur eine geringe Menge von p65 detektierbar. Im Gegensatz dazu war p65 in Kardiomyozyten von WT nach 30minütiger Stimulation mit TNF- α im Kern deutlich nachweisbar (7E, Mitte). Dieser Effekt war in

Kardiomyozyten von ΔN^{MHC} -Mäusen erheblich reduziert (7E, unten). Die Inhibition der p65 Translokation in TNF- α stimulierten Kardiomyozyten von ΔN^{MHC} -Mäusen war in manchen Zellen nicht ausgeprägt, was sich mit der fehlenden Expression der Cre-Rekombinase in einem Teil der Zellen erklären lässt.

Diese Versuche zeigen, dass $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ bei ΔN^{MHC} -Mäusen herzspezifisch exprimiert wird und die Aktivierung von NF- κB in Kardiomyozyten effektiv unterbindet.

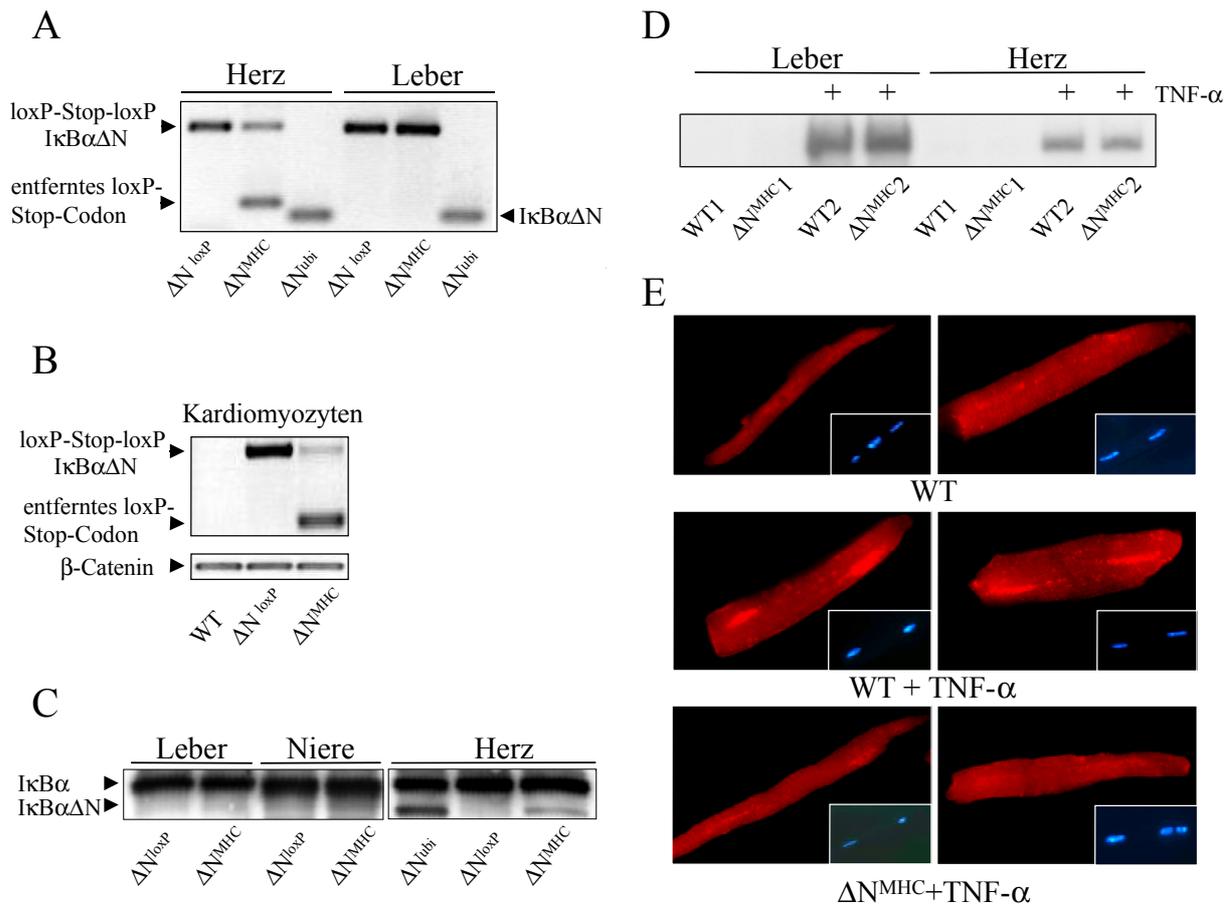


Abb. 7: *In vivo* wird $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ Kardiomyozyten-spezifisch exprimiert und verhindert die Aktivierung von NF- κB nach der Stimulation mit TNF- α .

(A) Die herzspezifische Entfernung des Stopcodons bei ΔN^{MHC} -Mäusen. PCR zur Detektion der geflochtenen $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -Sequenz mit genomischer DNA aus Herz und Leber. Die Primer (pF, 5' und pR, 3') sind in Abb. 5A dargestellt. Bei ΔN^{MHC} -Mäusen bewirkte die Cre-Rekombinase die Entfernung des Stop-Codons zusammen mit einer loxP-Sequenz nur im Herzen und nicht in der Leber. Die Rekombination ist nicht vollständig, da die Nichtmyozyten des Herzens keine Cre-Rekombinase exprimieren. ΔN^{ubi} -Mäuse exprimieren $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ in allen Geweben. **(B) Isolierte Kardiomyozyten aus ΔN^{MHC} -Mäusen weisen verstärkt das rekombinierte $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -Fragment auf.** Die PCR wurde mit denselben Primern wie in A durchgeführt. In Kardiomyozyten aus ΔN^{MHC} -Mäusen wurden nur wenige nicht-rekombinierte loxP-Stop-loxP- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -Fragmente amplifiziert, da die Kulturen nur wenige Nichtmyozyten enthalten. Die PCR für endogenes β -Catenin diente als Ladungskontrolle. **(C) Das $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -Protein wird bei ΔN^{MHC} -Mäusen herzspezifisch exprimiert.** Zur Detektion von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ in Gesamtherzextrakt wurde eine Immunpräzipitation mit anschließendem Immunoblot durchgeführt. Als Positivkontrolle diente Herzextrakt aus einer ΔN^{ubi} -Maus. **(D) In**

Gesamtherzextrakten von ΔN^{MHC} -Mäusen ist die Aktivierung von NF- κ B durch TNF- α kaum vermindert. Die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B wurde in einem EMSA mit Gesamtorganextrakten von unbehandelten oder mit TNF- α (30 min)-injizierten Wildtyp (WT)- und ΔN^{MHC} -Mäusen mit Hilfe einer radioaktiv markierten NF- κ B-Bindungssequenz durchgeführt. **(E) In isolierten Kardiomyozyten von ΔN^{MHC} -Mäusen inhibiert I κ B α Δ N die nukleäre Translokation von NF- κ B-p65 nach TNF- α Stimulierung.** Isolierte Kardiomyozyten von WT- oder ΔN^{MHC} -Mäusen wurden wie angegeben mit TNF- α 30 min stimuliert. Mittels Immunfluoreszenz wurde NF- κ B-p65 (rot) oder die Kerne (blau, Ausschnitt) nachgewiesen. Pro Versuchsbedingung sind zwei Zellen in 60facher Vergrößerung dargestellt.

2.2 Die Funktion von NF- κ B bei der Hypertrophie *in vivo*

2.2.1 AngII erhöht die NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität *in vivo*

Zur Induktion der Hypertrophie *in vivo* wurde das Peptidhormon Angiotensin II (AngII) eingesetzt. Zunächst wurde getestet, ob AngII NF- κ B im Herzen *in vivo* aktivieren kann. Dazu wurden AngII-gefüllte mikroosmotischen Pumpen in WT-Mäuse implantiert. Die AngII-Konzentration betrug wie bei der Induktion der Hypertrophie 1.4 μ g/kg/min (s.u.). Nach ein bis sieben Tagen wurde das Herz der jeweiligen Maus entnommen. Mit dem nukleären Extrakt wurde die NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität mittels EMSA untersucht.

Abbildung 8 zeigt die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B im Herzen *in vivo* nach ein- bis siebentägiger Infusion mit AngII. Als Kontrolle diente nukleärer Herzextrakt einer unbehandelten Maus (Abb. 8, \emptyset) bzw. einer über sieben Tage mit Lösungsmittel (0.9% NaCl/0.01 N Essigsäure) infundierten Maus (Abb. 8, LM). Ein EMSA für Oct-1 diente als Ladungskontrolle. Die NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität war nach ein bis sieben Tagen AngII-Gabe moderat erhöht, wobei das Maximum nach 7 Tagen erreicht wurde (Abb. 8). Die geringere DNA-Bindungsaktivität nach 5 Tagen war wahrscheinlich auf Probleme bei der Extraktgewinnung zurückzuführen, da für diesen Zeitpunkt die Oct-1 Bande schwach war. Für die Infusionszeiten von ein und zwei Tagen bleibt der Einfluss des operativen Eingriffes auf die NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität unklar. Für den Zeitpunkt von 7 Tagen war die entsprechende Kontrolle vorhanden. Das Experiment gibt aufgrund der langen Infusionszeiten keinen Aufschluß darüber, ob sich AngII primär oder sekundär auf die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B auswirkt. Zusätzlich bleibt unklar in welchem Zelltyp NF- κ B aktiviert wird. Beide Fragestellungen wurden in *in vitro*-Experimenten behandelt (s.u.).

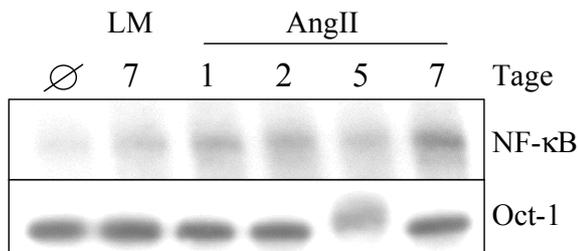


Abb. 8: AngII stimuliert die DNA-Bindungsaktivität von NF-κB im Herzen

Wildtypmäusen wurden mit AngII oder Lösungsmittel (LM) gefüllte microsotische Pumpen subkutan implantiert. Die Pumpdauer variierte von ein bis sieben Tage. Eine Maus war unbehandelt (\emptyset). Die DNA-Bindungsaktivität von NF-κB wurde mittels EMSA mit Nukleären Extrakten bestimmt. Als Ladungskontrolle diente ein EMSA für Oct-1.

2.2.2 Die Inhibition von NF-κB verhindert die Ausbildung von Angiotensin II (AngII)-induzierter Hypertrophie *in vivo*

Um die Wirkung der Inhibition von NF-κB auf die Hypertrophie *in vivo* zu testen, wurden microosmotische Pumpen mit AngII gefüllt und subkutan in ΔN^{MHC} -Mäuse implantiert. Für AngII wurde eine hohe Dosis von 1400 ng/kg/min gewählt, da geringere Dosen (200 ng/kg/min) in Vorversuchen nicht zu detektierbarer Hypertrophie geführt hatten (nicht gezeigt). Die Pumpdauer betrug 14 Tage. Als Kontrolltiere wurden WT-, ΔN^{loxP} - und Cre^{MHC} -Tiere zusammengefasst, da sich diese untereinander weder basal noch in ihrer Reaktion auf Hypertrophie-Stimuli unterschieden, wie mittels nachfolgend beschriebener Methoden festgestellt wurde (nicht gezeigt). Scheinoperierte Tiere wurden ohne Implantierung einer Pumpe operiert.

2.2.3 Histologische Schnitte zeigen bei ΔN^{MHC} -Mäusen eine reduzierte Hypertrophie nach AngII-Gabe

Zunächst wurde die Morphologie des Herzens anhand von Querschnitten untersucht (Abb. 9 A, linke Spalte). Im normalen Herzen eines Wildtypieres (WT) sind der relativ kleine, rechte Ventrikel (RV) und der größere, linke Ventrikel (LV) erkennbar, die beide durch das linksventrikuläre Septum (LVS) getrennt sind (Abb. 9A, WT). Morphologisch bestanden keinerlei Unterschiede bei den Herzen von jeweils unbehandelten WT-, ΔN^{loxP} -, Cre^{MHC} - oder ΔN^{MHC} -Mäusen (Daten nicht gezeigt). Nach AngII-Gabe zeigte sich bei den Kontrolltieren eine deutliche Zunahme der Wanddicke, sowohl bei der linksventrikulären Hinterwand (LVHW) als auch beim Septum (Abb. 9A, LVS, WT+AngII). Auch bei ΔN^{loxP} -, Cre^{MHC} -Tieren induzierte AngII Hypertrophie (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu war die AngII-induzierte Zunahme der Wanddicken bei linksventrikulärer Hinterwand und Septum in

ΔN^{MHC} -Mäusen reduziert (Abb. 9A, $\Delta N^{\text{MHC}}+\text{AngII}$). Dieses Ergebnis wurde durch Analyse der Kardiomyozytengröße bestätigt (Abb. 9A, rechte Spalte). AngII induzierte bei Kontrolltieren ein Größenwachstum der Kardiomyozyten, das bei ΔN^{MHC} -Mäusen wesentlich geringer ausfiel (Abb. 9A, WT+AngII versus $\Delta N^{\text{MHC}}+\text{AngII}$).

2.2.4 In ΔN^{MHC} -Mäusen induziert AngII keine Zunahme der Wanddicken von Septum und linksventrikulärer Hinterwand

Zur Quantifizierung der Hypertrophie sowie zur Bestimmung funktioneller Parameter wurden echokardiographische Untersuchungen des Herzens durchgeführt. Diese erfolgten vor der Implantierung der Pumpen (Basalwert) und kurz vor Ende der Pumpperiode. Abbildung 9B zeigt typische Echokardiographiebilder vor und nach AngII-Gabe. Auf der vertikalen Achse sind die jeweils rotmarkierten Ausmaße von linksventrikulärem Septum (LVS) und linksventrikulärer Hinterwand (LVHW) mit dem dazwischenliegenden Lumen des linken Ventrikels (LVED) zu sehen. Die horizontale Achse stellt den Zeitverlauf mit aufeinanderfolgender Kontraktion (Systole) und Entspannung (Diastole) dar. Bei WT- (Abb. 9B) oder $\Delta N^{\text{loxP-}}$, Cre^{MHC} -Tieren (nicht gezeigt) verursachte AngII, wie beschrieben, eine Zunahme der Wanddicke bei Septum und linksventrikulärer Hinterwand und eine damit einhergehende Verkleinerung des Lumens des linken Ventrikels (Abb. 9B, WT+AngII versus WT basal). Bei ΔN^{MHC} -Mäusen mit herzspezifischer Inhibition von NF- κ B waren diese Effekte ganz klar unterdrückt (Abb. 9B, $\Delta N^{\text{MHC}}+\text{AngII}$ versus ΔN^{MHC} basal). Abbildung 9C zeigt die durchschnittlichen, diastolischen Ausmaße von Septum und Hinterwand nach AngII-Gabe bei Kontroll- und ΔN^{MHC} -Tieren.

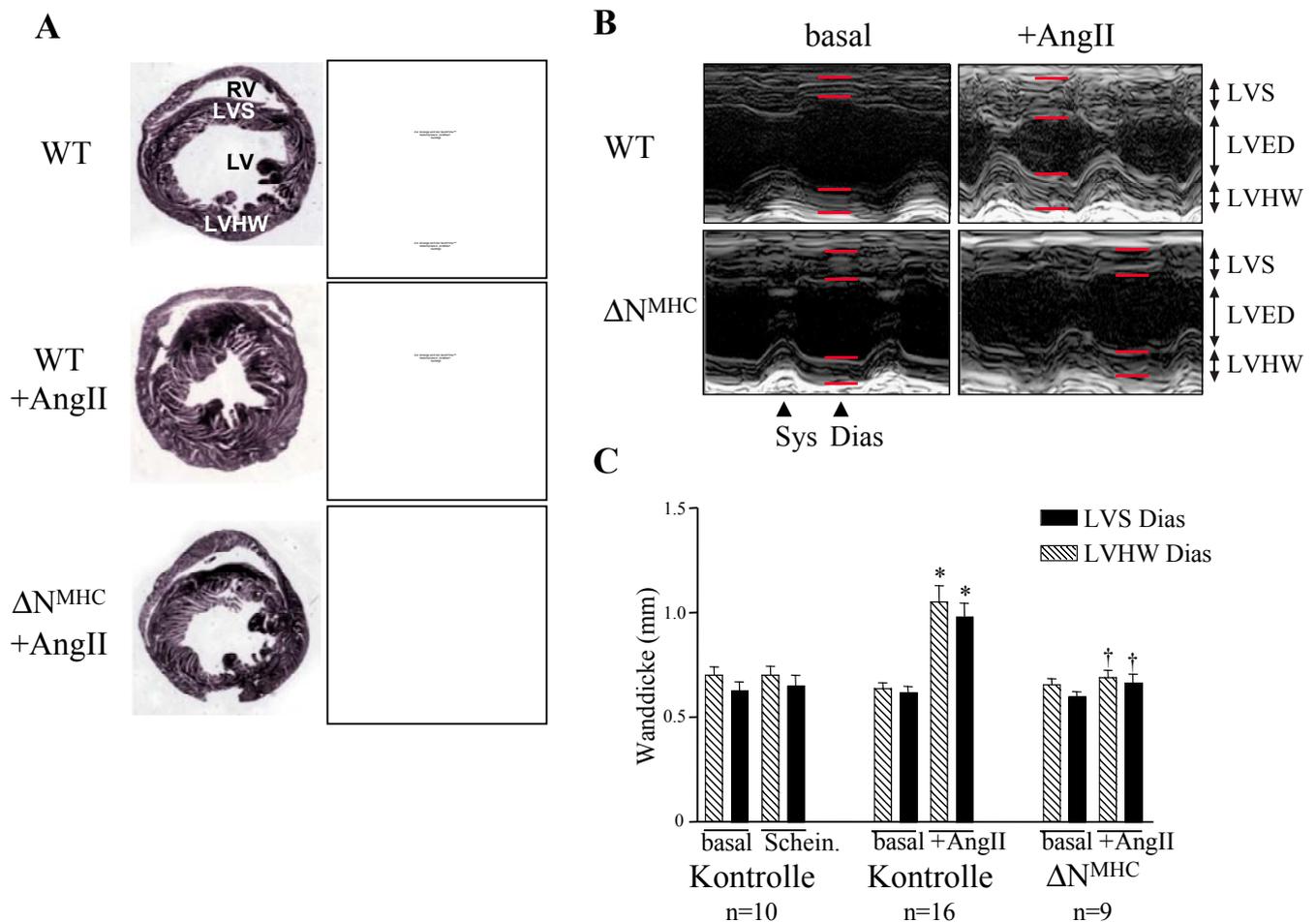


Abb. 9: Die Inhibition von NF- κ B verhindert die AngII-induzierte Hypertrophie *in vivo*.

(A) In ΔN^{MHC} -Mäusen ist die Zunahme der Herzwanddicke und der Kardiomyozytengröße nach AngII-Behandlung vermindert. Links: Querschnitte von H/E-gefärbten Herzen von unbehandelten oder AngII-behandelten (14 Tage) WT- und ΔN^{MHC} -Mäusen. Abkürzungen: s. unten. Rechts: Mit Masson's Trichrome gefärbte Schnitte von Herzen wie bei (A). Die Kardiomyozyten sind rot gefärbt. 20fache Vergrößerung. Die Schnitte und Färbungen wurden von Prof. W. Schneider angefertigt. **(B)** Echokardiographisch erstelltes Bild von Wildtyp (WT)- oder ΔN^{MHC} -Mäusen vor (basal) und nach 14tägiger AngII-Behandlung. Die vertikale Achse des Bildes zeigt die Abmessungen im linken Herzventrikel (s. auch Herzquerschnitt des WT unter (A)). Die horizontale Achse stellt den Zeitverlauf dar. **(C)** Quantifizierung der echokardiographisch bestimmten Wanddicken.

Abkürzungen: Dias: Diastole, LV: Linker Ventrikel, LVED: Linksventrikulärer Durchmesser, LVHW: Linksventrikuläre Hinterwand, LVS: Linksventrikuläres Septum, RV: Rechter Ventrikel, Schein.: Scheinoperation., Sys: Systole. * $p < 0,01$ versus scheinoperierte KT; † $p < 0,05$ versus KT + AngII.

2.2.5 ΔN^{MHC} -Mäuse haben nach AngII-Gabe ein geringeres Verhältnis von Herzgewicht/Tibiallänge im Vergleich zur Kontrollgruppe

Neben histologischen und echokardiographischen Analysen wurde das Herzgewicht als Hypertrophiemaß bestimmt. Üblicherweise wird bei der Maus das Herzgewicht in Bezug zum Körpergewicht oder zur Länge des Schienbeins (Tibia) gesetzt. Bei Kontrollmäusen verursachte die AngII-Gabe erwartungsgemäß eine Erhöhung des absoluten Herzgewichtes und des Verhältnis Herzgewicht/Körpergewicht (Tabelle 3). Bei den AngII-behandelten

ΔN^{MHC} -Mäusen war das absolute Herzgewicht mit dem der scheinoperierten Kontrolle vergleichbar. Im Gegensatz dazu war das Verhältnis Herzgewicht/Körpergewicht wie bei den AngII-behandelten Kontrollen leicht erhöht (Tabelle 3), obwohl bei ΔN^{MHC} -Mäusen nach AngII-Gabe histologisch und echokardiographisch keine Hypertrophie nachweisbar war. Ursache hierfür war das signifikant erhöhte Körpergewicht der Cre^{MHC} -Mäuse innerhalb der Kontrollgruppe, das zu einer Verminderung des Verhältnis Herzgewicht/Körpergewicht führte. Das höhere Körpergewicht der Cre^{MHC} -Mäuse im Vergleich zu den übrigen Mäusen bestand bereits unter basalen Bedingungen (KW (g): Cre^{MHC} (n=5): $29,7 \pm 1,7$; ΔN^{loxP} (n=4) $25,5 \pm 1,0$; WT (n=2): $26,3 \pm 0,5$, ΔN^{MHC} (n=4): $24,0 \pm 0,4$). Da bezüglich der Tibialänge keine Unterschiede zwischen den Kontroll- und den ΔN^{MHC} -Mäusen bestanden (Daten nicht gezeigt), wurde diese zur Normalisierung des Herzgewichtes eingesetzt. In Übereinstimmung mit den histologisch und echokardiographisch bestimmten Ergebnissen zeigten AngII-behandelte ΔN^{MHC} -Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe nach AngII-Gabe eine verringerte Zunahme beim Verhältnis Herzgewicht/Tibialänge (Tabelle 3, HW/Tibialänge).

2.2.6 ΔN^{MHC} -Mäuse entwickeln nach AngII-Behandlung keine Steigerung der Herzfunktion

Neben der Bestimmung der Wanddicken wurde mit Hilfe der Echokardiographie auch die fraktionelle Verkürzung (FV) des Herzens untersucht. Sie stellt ein Maß für die Kontraktionsleistung dar und ist als der prozentuale Anteil des durch die Kontraktion aus dem Ventrikel gepumpten Blutes definiert. Beim Menschen beträgt sie unter Normalbedingungen 70%, da nach der Kontraktion immer ein gewisser Teil des Blutes im Ventrikel verbleibt.

Da hypertrophierte Kardiomyozyten eine erhöhte Anzahl an kontraktilen Einheiten besitzen, ist eine Erhöhung der Pumpleistung zu erwarten. Dieser positive Aspekt der Hypertrophie ist jedoch nur vorübergehend, da sich die Pumpleistung des hypertrophierten Herzens auf lange Sicht durch zunehmenden Verlust von Kardiomyozyten verschlechtert (s. Einleitung).

Die Fraktionelle Verkürzung wurde bei Kontroll- und ΔN^{MHC} -Mäusen nach AngII-Gabe bestimmt (Tabelle 3). Erwartungsgemäß zeigte sich bei Kontrolltieren nach AngII-Gabe eine Erhöhung der Fraktionellen Verkürzung, während sie sich bei gleichbehandelten ΔN^{MHC} -Mäusen nicht von der bei scheinoperierten Kontrolltieren unterschied (Tabelle 3, FV).

	Kontrolle + Schein-OP	Kontrolle + AngII	ΔN^{MHC} + AngII
n =	10	16	9
LVS d (mm)			
basal	0.63±0.04	0.62±0.03	0.60±0.02
14 Tage post OP	0.65±0.05	0.98±0.06 *	0.67±0.04 †
LVHW d (mm)			
basal	0.7±0.04	0.64±0.03	0.66±0.03
14 Tage post OP	0.7±0.05	1.05±0.08 *	0.69±0.04 †
LVED d (mm)			
basal	4.0±0.13	3.9±0.15	3.9±0.17
14 Tage post OP	3.8±0.18	3.1±0.19 *	3.74±0.12 †
FV (%)			
basal	40±2.4	39.4±1.6	38.1±1.7
14 Tage post OP	43.1±1.3	51.3±2.8 *	41.1±2.7 †
HW (mg)	119±4.0	143±6.2*	123±3.5†
KW (g)	29.3±0.99	27.3±0.8	23.9±0.7*†
HW/KW (mg/g)	4.1±0.07	5.2±0.12*	5.1±0.15
HW/Tibia (mg/mm)	6.0±0.18	7.4±0.31*	6.4±0.14 †

Tabelle 3: ΔN^{MHC} -Mäuse entwickeln nach AngII-Stimulation keine Hypertrophie. Echokardiographisch bestimmte Parameter und Herzgewicht. Kontrolltiere waren WT-, ΔN^{loxP} - und Cre^{MHC} -Mäuse. Abkürzungen: FV: Fraktionelle Verkürzung, HW: Herzgewicht, KW: Körpergewicht, LVED d: linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser, LVHW d: linksventrikuläre Hinterwand während der Diastole, LVS d: linksventrikuläres Septum während der Diastole, n: Anzahl der Tiere, OP: Operation, Tibia: Tibialänge. * $p < 0,01$ versus scheinoperierte Kontrollen; † $p < 0,05$ versus Kontrolle + AngII.

2.2.7 In ΔN^{MHC} -Mäusen ist auch die Isoproterenol-induzierte Hypertrophie inhibiert

Da Inhibitoren des β -adrenergen Systems beim Menschen zur Behandlung von Herzinsuffizienz eingesetzt werden, wurde alternativ zu AngII der β -adrenerge Agonist Isoproterenol (60mg/kg/Tag, 7 Tage) zur Induktion der Hypertrophie im Tiermodell eingesetzt.

Die antagonistische Wirkung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ bezüglich der Hypertrophie traf auch nach β -adrenerger Stimulation mittels Isoproterenol (Tabelle 4) zu. Auch hier war die Iso-induzierte Zunahme der Wanddicken von Septum und linksventrikulärer Hinterwand bei ΔN^{MHC} -Mäusen inhibiert (Tabelle 4, LVS d, LVHW d). Erwartungsgemäß verursachte Isoproterenol bei den Kontrolltieren eine Zunahme des Verhältnis Herzgewicht/Körpergewicht (Tabelle 4 HW/KW). Bei den Iso-behandelten ΔN^{MHC} -Mäusen war dieses Verhältnis nur tendenziell geringer. Das Körpergewicht Iso-behandelter ΔN^{MHC} -Mäuse unterschied sich nicht wesentlich von dem der gleichbehandelten Kontrollgruppe. Nach Normalisierung des Herzgewichtes zur Tibiallänge ergab sich für die Iso-infundierten ΔN^{MHC} -Mäusen eine signifikante Reduktion im Vergleich zu den gleichbehandelten Kontrolltieren (Tabelle 4, HW/Tibiallänge). Gleichzeitig war das Verhältnis HW/Tibia bei Iso-behandelten ΔN^{MHC} -Mäusen höher als bei scheinoperierten Kontrollen. Da bei dieser Serie eine starke Streuung der absoluten Herzgewichte auftrat, ist eine Erhöhung der Versuchstierzahlen nötig, um Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen besser dokumentieren zu können.

In Bezug auf die Fraktionelle Verkürzung führte Iso ähnlich wie AngII bei Kontrollmäusen zu einer deutlichen Erhöhung (Tabelle 4, FV, Kontrolle+Iso versus Kontrolle Schein-OP). Bei gleichbehandelten ΔN^{MHC} -Mäusen fiel diese Zunahme signifikant geringer aus (ΔN^{MHC} +Iso versus Kontrolle +Iso). Trotzdem war FV bei ΔN^{MHC} -Mäusen nach Iso-Gabe höher als bei den scheinoperierten Kontrollen (Tabelle 4, FV ΔN^{MHC} +Iso versus Kontrolle Schein-OP). Zusammenfassend verhinderte die herzspezifische Inhibition von NF- κ B eine Zunahme der Wanddicken sowohl nach Stimulation mit AngII als auch mit Iso, während die Steigerung der Kontraktilität im ersten Fall vollständig und bei Iso teilweise inhibiert war.

	Kontrolle + Schein-OP	Kontrolle + Iso	ΔN^{MHC} + Iso
n =	4	6	7
LVS d (mm)			
basal	0.65±0.03	0.63±0.02	0.63±0.04
7 Tage post OP	0.75±0.03	0.93±0.03	0.74±0.02 [†]
LVPW d (mm)			
basal	0.68±0.05	0.67±0.02	0.64±0.04
7 Tage post OP	0.75±0.03	0.92±0.05	0.79±0.03 [†]
LVED d (mm)			
basal	3.95±0.13	3.55±0.14	3.36±0.21
7 Tage post OP	3.55±0.17	3.12±0.20	3.39±0.18
FV (%)			
basal	34.5±1.5	35.0±2.3	34.1±2.5
7 Tage post OP	39.2±3.3	59.7±2.8	50.3±2.7 [†]
HW (mg)	112±3.6	126±8.0	119±8.2
KW (g)	27.6±2.0	27.8±1.7	26.7±0.9
HW/KW (mg/g)	3.8±0.26	4.9±0.08*	4.5±0.1
HW/Tibia (mg/mm)	5.9±0.07	7.4±0.30	6.5±0.21 [†]

Tabelle 4: Reduktion Isoproterenol (Iso)-induzierter Hypertrophie bei ΔN^{MHC} -Mäusen. Echokardiographisch bestimmte Parameter und Herzgewicht. Kontrolltiere waren WT-, ΔN^{loxP} - und Cre^{MHC} -Mäuse. Abkürzungen wie bei Tabelle 3. * $p < 0,01$ versus scheinoperierte Kontrollen; [†] $p < 0,05$ versus Kontrolle + Iso.

2.2.8 Die Inhibition von NF- κ B *in vivo* verhindert teilweise die Expression von Hypertrophiemarkern

Im Zuge der Hypertrophie kommt es zu einer verstärkten Expression fötaler Gene, deren Produkte als molekulare Marker der Herzvergrößerung dienen. Mittels realtime RT-PCR wurden die mRNA-Mengen nicht-kontraktiler (ANP, BNP, siehe Einleitung) sowie kontraktiler Proteine (MHC, sk-Aktin) in den Herzen von Kontroll- und ΔN^{MHC} -Tieren nach AngII-Gabe quantifiziert (Abb. 10). Zusätzlich wurde die Expression von TGF- β untersucht.

AngII induziert bei Kardiomyozyten und Fibroblasten die Expression dieses Wachstumsfaktors (65,151). *In vivo* spielt TGF- β eine Rolle bei der Induktion von Hypertrophie nach AngII-Verabreichung (152).

Abb. 10 zeigt die mRNA-Expression in Herzen von AngII-behandelten Kontroll (ein WT-, zwei Cre^{MHC}-, ein ΔN^{loxP} -Tier)- bzw. ΔN^{MHC} -Mäusen nach Normalisierung auf scheinoperierte Kontrollmäuse (ein WT-, zwei Cre^{MHC}-, ein ΔN^{loxP} -Tier). AngII induzierte bei Kontrollmäusen eine verstärkte Expression von ANP, BNP, β -MHC und α -sk Aktin. Hingegen hatte AngII keinen Effekt auf die Expression von α -MHC und TGF- β . Diese Gene waren auch bei AngII-behandelten ΔN^{MHC} -Mäusen nicht reguliert. Ähnlich wie bei Kontrollmäusen induzierte AngII bei ΔN^{MHC} -Mäusen eine verstärkte Expression von BNP und α -sk Aktin. Im Gegensatz dazu war die Menge an ANP- und besonders β -MHC-mRNA im Vergleich zur AngII-behandelten Kontrollgruppe signifikant verringert. Innerhalb der unbehandelten oder AngII-behandelten Kontrollgruppe bestanden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Expression der verschiedenen Gene (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt verursachte AngII bei Kontrollmäusen die verstärkte Expression typischer nicht-kontraktiler Hypertrophiemarker sowie fötaler Isoformen kontraktiler Proteine. Hingegen wirkte die Kardiomyozyten-spezifische Inhibition von NF- κ B der Expression sowohl von kontraktilen als auch nicht-kontraktilen Hypertrophiemarkern partiell entgegen.

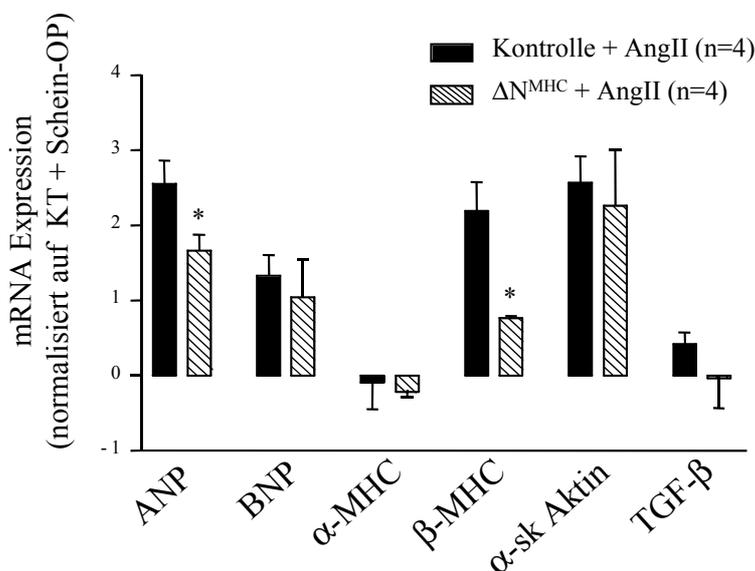


Abb. 10: In Herzen von AngII-behandelten ΔN^{MHC} -Mäusen ist die Expression von Hypertrophiemarkern partiell reduziert. Die Quantifizierung der mRNA-Expression von Hypertrophiemarkern erfolgte mit Gesamt-RNA aus Herzen von unbehandelten oder AngII-behandelten (14 Tage) Kontroll- oder ΔN^{MHC} -Mäusen mittels realtime RT-PCR. Die Graphik zeigt die Ergebnisse von AngII-behandelten Kontroll(ΔN^{loxP} , Cre^{MHC}, WT)- oder ΔN^{MHC} -Mäusen nach Normalisierung auf scheinoperierte Kontrollmäuse (ΔN^{loxP} , Cre^{MHC}, WT). Abkürzungen: ANP: atrial

natriuretic peptide, BNP: brain natriuretic peptide, MHC: myosin heavy chain, sk actin: skeletal actin, TGF: transforming growth factor, Schein-OP: Scheinoperiert, vs.: versus. * $p < 0.05$ vs. AngII-behandelte Kontrollen.

2.2.9 Die Inhibition von NF- κ B *in vivo* bewirkt keine Steigerung der Apoptoserate bei Kardiomyozyten unter basalen Bedingungen oder kurzzeitigem Stress

NF- κ B wird in vielen Geweben eine Schutzfunktion vor Apoptose zugeschrieben. Bei neonatalen Kardiomyozyten *in vitro* führt die Stimulation mit TNF- α bei gleichzeitiger Inhibition von NF- κ B zu gesteigerter Apoptose (136). *In vivo* führt die herzspezifische Expression von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ nach Infarkt durch Verschluss eines Herzkranzgefäßes zu vermehrter Apoptose (139). Deshalb wurde getestet, ob Hypertrophie-induzierende Stressbedingungen zu einer gesteigerten Apoptose von Kardiomyozyten bei $\Delta\text{N}^{\text{MHC}}$ -Mäusen führen.

Zum direkten Nachweis von Apoptose wurde der TUNEL-Test durchgeführt, mit dem für die Apoptose charakteristische Strangbrüche in der DNA mittels Immunfluoreszenz detektiert werden. Als Positivkontrolle wurden die Strangbrüche durch nachträgliche Behandlung eines Herzschnittes mit DNase I induziert, was zu der erwarteten Grünfärbung der Kerne führte (Abb. 11A, Kontrolle + DNase I). Hingegen war in den Herzen von AngII-infundierten $\Delta\text{N}^{\text{MHC}}$ -Mäusen keine gesteigerte Apoptose nachweisbar. Dasselbe galt für die AngII-behandelte Kontrollgruppe (WT, Cre^{MHC} , $\Delta\text{N}^{\text{loxP}}$) wie beispielhaft für eine WT-Maus gezeigt ist (Abb. 11 A).

Ein zunehmender Verlust von Kardiomyozyten aufgrund von Apoptose hätte zu einer Verdünnung der Herzwände und zu einer Vergrößerung des Durchmessers des linken Ventrikels (Dilatation) führen müssen. Ausserdem wäre ein Abfall der Pumpleistung des Herzens zu erwarten. Diese Parameter wurden durch Ultraschalluntersuchungen bestimmt. $\Delta\text{N}^{\text{MHC}}$ -Mäuse zeigten im Vergleich zu scheinoperierten Kontrollmäusen sowohl basal als auch nach AngII-Behandlung keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Dimensionen von Herzwänden und Lumen des linken Ventrikels (Tabelle 3, LVS d, LVHW d, LVED d). Die fraktionelle Verkürzung als Maß für die Kontraktionsleistung war bei $\Delta\text{N}^{\text{MHC}}$ -Mäusen im Vergleich zu scheinoperierten Kontrollmäusen ebenfalls unverändert (Tabelle 3, FV). Auch bei Iso-behandelten $\Delta\text{N}^{\text{MHC}}$ -Mäusen fand keine Verdünnung der Herzwände oder eine Vergrößerung des Ventrikelvolumens im Vergleich zu scheinoperierten Kontrollmäusen statt (Tabelle 4, LVS d, LVHW d, LVED d). Zusätzlich war kein Abfall der Herzleistung zu beobachten (Tabelle 4, FV). Insgesamt führt die Inhibition von NF- κ B bei Kardiomyozyten

in vivo weder unter Basalbedingungen noch unter kurzzeitiger Stressbelastung zu einem nachweisbaren Verlust von Kardiomyozyten.

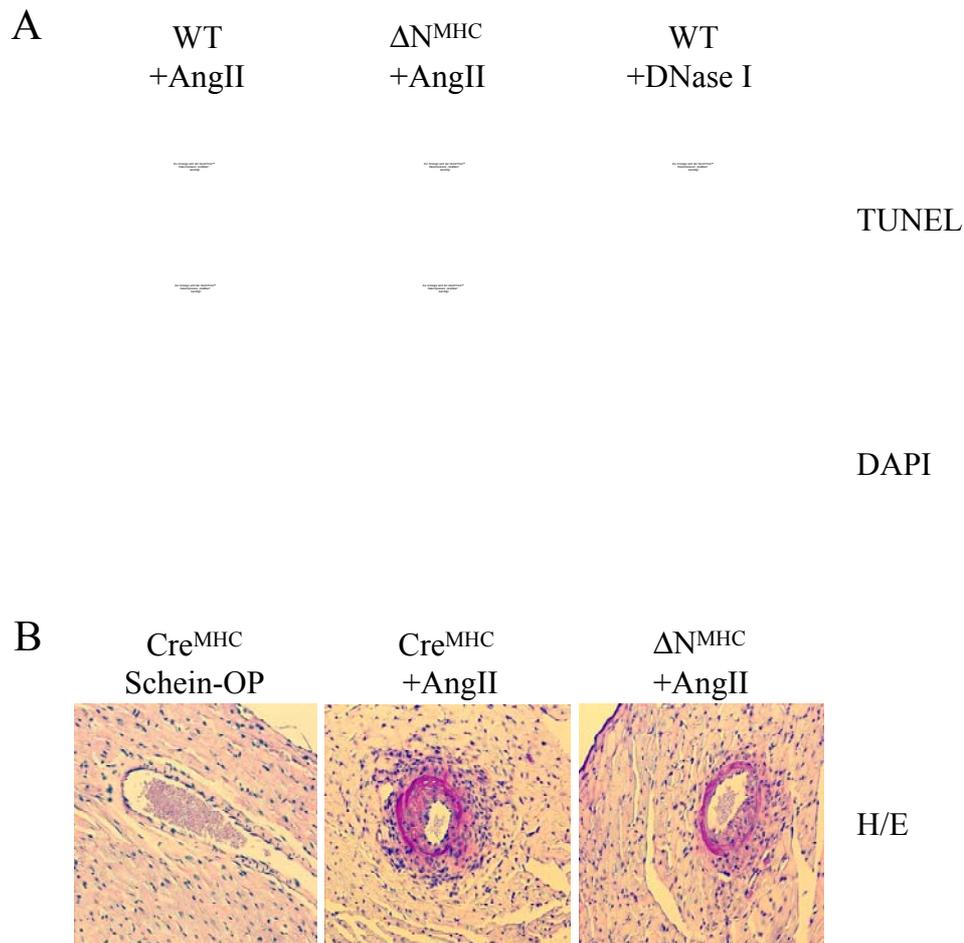


Abb. 11: Die Apoptoserate und die AngII-induzierte perivaskuläre Entzündung ist in Herzen von ΔN^{MHC} -Mäusen unverändert.

(A) In AngII-behandelten ΔN^{MHC} -Mäusen tritt keine Steigerung der Apoptose auf. TUNEL-Test zum Nachweis von apoptotischen DNA-Strangbrüchen mit repräsentativen Herzschnitten von einer AngII-behandelten WT- und einer gleichbehandelten ΔN^{MHC} -Maus (oben). Als Positivkontrolle diente ein Gewebsschnitt, der vor dem TUNEL-Test mit DNaseI behandelt worden war. Die Zerstückelung der DNA durch die DNase I wird als Grünfärbung der Kerne detektiert. Korrespondierende DAPI-Färbung der Kerne für das linke bzw. mittlere Bild (unten). 20fache Vergrößerung. Die Schnitte wurden von Prof. W. Schneider angefertigt. **(B) In ΔN^{MHC} -Mäusen ist die AngII-induzierte perivaskuläre Entzündung nicht reduziert.** Hematoxylin/Eosin (H/E)-gefärbte Schnitte von Herzen scheinoperierter oder AngII-behandelter Mäuse wie angegeben. 20fache Vergrößerung eines Gefäßquerschnittes. Die perivaskuläre Entzündung äußert sich durch Infiltration inflammatorischer Zellen. Die Schnitte und H/E-Färbung wurden von Prof. W. Schneider angefertigt.

2.2.10 Die AngII-induzierte perivaskuläre Entzündung ist in ΔN^{MHC} -Mäusen nicht verändert

Eine bekannte Wirkung von AngII ist die Rekrutierung von inflammatorischen Zellen in verschiedenen Geweben. Dies geschieht sowohl durch direkte Aktivierung der inflammatorischen Zellen als auch durch Regulation der Expression von Adhäsionsmolekülen

und Chemokinen von ansässigen Zellen (als Review s. (153)). Auch im Herzmuskel bewirkt AngII die Infiltration von inflammatorischen Zellen. Andererseits kontrolliert NF- κ B u. a. die Expression von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen. Deshalb wurden bei ΔN^{MHC} -Mäusen untersucht, ob die Inhibition von NF- κ B in Kardiomyozyten einen Einfluß auf die AngII-induzierte, perivaskuläre Infiltration von proinflammatorischen Zellen hat. Dazu wurden Herzschnitte mit Hematoxylin/Eosin (H/E) gefärbt. Wie erwartet konnten in mit AngII behandelten Kontrolltieren (WT, Cre^{MHC}, ΔN^{loxP}) lokale, perivaskuläre Entzündungsstellen mit infiltrierten Zellen nachgewiesen werden, wie beispielhaft für eine Cre^{MHC}-Maus gezeigt ist (Abb. 11B). In AngII-infundierten ΔN^{MHC} -Mäusen war keine signifikante Reduktion der Inflammation zu beobachten (Abb. 11B). Da die Entzündungen lokal begrenzt sind, kann die Größe je nach Schnittebene variieren. Allgemein konnte jedoch kein Trend zu einer Reduktion bei ΔN^{MHC} -Mäusen festgestellt werden.

Demnach scheint NF- κ B in Kardiomyozyten keine tragende Rolle bei der AngII-induzierten Gefäßentzündung zu spielen.

2.2.11 Die Wirkung der Kardiomyozyten-spezifischen Inhibition von NF- κ B bei Hypertrophie nach Langzeitstress

Mit Infusionszeiten von 14 Tagen für AngII bzw. 7 Tage für Iso wurden in den zuvor beschriebenen Experimenten kurzzeitige Stimuli zur Induktion der Hypertrophie im Mausmodell verwendet. In Nachfolgeexperimenten wurde untersucht, ob die Inhibition von NF- κ B auch die durch Langzeitstress-induzierte Hypertrophie und den dadurch hervorgerufenen Übergang in die Herzinsuffizienz beeinflusst.

Zur Induktion von Langzeitstress wurde die partielle Aortenligatur (transaortic constriction, TAC) angewandt (Abb. 12A). Bei dieser Methode wird die Aorta zwischen dem Truncus brachiocephalicus (Aortenstamm, der sich in die rechte Vorderbeinarterie und in die rechte Halsschlagader teilt) und der linken Halsschlagader durch eine Ligatur partiell verschlossen (Abb. 12A). Durch die Verengung wird der Blutausschlag des linken Ventrikels behindert, was zu einer Drucküberbelastung desselben führt. TAC- und scheinoperierte Tiere wurden über einen Zeitraum von 8 Wochen beobachtet.

Erwartungsgemäß zeigten Kontrolltiere nach 8 Wochen TAC eine Zunahme des Verhältnis Herzgewicht/Tibiallänge (Abb. 12B, KT+TAC). Tendenziell fiel diese Zunahme bei den ΔN^{MHC} -Mäusen mit TAC geringer aus (Abb. 12B). Zusätzliche Versuche sind nötig, um diesen Trend zu bestätigen.

Mit der Hilfe der Echokardiographie wurden die Wanddicken von Linksventrikulärem

Septum (LVS) und Linksventrikulärer Hinterwand (LVHW) nach 4 und 8 Wochen untersucht (Abb. 12 C und 12 D). Bei den Kontrolltieren induzierte TAC ein Dickenwachstum des Septums nach 4 und 8 Wochen (Abb. 12 C, KT+TAC). In dieser Gruppe war die linksventrikuläre Hinterwand nach 4 Wochen signifikant und nach 8 Wochen tendenziell verdickt (Abb. 11D, KT+TAC). Im Gegensatz dazu konnte bei den ΔN^{MHC} -Mäusen zu keinem Zeitpunkt eine Verdickung von Septum oder Hinterwand festgestellt werden (Abb. 12 C und 11 D, ΔN^{MHC} +TAC).

Als Zeichen einer beginnenden Herzinsuffizienz tendierten die TAC-behandelten Kontrolltiere nach 8 Wochen zu vergrößerten Ventrikeln (Linksventrikulärer Durchmesser , Diastole (LVD d): Kontrolltiere, scheinoperiert: $4,22 \pm 0,17$ mm, n=7; Kontrolltiere + TAC: $4,97 \pm 0,37$ mm, n=5,). Bei den TAC behandelten ΔN^{MHC} -Tieren betrug der LVD d nach 8 Wochen $4,73 \pm 0,28$ mm (n=3).

Diese Versuche zeigen, dass die Kardiomyozyten-spezifische Inhibition von NF- κ B auch die Hypertrophie nach Langzeitstress verhindern kann. Weitere Experimente mit einer größeren Anzahl von Tieren und einer längeren Versuchsdauer sind nötig, um klarzustellen, ob die herzspezifische Inhibition von NF- κ B nicht nur die Hypertrophie, sondern auch die Herzinsuffizienz verhindert.

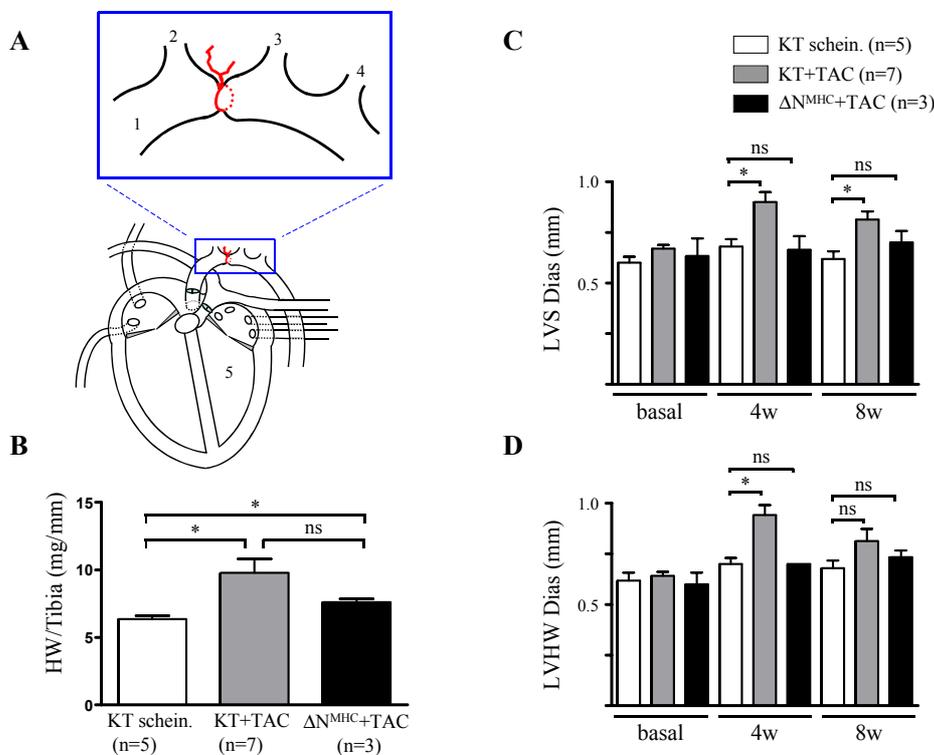


Abb. 12: In Herzen von ΔN^{MHC} -Mäusen findet nach langzeitiger Drucküberbelastung des linken Ventrikels kein Dickenwachstum von Septum und Hinterwand statt.

(A) Schematische Darstellung der partiellen Aortenligatur (TAC). Die Aorta (1) wurde im Bereich zwischen Truncus brachiocephalicus (2) und linker Halsschlagader (3) durch eine Ligation partiell verschlossen ((4): Linke Unter-Schlüsselbeinschlagader). Dadurch ist der Blutauswurf des linken Ventrikels (5) behindert, und es kommt zu einer Drucküberbelastung. Die partielle Aortenligatur wurde von R. van der Nagel durchgeführt. **(B) Die TAC-induzierte Zunahme des Herzgewichtes (HW) bei Kontrolltieren ist bei ΔN^{MHC} Mäusen tendenziell geringer.** Die Herzgewichte von Kontroll (KT: ΔN^{loxP} , Cre^{MHC} , WT)- oder ΔN^{MHC} -Mäusen wurden nach 8 Wochen TAC auf die Tibialänge (Tibia) normalisiert. Scheinoperiert: schein. **(C) und (D) TAC induziert in ΔN^{MHC} -Mäusen keine Zunahme der Wanddicken von linksventrikulärem Septum (LVS) und linksventrikulärer Hinterwand (LVHW).** Mittels Echokardiographie wurden die Wanddicken von Septum und Hinterwand vor (basal) bzw. vier und acht Wochen (4w, 8w) nach der TAC-Operation bei Kontroll (KT: ΔN^{loxP} , Cre^{MHC} , WT)- und ΔN^{MHC} -Mäusen bestimmt. Weitere Abkürzungen: Dias: Diastole, ns: nicht signifikant, * $p < 0.05$.

2.3. Versuche mit isolierten Kardiomyozyten in Kultur

2.3.1 *In vitro* induziert AngII direkt die Bindungsaktivität von NF- κ B-p65 und p50 an die DNA

Um zu klären, ob AngII NF- κ B in Kardiomyozyten direkt aktiviert, wurden Experimente mit isolierten Kardiomyozyten aus adulten Ratten unternommen. Die Isolation von Mauskardiomyozyten gelang erst zu einem späteren Zeitpunkt.

Isolierte Rattenkardiomyozyten wurden in einer Zeitverlaufstudie bis zu 60 min mit 100 nM AngII, oder mit TNF- α (30 min, 10 ng/ml) als Positivkontrolle, inkubiert. Mit den nukleären Extrakten wurde ein EMSA für NF- κ B oder für Oct-1 durchgeführt (Abb. 13A). Oct-1 ist ein konstitutiv bindender Transkriptionsfaktor und diente als Ladungskontrolle. AngII steigerte bereits nach 15 min die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B, die nach 30 min ihr Maximum erreichte und bis mindestens eine Stunde konstant blieb (Abb. 13 A). Im Vergleich zu TNF- α induzierte AngII die Bindung von NF- κ B an die DNA nur schwach, aber reproduzierbar (Abb.13 A). Im Folgeversuch wurden verschiedene AngII-Konzentrationen bei einer Inkubationszeit von 30 min getestet (Abb.13 B). Bereits 10 nM führten zur Aktivierung von NF- κ B, wobei der maximale Effekt bei 100 nM eintrat und auch durch höhere Konzentrationen nicht mehr gesteigert werden konnte (Abb. 13 B). Eine AngII-Konzentration von 100 nM gilt als physiologisch und wurde für die Folgeversuche mit kultivierten Kardiomyozyten eingesetzt. *In vivo* sind bei Kardiomyozyten lokal höhere Konzentrationen wahrscheinlich, da neben dem systemischen auch ein kardiales Renin-AngII-System besteht, innerhalb dessen Kardiomyozyten selbst AngII synthetisieren und sekretieren können (s. Einleitung).

Zur Identifizierung der durch AngII induzierten NF- κ B-Untereinheiten wurden Supershift Experimente durchgeführt. Dazu wurden die nukleären Extrakte vor der Inkubation mit der

radioaktiv markierten DNA-Sonde mit einem gegen die verschiedenen Mitglieder der NF- κ B-Familie gerichteten Antikörper inkubiert. Die Bindung des Antikörpers an das Protein vergrößert entweder den Komplex, der an die DNA bindet, was die Wanderung im Gel verlangsamt oder er verhindert die Bindung. Ersteres war für NF- κ B-p50 der Fall, letzteres für NF- κ B-p65 (Abb. 13 C). Andere Dimere (c-rel/RelB) wurden nicht durch AngII induziert. Folglich kommt es in Kardiomyozyten nach Stimulation mit AngII nur zur Freisetzung von p50/p65 Heterodimeren.

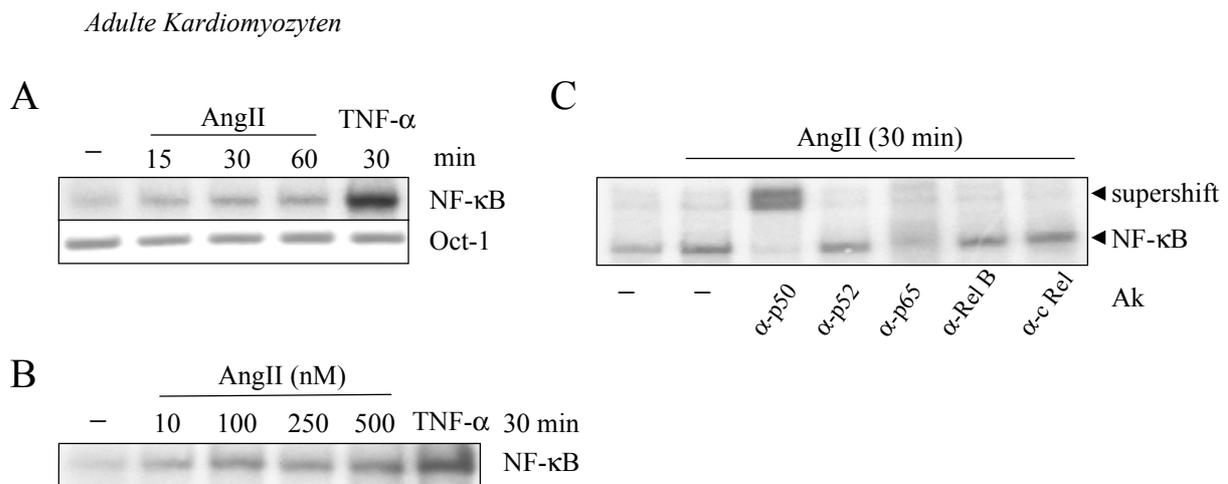


Abb. 13: AngII aktiviert NF- κ B in adulten Rattenkardiomyozyten. (A) **AngII induziert eine schnelle Steigerung der NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität.** Isolierte, adulte Rattenkardiomyozyten wurden mit AngII (100 nM) oder TNF- α (10 ng/ml), wie angegeben, stimuliert. Ein EMSA wurde als Nachweis für die NF- κ B-DNA-Bindung durchgeführt. Der EMSA für Oct-1 diente als Ladungskontrolle. (B) **Physiologische Konzentrationen von AngII sind für die Aktivierung von NF- κ B ausreichend.** Isolierte, adulte Kardiomyozyten wurden für 30 min mit unterschiedlichen Konzentrationen von AngII oder TNF- α (10 ng/ml) stimuliert und die Aktivierung von NF- κ B im EMSA nachgewiesen. (C) **AngII-induzierte NF- κ B-Komplexe beinhalten NF- κ B-p65 und NF- κ B-p50.** Supershift-Experiment (EMSA) von AngII-stimulierten (100 nM, 30 min) adulten Kardiomyozyten nach Präinkubation mit den jeweiligen Antikörpern. Die Bindung der Antikörper (Ak: α -p65, α -p50 etc.) an NF- κ B verhinderte entweder dessen Bindung an die DNA (α -p65) oder verlangsamte die Wanderung bei der Elektrophorese (α -p50, supershift).

2.3.2 Bekannte Hypertrophiestimuli wirken unterschiedlich auf die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B in adulten Kardiomyozyten

Neben AngII wurden weitere in der Literatur beschriebene Hypertrophiestimuli, nämlich fötales Kälberserum (FCS) und der α 1-adrenerge Agonist Phenylephrin (PE) bezüglich ihrer Wirkung auf die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B getestet. Kulturen adulter Kardiomyozyten kommen im Gegensatz zu anderen Zellen ohne FCS aus, so dass ein Serumentzug vor der Stimulation nicht notwendig war. FCS steigerte die Bindungsaktivität

von NF- κ B an die DNA in Kardiomyozyten mit ähnlicher Intensität und Kinetik wie AngII (Abb. 14 A versus 13 A).

Den MAP-Kinasen ist in der Literatur z.T. eine wichtige Rolle bei der Hypertrophie zugeschrieben worden (s. Einleitung). Ihre Aktivierung wird durch Phosphorylierung vermittelt. Während AngII keinen Effekt auf die Phosphorylierung der MAP-Kinasen p42 und p 44 (=ERK) hatte (Abb. 15 B), induzierte FCS eine starke und anhaltende Aktivierung beider Kinasen (Abb. 14 A, 15 B). Die MAPKs wurden in ähnlicher Weise durch Phenylephrin aktiviert, während dieser Agonist bei adulten Kardiomyozyten keine erhöhte DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B verursachte (Abb. 14 B). Im Gegensatz dazu bewirkte Phenylephrin in Kulturen von neonatalen Kardiomyozyten eine gesteigerte NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität (Abb. 14 C). In neonatalen Kardiomyozyten ist die Aktivierung von NF- κ B durch Phenylephrin bereits beschrieben worden (140).

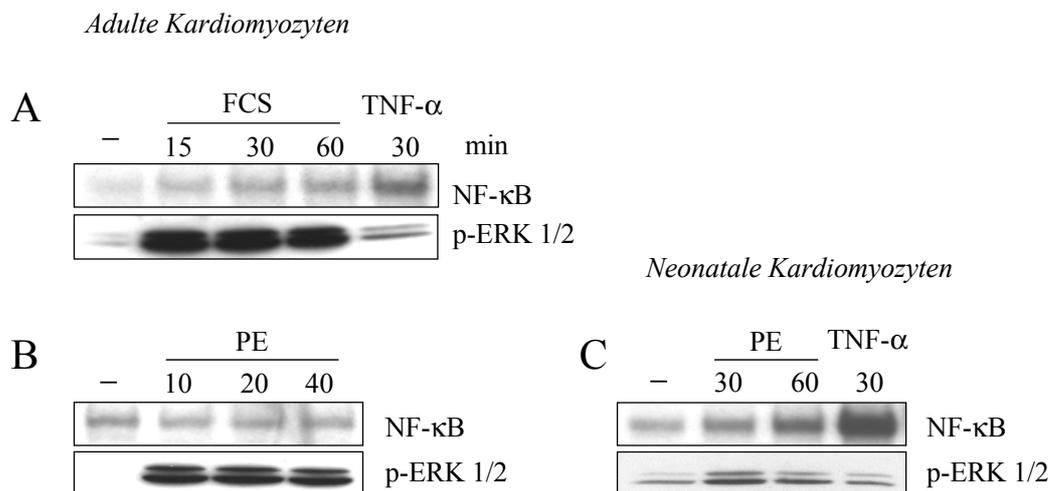


Abb. 14: In adulten Rattenkardiomyozyten *in vitro* steigert FCS, nicht jedoch Phenylephrin (PE) die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B. (A) FCS aktiviert in isolierten, adulten Kardiomyozyten NF- κ B und MAP-Kinasen ERK. Adulte Kardiomyozyten wurden wie angegeben mit FCS (10%) oder TNF- α (10 ng/ml) stimuliert. Mit den Extrakten wurden ein EMSA bzw. ein Immunoblot gegen phosphorierte ERK (p-ERK) durchgeführt. (B) Phenylephrin (PE) aktiviert in adulten Kardiomyozyten ERK, nicht jedoch NF- κ B. Kardiomyozyten wurden mit PE (50 μ M) wie angegeben stimuliert. Gezeigt sind der EMSA für NF- κ B und der Immunoblot gegen phosphorylierte ERK (p-ERK). (C) In neonatalen Kardiomyozyten *in vitro* induziert PE eine Steigerung der DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B. Neonatale Kardiomyozyten wurden wie angegeben mit PE (50 μ M) stimuliert und mit den Extrakten ein EMSA durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass AngII in physiologischen Konzentrationen eine moderate NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität von p50/p65 Heterodimeren induziert. Der prohypertrophisch wirkende MAPK-Signalweg wird durch AngII nicht angeschaltet. Hingegen werden durch FCS sowohl NF- κ B als auch die MAPKs aktiviert. Dies ist zu erwarten, da das Serum eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren enthält. Hingegen induziert PE

in adulten Kardiomyozyten nur die MAPKs, nicht aber NF- κ B. Der Transkriptionsfaktor wird jedoch in neonatalen Kardiomyozyten durch PE aktiviert. Dies deutet auf wichtige Unterschiede zwischen adulten und neonatalen Kardiomyozyten (Tabelle 5).

Hypertrophiestimulus	Adulte Kardiomyozyten		Neonatale Kardiomyozyten	
	NF- κ B	ERK 1/2	NF- κ B	ERK 1/2
AngII	+	—	+ ¹⁾	+ ²⁾
FCS	+	+	n.b.	+ ³⁾
PE	—	+	+	+

Tabelle 5: Die differentielle Regulation von NF- κ B und MAPKs durch verschiedene Hypertrophiestimuli in adulten und neonatalen Kardiomyozyten. ¹⁾ Daten nicht gezeigt, ²⁾ gezeigt durch (154), ³⁾ gezeigt durch (155), +: Aktivierung, -: kein Effekt, n.b.: nicht bestimmt

2.3.3 Prohypertrophische Zytokine der IL-6 Familie steigern die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B *in vitro*

Da AngII die Bindung von NF- κ B an die DNA in Kardiomyozyten nur moderat induzierte, wurde getestet, ob AngII NF- κ B auch über einen indirekten Mechanismus aktivieren kann. Aus der Literatur ist bekannt, dass Ang bei Fibroblasten aus dem Herzen die Expression von Zytokinen der Interleukin (IL)-6 Familie (IL-6, Cardiotrophin (CT)-1, leukemia inhibitory faktor (LIF)) steigert, und diese Zytokine zu AngII-induzierter Hypertrophie beitragen (66). Die AngII-induzierte IL-6 Expression in Fibroblasten wird durch die MAPKs und den Transkriptionsfaktor CREB, nicht jedoch durch NF- κ B vermittelt (156). Diese zuletzt genannten Ergebnisse konnten in Versuchen mit aus adulten Rattenherzen isolierten Nichtmyozyten bestätigt werden (Abb. 15A). AngII bewirkte in Nichtmyozyten eine schnelle, deutliche Phosphorylierung sowohl der MAPKs ERK1 und ERK2 als auch des Transkriptionsfaktors CREB, die jeweils mindestens 45 min anhielt (Abb. 15 A). Hingegen wurde die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B durch AngII in Nichtmyozyten nicht gesteigert. In Folgeversuchen wurde getestet, ob Mitglieder der IL-6-Zytokine-Familie NF- κ B in Kardiomyozyten aktivieren können. Tatsächlich steigerten IL-6, CT-1 oder LIF nach 30 Minuten die Bindungsaktivität von NF- κ B an die DNA in ähnlichem Ausmaß wie AngII (Abb. 15 B). Kombinationen der Zytokine führten teilweise zu einer Verstärkung des

Effektes. Die MAPKs ERK1 und ERK2 wurden in Kardiomyozyten nur durch LIF aktiviert, allerdings in geringerem Ausmaß als nach Stimulation mit PE oder FCS (Abb. 15 B).

Es lässt sich festhalten, dass AngII NF- κ B nicht nur direkt aktiviert, sondern auch indirekt durch Mitglieder der IL-6 Zytokine, deren Expression in kardialen Fibroblasten durch AngII gesteigert wird. Weiterhin demonstrieren die *in vitro* Versuche mit Kardiomyozyten und Nichtmyozyten die hohe Reinheit der Kardiomyozytenkulturen, da AngII nur bei den Nichtmyozyten zu einer Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 führte (Abb. 15 A und B).

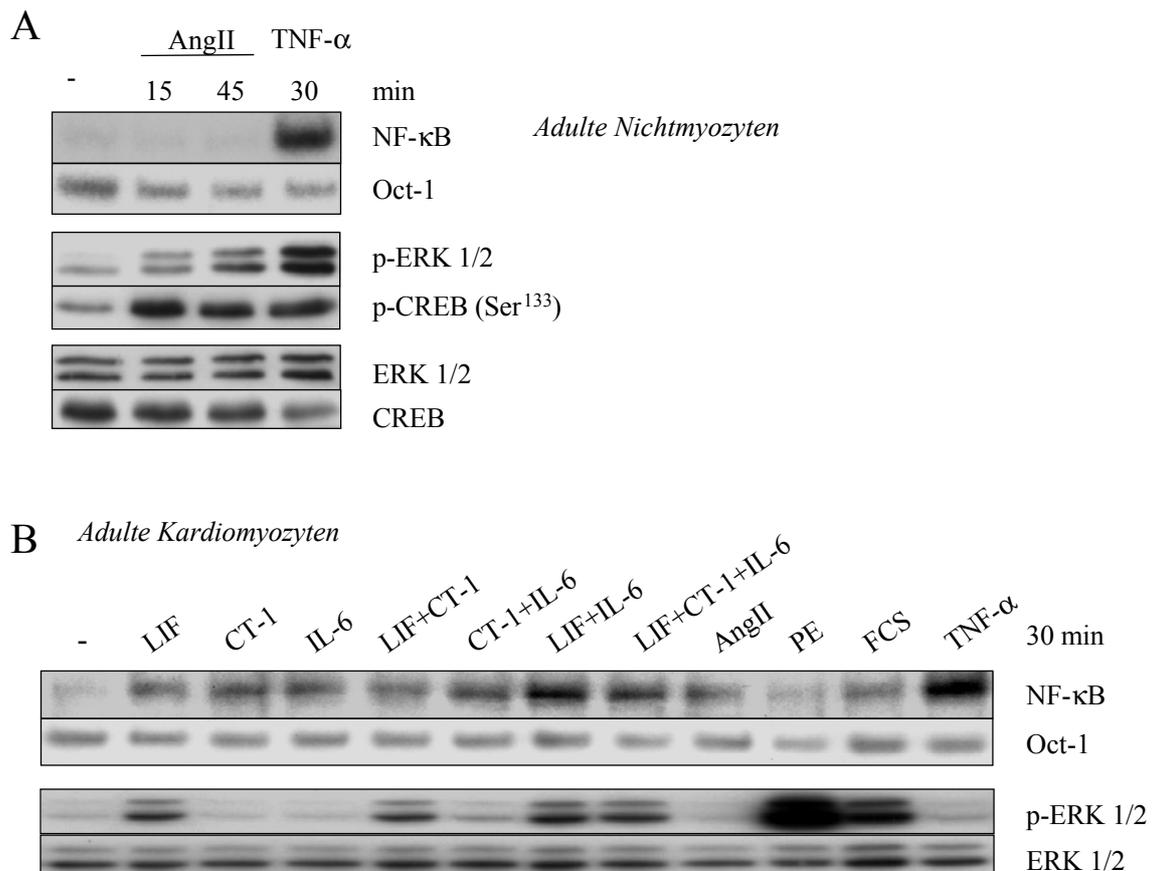


Abb. 15: AngII und Interleukin (IL)-6-Zytokine aktivieren NF- κ B in adulten Kardiomyozyten *in vitro*.

(A) In kardialen Nichtmyozyten *in vitro* aktiviert AngII CREB und ERK, nicht aber NF- κ B. Isolierte, adulte Rattennichtmyozyten wurden mit AngII (100 nM) oder TNF- α (10 ng/ml), wie angegeben, stimuliert. Ein EMSA wurde als Nachweis für die NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität durchgeführt. Der EMSA für Oct-1 diente als Ladungskontrolle. Zur Detektion von phosphoryliertem CREB (p-CREB) und ERK (p-ERK) oder den Gesamtproteinen (Ladungskontrolle) wurden Immunoblots durchgeführt. **(B) In adulten Rattenkardiomyozyten *in vitro* wird NF- κ B auch durch verschiedene Mitglieder aus der Familie der IL-6 Zytokine aktiviert.** Adulte Kardiomyozyten wurden, wie angegeben, mit IL-6 Zytokinen (Leukemia inhibitory factor (LIF, 10 ng/ml), Cardiotrophin-1 (CT-1, 2 nM), IL-6 (10 ng/ml)) oder mit AngII (100 nM), PE (50 μ M), FCS (5 %) oder TNF- α (10 ng/ml) stimuliert. Mit den Extrakten wurde ein EMSA für NF- κ B und Oct-1, bzw. ein Immunoblot gegen phosphorylierte ERK (p-ERK) oder Gesamtprotein durchgeführt.

2.3.4 In adulten Kardiomyozyten ist die FCS-induzierte Hypertrophie unabhängig von NF- κ B

In adulten Kardiomyozyten sollte getestet werden, ob die Inhibition von NF- κ B *in vitro*, ähnlich wie *in vivo*, die Hypertrophie verhindern kann. Da die Methode der Isolation von Kardiomyozyten aus Herzen von (Δ N^{MHC}-)Mäusen erst spät etabliert werden konnte, wurden alternativ adulte Rattenkardiomyozyten isoliert und mit einem für I κ B α Δ N kodierenden Adenovirus infiziert.

Die Expression des Superrepressors wurde im Westernblot nachgewiesen (Abb. 16A, unteres Feld). I κ B α Δ N verhinderte sowohl die basale, als auch die durch AngII-induzierte DNA-Bindung von NF- κ B, während die Virusinfektion an sich keine Inhibition verursachte (Abb. 16A, oberes Feld). Die inhibitorische Wirkung von I κ B α Δ N zeigte sich nicht nur in der blockierten NF- κ B-DNA-Bindung, sondern auch in der Verminderung an endogenem I κ B α -Protein im Westernblot. I κ B α ist ein direktes Zielgen von NF- κ B.

Als Nachweis der *in vitro* induzierten Hypertrophie adulter Kardiomyozyten diente die gesteigerte Proteinsynthese. Sie wurde mit Hilfe des Einbaus der radioaktiv markierten Aminosäure Leucin in zelluläre Proteine nachgewiesen. Zur Induktion der Hypertrophie wurden AngII und als Positivkontrolle FCS verwendet. Während AngII wider Erwarten keinerlei Wirkung auf die Proteinsynthese zeigte, verursachte FCS eine signifikante Zunahme des Einbaus von markiertem Leucin (Abb. 16B). Auch Variationen bei der Stimulationszeit oder der AngII-Konzentration resultierten nicht in der Induktion von Hypertrophie (Daten nicht gezeigt). Als Ursache für die Unwirksamkeit von AngII kommt beispielsweise die Beteiligung von Fibroblasten bei der Initialisierung der Hypertrophie in Betracht (s. vorhergehendes Kapitel). Fibroblasten waren in den Kulturen von adulten Kardiomyozyten nur in sehr geringem Maß vorhanden (< 5%, Daten nicht gezeigt).

Da FCS in adulten Kardiomyozyten die DNA-Bindung von NF- κ B induziert (Abb. 14 A), wurde die Wirkung der Inhibition von NF- κ B auf die FCS-induzierte Hypertrophie getestet. Wie in Abb. 16B dargestellt, verursachte die Expression des NF- κ B-Superrepressors keine Reduktion der FCS-induzierten Proteinsynthese. Da FCS in adulten Kardiomyozyten zu einer starken Aktivierung der prohypertrophisch wirkenden MAP-Kinasen ERK1/2 führt (Abb. 14A), ist anzunehmen, dass diese und nicht NF- κ B bei der Induktion der Hypertrophie durch FCS eine entscheidende Rolle spielen.

Adulte Kardiomyozyten

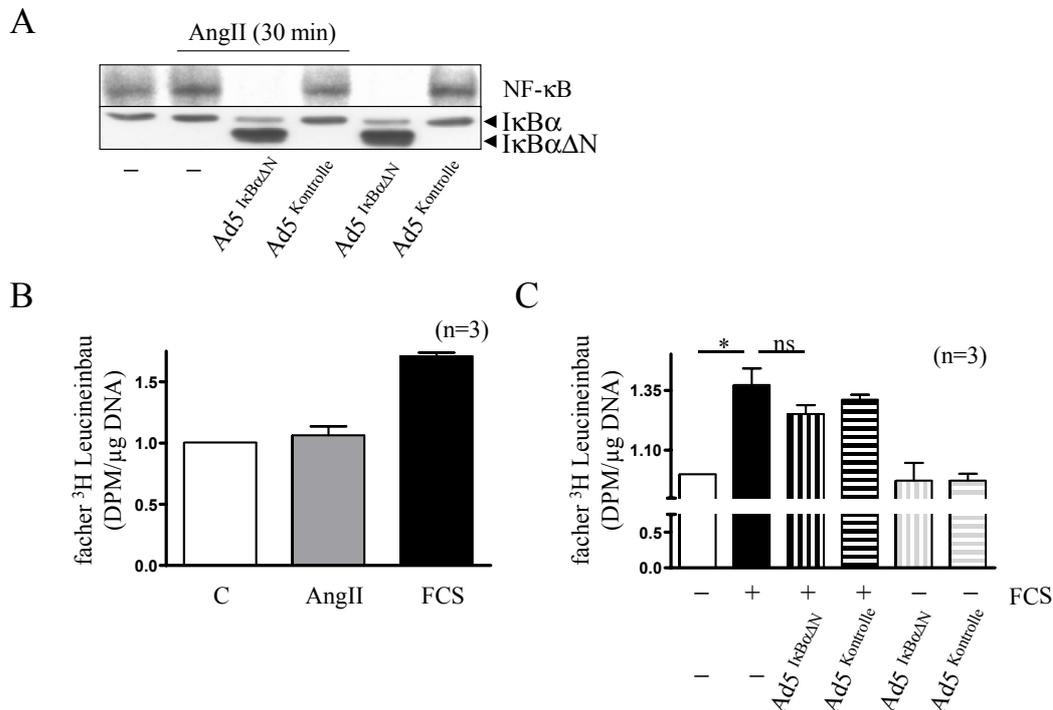


Abb. 16: In adulten Rattenkardiomyozyten hat die Inhibition von NF- κ B keinen Einfluss auf die FCS-induzierte Hypertrophie. (A) Die Expression von I κ B α Δ N verhindert die AngII-induzierte DNA-Bindung von NF- κ B. Die Expression von I κ B α Δ N wurde mittels Infektion mit einem für I κ B α Δ N-kodierenden Adenovirus (Ad5^{I κ B α Δ N}) realisiert. Zur Kontrolle wurden Zellen mit Leervirus (Ad5^{Kontrolle}) infiziert. Beide Viren wurden von Dr. P. Löser zur Verfügung gestellt. Die Expression des I κ B α Δ N-Proteins wurde im Immunoblot (unten) nachgewiesen, die DNA-Bindung von NF- κ B als EMSA (oben). **(B) Die Proteinsynthese wird durch FCS, nicht aber durch AngII gesteigert.** Zur Induktion der Hypertrophie wurden die Kardiomyozyten während 48 Stunden mit FCS (10%) und AngII (1 μ M) stimuliert. Zum Nachweis der Hypertrophie wurde die Proteinsyntheserate mittels Einbau von ³H-markiertem Leucin in zelluläres Protein bestimmt. Die Normalisierung der radioaktiven Zerfälle erfolgte auf den DNA-Gehalt. **(C) Die Expression von I κ B α Δ N verhindert nicht die FCS-induzierte Proteinsynthese.** Virusinfizierte Kardiomyozyten wurden für 48 Stunden mit FCS (10%) stimuliert und die Hypertrophie wie unter (B) bestimmt. * $p < 0.05$.

2.3.5 In neonatalen Kardiomyozyten verhindert die Inhibition von NF- κ B nicht die Hypoxie/Reperfusion-induzierte Hypertrophie

Die Daten dieses Kapitels wurden in Zusammenarbeit mit Dr. A. El Jamali erarbeitet und 2004 veröffentlicht (157).

Beim Herzinfarkt kommt es zum kompletten Verschluss eines oder mehrerer Herzkranzgefäße durch ein Blutgerinnsel. Im dadurch betroffenen Gewebe entsteht durch die unterbrochene Blutzufuhr eine Unterversorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff (Ischämie).

Durch Auflösen/Entfernung des Blutgerinnsels kommt es Wiederversorgung (Reperfusion). Ischämie/Reperfusion bewirken den Verlust von Kardiomyozyten im betroffenen

Muskelbereich und die Hypertrophie des verbliebenen Gewebes ((157) und Einleitung). Im entsprechenden *in vitro*-Modell wird Kardiomyozyten vorübergehend der Sauerstoff durch Inkubation in einer Hypoxiekammer entzogen. Die anschließende Reoxygenierung erfolgt unter Standardzellkulturbedingungen.

In den nachfolgend beschriebenen Versuchen wurde die Funktion verschiedener Transkriptionsfaktoren bei der durch Hypoxie/Reoxygenierung induzierten Hypertrophie *in vitro* getestet. In kultivierten, neonatalen Kardiomyozyten wurde zunächst die Wirkung verschieden langer Hypoxiezeiten auf die Proteinsynthese als Hypertrophiemaß ermittelt. Die Hypoxiedauer (H) betrug 1, 3 oder 6 Stunden und die anschließende Reoxygenierung (R) dauerte jeweils bis zum Versuchsende nach 48 Stunden. Der Einbau von radioaktiv-markiertem Leucin in zelluläres Protein war proportional zur Hypoxiedauer (Abb. 17A). Um die Zellgröße als weiteres Maß der Hypertrophie zu bestimmen, wurde das Kardiomyozyten-spezifische Protein α -sarkomerisches Aktin (α -sarkom. Aktin) mittels eines Fluoreszenzgekoppelten Antikörpers nachgewiesen (Abb. 17B). Die Größe der Kardiomyozyten hatte nach 6 Stunden Hypoxie/42 Stunden Reoxygenierung (H6/R42) deutlich zugenommen (Abb. 17B).

Um zu testen, welche Transkriptionsfaktoren bei der Induktion von Hypertrophie durch Hypoxie/Reoxygenierung beteiligt sind, wurden die DNA-Bindungsaktivitäten von CREB, GATA und NF- κ B getestet. Während die DNA-Bindungsaktivität dieser Transkriptionsfaktoren nach 6 Stunden Hypoxie erhöht war, war dies nach 30 min Reoxygenierung nur noch für CREB der Fall (Abb. 17C). Die Bindungsaktivität von CREB war auch zwei Stunden nach Beginn der Reoxygenierung noch erhöht (157).

Im nächsten Schritt wurde getestet, welche Wirkung die Inhibition von NF- κ B auf die Hypoxie/Reoxygenierung-induzierte Hypertrophie hat. Dazu wurden neonatale Kardiomyozyten mit dem für I κ B α Δ N kodierenden Adenovirus oder Leervirus infiziert und die Hypertrophie nach H6/R42 mittels Leucineinbau bestimmt (Abb. 17D). Die Inhibition von NF- κ B hatte keinen Einfluss auf die durch H6/R42 induzierte Hypertrophie (Abb. 17D, H6/R42-behandelte Zellen, Ad5^{I κ B α Δ N} versus Ad5^{Kontrolle}). Stattdessen führte die Expression von I κ B α Δ N unter basalen Bedingungen sogar selbst zu einem gesteigerten Leucineinbau (Abb. 17D, KT-Zellen, Ad5^{I κ B α Δ N} versus Ad5^{Kontrolle}). Demzufolge scheint NF- κ B in neonatalen Kardiomyozyten keine Rolle bei der H6/R42-induzierten Hypertrophie zu spielen. Vielmehr ist hierfür der Transkriptionsfaktor CREB verantwortlich (157).

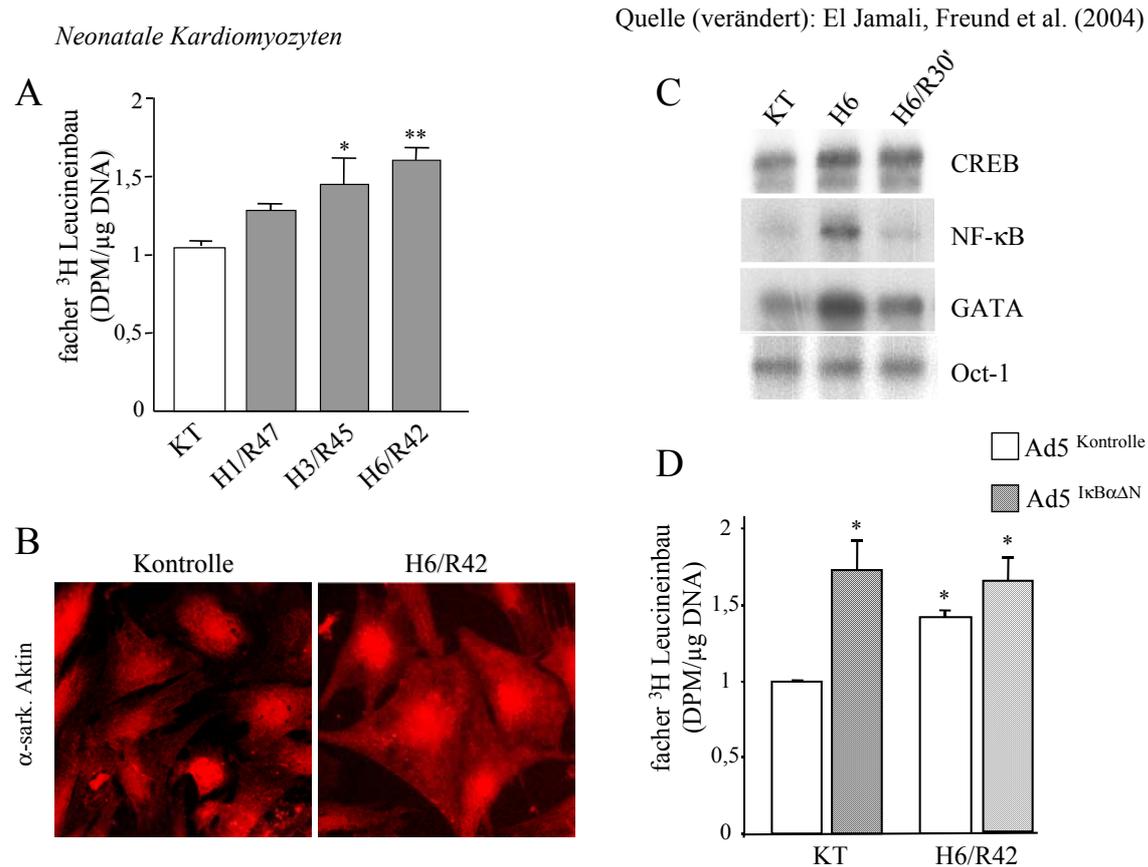


Abb. 17: In neonatalen Kardiomyozyten hat die Inhibition von NF-κB keinen Effekt auf die Hypoxie/Reoxygenierung (H/R)-induzierte Hypertrophie *in vitro*. (A) In neonatalen Kardiomyozyten ist die Hypertrophie proportional zur Dauer der Hypoxie. Neonatale Kardiomyozyten wurden für eine, drei oder sechs Stunden in einer Hypoxiekammer inkubiert (H1, H3, H6) und anschliessend bis zum Ende des Versuchs nach 48 Stunden unter normalen Kulturbedingungen reoxygeniert (R). Die Hypertrophie wurde als Einbau von ³H-markiertem Leucin in zelluläres Protein gemessen (Normalisierung auf den DNA-Gehalt). * p < 0.05, **p < 0.005, jeweils versus KT.

(B) Hypoxie/Reoxygenierung bewirkt bei neonatalen Kardiomyozyten ein Größenwachstum. Neonatale Kardiomyozyten wurden nach H6/R42 fixiert und das Kardiomyozyten-spezifische Protein α-sarkomerisches Aktin mittels Immunhistochemie nachgewiesen. (C) Die Bindungsaktivitäten von NF-κB, CREB und GATA werden durch H6/R30' unterschiedlich reguliert. Mittels EMSA wurden die Bindungsaktivitäten der genannten Transkriptionsfaktoren nach 6 Stunden Hypoxie oder 6 Stunden Hypoxie und 30minütiger Reoxygenierung (H6/R30') bestimmt. Der EMSA für Oct-1 diente als Ladungskontrolle. (D) Die Expression von IκBαΔN verhindert nicht die H6/R42-induzierte Hypertrophie. Mit Leervirus (Ad5^{Kontrolle}) oder für IκBαΔN-kodierenden Virus (Ad5^{IκBαΔN}) infizierte Kardiomyozyten wurden, wie angegeben, stimuliert und die Hypertrophie wie unter (A) beschrieben, gemessen. * p < 0.05 versus KT mit Leervirus. Die Ergebnisse dieser Abbildung wurden in Zusammenarbeit mit Dr. A. El Jamali erarbeitet.

2.3.6 In isolierten, adulten Kardiomyozyten bewirkt die Inhibition von NF-κB durch IκBαΔN keine Steigerung der Apoptose nach TNF-α Stimulation

NF-κB gilt als Überlebensfaktor, der durch Expression antiapoptotischer Zielgene verschiedene Zelltypen schützt. Im beschriebenen Mausmodell führte die kardiomyozyten-

spezifische Expression des NF- κ B Superrepressors jedoch weder unter basalen Bedingungen noch nach Infusion mit AngII zu gesteigerter Apoptose. Hingegen sterben Mäuse, die defizient für NF- κ B p65 sind, während der Embryogenese aufgrund von massiver Leberapoptose, die durch endogenes TNF- α verursacht wird. TNF- α aktiviert sowohl proapoptotische Caspase-Kaskaden als auch den Überlebensfaktoren NF- κ B (158). In Kardiomyozyten ist TNF- α ein potenter Aktivator von NF- κ B (Abb. 13 A). Um zu testen, ob TNF- α bei gleichzeitiger Inhibition von NF- κ B vermehrt Apoptose induziert, wurden I κ B α Δ N-exprimierende Kardiomyozyten für 20 Stunden mit TNF- α stimuliert. Zum Nachweis von Apoptose diente der TUNEL-Test. Als Positivkontrolle wurde das in der Krebstherapie eingesetzte Doxorubicin verwendet, welches bei Kardiomyozyten Apoptose verursacht (159).

Tatsächlich bewirkte Doxorubicin bei allen Zellen die für die Apoptose charakteristischen DNA-Strangbrüche, die als grüne Immunfluoreszenz im Kern nachgewiesen wurde (Abb. 18, unten). Im Gegensatz dazu führte TNF- α weder alleine noch bei gleichzeitiger Inhibition von NF- κ B oder dem Leervirus zu einer nennenswerten Apoptose (Abb. 18).

Neben DNA-Strangbrüchen ist die Translokation des Phospholipids Phosphatidylserin von der inneren an die äußere Seite der Plasmamembran ein Charakteristikum der Apoptose. Aussenständiges Phosphatidylserin wird durch Bindung von Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Annexin-V mittels FACS-Analyse nachgewiesen. Weiterhin kann mittels FACS die Aktivität der Apoptose-aktivierten Proteasen (sog. Caspasen) detektiert werden. Im Aktivitätstest wird das Peptidsubstrat zu einem fluoreszierenden Produkt gespalten. In FACS-Analysen mit adulten Kardiomyozyten bewirkte die Inhibition von NF- κ B durch adenovirale Expression von I κ B α Δ N keine eindeutige Steigerung der Annexin-V-Bindung oder der Caspaseaktivität nach Stimulation mit TNF- α (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend demonstrieren die Apoptosetests mit isolierten, adulten Kardiomyozyten, dass eine Inhibition von NF- κ B durch den Superrepressor nicht zu einer Steigerung der Apoptose unter basalen Bedingungen, oder nach TNF- α -Stimulation führt. Diese Daten stehen im Einklang mit den Ergebnissen der *in vivo* Versuche, bei denen I κ B α Δ N weder unter basalen noch Stressbedingungen (AngII) zu detektierbarer Apoptose führte. Im Gegensatz dazu führte die Inhibition von NF- κ B in Kulturen von neonatalen Kardiomyozyten zu einer Steigerung der Annexin-V-Bindung und der Caspase-Aktivität nach Stimulation mit TNF- α (136). Als Ursache hierfür könnten wiederum grundlegende physiologische Unterschiede zwischen adulten und neonatalen Kardiomyozyten ausschlaggebend sein.

Adulte Kardiomyozyten

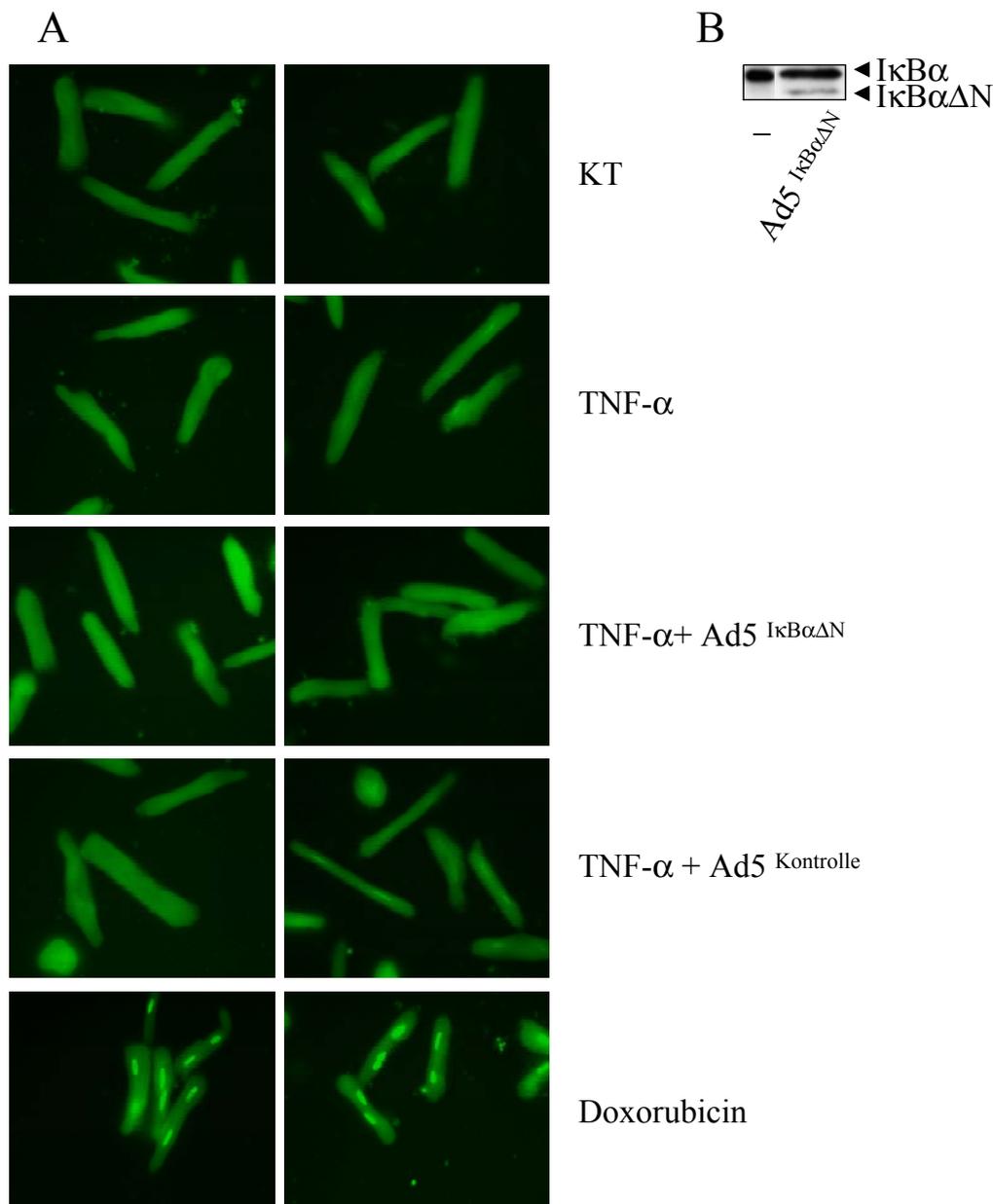


Abb. 18: In adulten Rattenkardiomyozyten *in vitro* bewirkt die Inhibition von NF-κB keine Steigerung der Apoptose nach TNF-α Stimulation.

(A) Adulte Kardiomyozyten wurden mit einem für IκBαΔN-kodierenden Virus (Ad5^{IκBαΔN}) bzw. mit dem Leervirus (Ad5^{Kontrolle}) infiziert. Die Stimulation erfolgte, wie angegeben, mit TNF-α (20 ng/ml, 20 Stunden) oder Doxorubicin (2 μM, 20 Stunden). Ein TUNEL-Test zum Nachweis von für die Apoptose charakteristischen DNA-Strangbrüchen wurde mit den fixierten Zellen durchgeführt. Pro Versuchsbedingung sind zwei Abbildungen in 40facher Vergrößerung dargestellt. (B) Nachweis der Expression von IκBαΔN-Protein mittels Westernblot.

2.4 Die Inhibition von NF-κB bewirkt die reduzierte mRNA-Expression von gp130 *in vitro* und *in vivo*

Die Ergebnisse der vorangegangenen Kapitel zeigen, dass der Transkriptionsfaktor NF-κB die Ausbildung von Hypertrophie *in vivo* essentiell ist. Für die Funktion von NF-κB in anderen

Gewebe sind mittlerweile eine Vielzahl von Zielgenen identifiziert worden (s. Einleitung). Um mögliche Zielgene von NF- κ B in Kardiomyozyten zu identifizieren, wurde die mRNA-Expression von knapp 30000 Genen in isolierten, adulten Rattenkardiomyozyten mittels Gen-Chip-Analyse untersucht. Dazu wurden I κ B α Δ N-exprimierende Zellen (Ad5^{I κ B α Δ N}) mit Leervirus-behandelten Zellen (Ad5^{Kontrolle}) sowie unbehandelten Kontrollzellen verglichen. In I κ B α Δ N-exprimierenden Zellen war die Menge an I κ B α -mRNA im Vergleich zu Leervirus-behandelten Zellen 1,7-fach geringer. Da I κ B α ein direktes Zielgen von NF- κ B ist, wurde dies als positiver Nachweis der NF- κ B-Inhibition gewertet. Unter den Genen mit reduzierter mRNA-Expression in I κ B α Δ N-exprimierenden Zellen war auch gp130. gp130 ist die Signal-vermittelnde Komponente von Liganden-bindenden Rezeptoren der Familie der IL-6 Zytokine. Es initialisiert die Signalkaskade der Rezeptoren von IL-6, LIF, CT-1, IL-11 etc. (76). gp130 spielt eine wichtige Rolle bei der Induktion der Hypertrophie: Mäuse, die IL-6 sowie IL-6R überexprimieren, zeigen eine konstitutive Aktivierung von gp130 und entwickeln Hypertrophie (77).

Um die Ergebnisse aus dem Gen-Chip-Experiment zu verifizieren, wurde die Regulation der mRNAs von I κ B α und gp130 durch realtime RT-PCR überprüft. Auch in diesem Fall wiesen I κ B α Δ N-exprimierende, isolierte Kardiomyozyten (Ad5^{I κ B α Δ N}) signifikant niedrigere mRNA-Mengen von I κ B α und gp130 sowohl im Vergleich zu Leervirusinfizierten (Ad5^{Kontrolle}) als auch zu unbehandelten Zellen auf (Abb. 19A). Mittels realtime RT-PCR wurde die mRNA-Expression von gp130 auch in Mausherzen untersucht. Unter Basalbedingungen war die Expression von gp130 in den Herzen von Δ N^{MHC}-Mäusen (n=3) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (zwei WT, eine Δ N^{loxP}-, eine Cre^{MHC}-Maus) nur tendenziell aber nicht signifikant geringer (Abb. 19 B, links). Daraufhin wurde die mRNA-Expression von gp130 *in vivo* nach AngII-Stimulation analysiert. Nach 14-tägiger AngII-Behandlung war die gp130 mRNA bei Δ N^{MHC}-Mäusen (n=4) im Vergleich zu scheinoperierten Kontrollmäusen (ein WT-, ein Δ N^{loxP}-, zwei Cre^{MHC}-Tiere) tendenziell und zu AngII-behandelten Kontrollen (je zwei WT, Δ N^{loxP}- und Cre^{MHC}-Mäuse) signifikant verringert (Abb. 19 B, Mitte und rechts). Innerhalb der jeweiligen Kontrollgruppe bestanden keine Unterschiede bezüglich der mRNA-Expression von gp130 (Daten nicht gezeigt). Schliesslich wurde mittels Westernblot getestet, ob die Verringerung der gp130 mRNA Auswirkungen auf die Proteinmenge von gp130 sowie die von gp130 ausgehende Signalleitung hat. Dazu wurden Kardiomyozyten von zwei adulten Kontrollmäusen (WT und Δ N^{loxP}) und zwei Δ N^{MHC}-Mäusen isoliert und für 30 min mit AngII und IL-6 kostimuliert. Als

Nachweis der Aktivierung von gp130 diente die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3, der ein bekanntes Zielmolekül dieses Signalweges darstellt. Die Kostimulation mit AngII und IL-6 induzierte die Phosphorylierung von STAT3 in Kontrollzellen in gleichem Masse wie in Zellen von ΔN^{MHC} -Mäusen (Abb. 19 C, Mitte). Dies lässt sich mit vergleichbaren gp130 Protein-Mengen bei Kontroll- und ΔN^{MHC} -Zellen vor der Stimulation erklären (Abb.19C, oben, Spuren 1-4). Überraschend war jedoch die geringere Menge an gp130-Protein nach 30minütiger AngII/IL-6 Kostimulation in Kardiomyozyten von ΔN^{MHC} Mäusen (Abb. 19C, oben Spuren 5-8).

Für die IL-6-Zytokine ist bekannt, dass die Bindung des Liganden neben der Initialisierung der Signalkaskade auch die zügige Internalisierung des Rezeptorkomplexes zur Folge hat. Nach der Internalisierung werden der Rezeptor und der Ligand abgebaut. *De novo* Proteinsynthese ist zum Wiederauffüllen der IL-6 Bindestellen notwendig (76). Dieser Mechanismus könnte aufgrund der Inhibition von NF- κ B und der dadurch verringerten Menge an gp130 mRNA gestört sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese sind weitere Experimente nötig.

Da die Expression von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer Reduzierung der gp130 mRNA führte, wurden die Promotorregionen von humanem, murinen und des gp130-Gens aus der Ratte auf potentielle Bindungsstellen für NF- κ B untersucht. Im näheren Promotorbereich wurde bei keiner der Sequenzen eine kanonische Bindestelle für NF- κ B identifiziert. Beim Rattengen fand sich eine Bindestelle für p50 nur in weiter Entfernung vom Translationsstart (ca. 8200 Basenpaare stromaufwärts).

Zusammengefasst bewirkt die Inhibition von NF- κ B *in vitro* und *in vivo* eine Verringerung der mRNA von gp130. gp130 ist als Hypertrophie-Stimulus beschrieben worden. Das Fehlen einer klassischen Bindestelle für NF- κ B, deutet darauf hin, dass NF- κ B eine indirekte Wirkung auf die Regulation der gp130 mRNA besitzt.

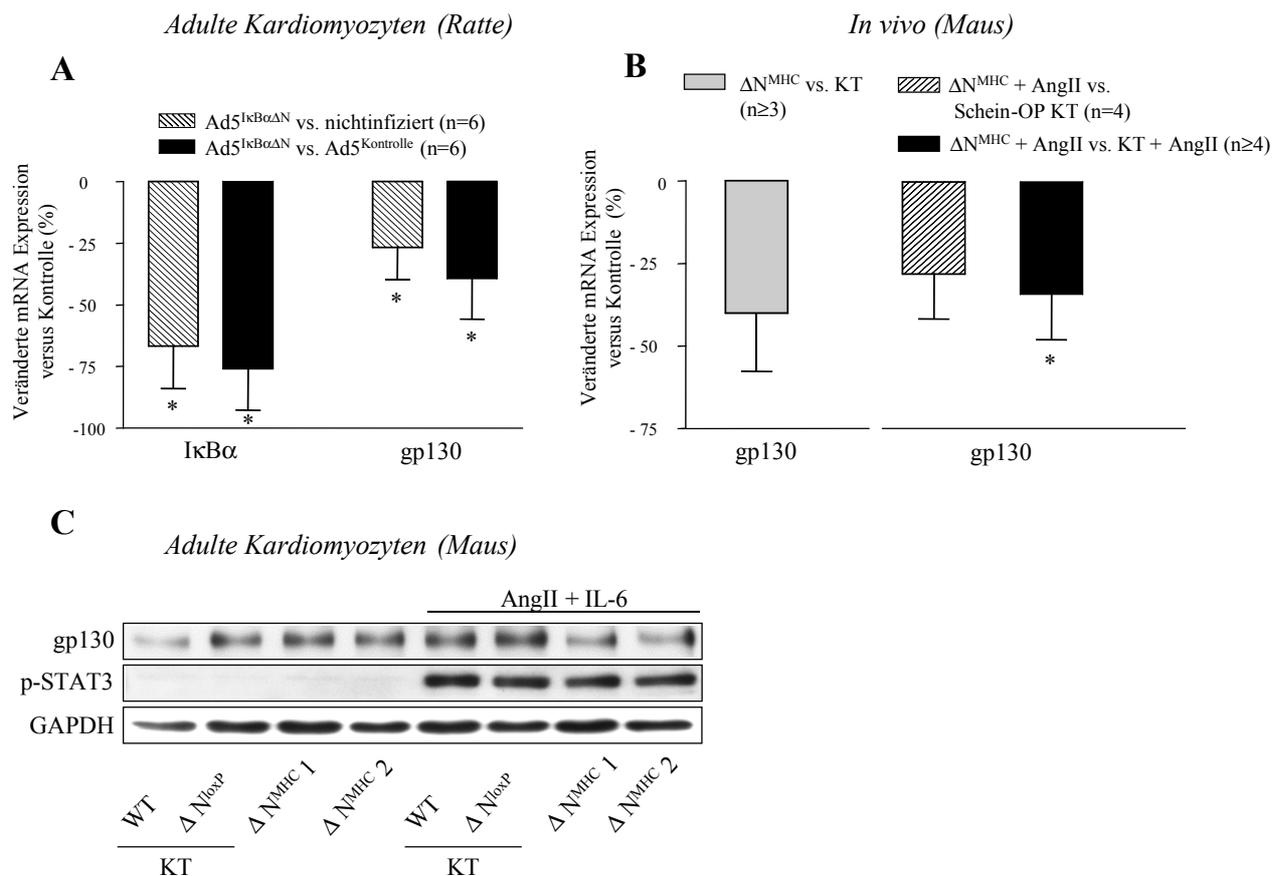


Abb. 19: Die Inhibition von NF-κB vermindert die Expression von gp130 mRNA *in vitro* und *in vivo*. (A) In adulten Rattenkardiomyozyten *in vitro* verringert IκBαΔN die mRNA-Expression von IκBα und gp130. Adulte Rattenkardiomyozyten wurden mit Leervirus (Ad5^{Kontrolle}) oder mit einem für IκBαΔN-kodierenden Adenovirus (Ad5^{IκBαΔN}) infiziert. Die Expression der mRNA von endogenem IκBα und gp130 wurde mittels realtime RT-PCR quantifiziert. Gezeigt ist die prozentuale Veränderung der Expressionen von IκBα und gp130 nach Normalisierung mit nichtinfizierten oder Leervirusinfizierten Zellen. * p<0.05. (B) In Herzen von unstimulierten oder AngII-stimulierten ΔN^{MHC}-Mäusen ist die mRNA-Expression von gp130 erniedrigt. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte mittels realtime RT-PCR. Dargestellt ist die prozentuale Verringerung der gp130 mRNA Expression in Herzen un behandelter ΔN^{MHC}-Mäuse nach Normalisierung mit Kontrollmäusen (links) und in Herzen AngII-behandelter ΔN^{MHC}-Mäuse nach Normalisierung mit scheinoperierten oder AngII-behandelten Kontrollmäusen (rechts). Kontrollmäuse (KT) waren in beiden Fällen ΔN^{IoxP}, Cre^{MHC} und WT-Mäuse (s. Text). * p<0.05. (C) In Kardiomyozyten von adulten ΔN^{MHC}-Mäusen ist die Menge an gp130 Protein nach Stimulation verringert. Kardiomyozyten wurden aus einer WT- und einer ΔN^{IoxP}-Maus (Kontrollen, KT) sowie zwei ΔN^{MHC}-Mäusen isoliert und mit AngII (1 μM) plus IL-6 (10 ng/ml), wie angegeben, stimuliert. Mit den Extrakten wurden Immunoblots für gp130, phosphoryliertes STAT3 (p-STAT3) oder GAPDH (Ladungskontrolle) durchgeführt.