

III. Diskussion

Die kardiale Hypertrophie stellt ein erhöhtes Risiko für die Herzinsuffizienz dar. Heutzutage leiden fünf Millionen US-Amerikaner an Herzinsuffizienz, bei den über 65jährigen beträgt der Anteil 1% (104). Eine häufige Ursache von Hypertrophie ist Bluthochdruck (Hypertonie). Die aktuelle Behandlung von Herzinsuffizienz-Patienten beschränkt sich auf die Blockierung von Signalwegen auf der Ebene der Oberflächenrezeptoren: Angiotensin converting enzyme (ACE)-Inhibitoren verringern die Hypertonie durch Reduktion der Synthese von AngII (vasokonstriktive (gefäßverengende) Wirkung) bzw. durch Reduktion des Abbaus von Bradykinin (vasodilatativ: gefäßerweiternd). Auch die Inhibitoren des β -adrenergen Systems („ β -Blocker“) verringern den Hypertonus, u. a. durch Verhinderung der Freisetzung von Renin. Zusätzlich zu diversen Nebenwirkungen können diese Medikamente den Hypertonus-verursachten Endorganschaden am Herzen häufig nicht ausreichend unterdrücken. Daher stellen in der Signalkaskade stromabwärts zu findende Signalmoleküle, insbesondere Transkriptionsfaktoren, potentiell geeignetere Ziele zur Behandlung der Herzinsuffizienz dar. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen zum ersten Mal *in vivo*, dass die Inhibition des Transkriptionsfaktors NF- κ B die Hypertrophie verhindert, ohne zu einer Steigerung der Apoptose zu führen. *In vitro* wurde NF- κ B in Kardiomyozyten sowohl direkt von AngII als auch durch Zytokine der IL-6-Familie aktiviert, die durch kardiale Fibroblasten nach Stimulation mit AngII freigesetzt werden. Ein möglicher Mechanismus für die Rolle von NF- κ B bei der Hypertrophie ist die Regulation des Hypertrophie-induzierenden IL-6 Rezeptors gp130, da die mRNA-Expression dieses Rezeptors nach NF- κ B-Inhibition reduziert ist.

3.1 Experimentelle Modelle

3.1.1. Die Verwendung des Cre/loxP-System zur Generierung von ΔN^{MHC} -Mäusen

Zur herzspezifischen Expression von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ wurde das Cre/loxP-System eingesetzt. Bei den ΔN^{loxP} -Mäusen ist mittels homologer Rekombination ein Allel von β -Catenin durch die geflochte $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -cDNA ersetzt. Die monoallelische Expression von β -Catenin hat keine Auswirkungen auf die Proteinmengen in verschiedenen Organen (128), da β -Catenin über die Proteininstabilität reguliert wird (160). Nach Entfernung des Stop-Codons durch die Cre-Rekombinase unterliegt die Transkription der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -Sequenz dem ubiquitär aktiven β -Catenin-Promotor. In Vertebraten wird β -Catenin im Herzen sowohl während der Embryogenese (161) als auch in adulten Kardiomyozyten exprimiert (162).

Bei den Cre^{MHC}-Mäusen handelt es sich um transgene Tiere, bei denen mindestens eine Kopie des DNA-Konstruktes ungerichtet im Genom integriert ist. Bei der Kreuzung von ΔN^{loxP} -mit Cre^{MHC}-Mäusen hätte der Anteil an Nachkommen, die sowohl für das gefloxtete I κ B α Δ N- als auch für α -MHC-Cre-Insert positiv sind (ΔN^{MHC}), erwartungsgemäß 25 % betragen. Tatsächlich war der Anteil von ΔN^{MHC} -Mäusen um ein Viertel geringer (19%, n= 221). Hierfür sind mehrere Ursachen denkbar.

Erstens könnte die Expression von I κ B α Δ N während der Embryogenese in Kardiomyozyten vermehrt Apoptose auslösen oder die Entwicklung des Herzens stören. Der α -MHC-Promotor wird bereits im Mausembryo exprimiert (163). Die Expression ist am Tag E8-E9.5 (E=Embryogenese) hoch; in diesem Zeitabschnitt formieren sich in dem zunächst tubulären Herzen Atria und Ventrikel. Danach vermindert sich die α -MHC-Expression bis zum Tag E16.5 kontinuierlich. Anschliessend erfolgt erneut eine verstärkte Bildung des α -MHC-Transkriptes bis zur Geburt und darüber hinaus (163). Gegen die Annahme, dass die frühe Expression von I κ B α Δ N im Herzen zu vermehrter Apoptose führt, spricht die Tatsache, dass bei Mäusen mit ubiquitärer Expression von I κ B α Δ N während der Embryogenese in einem Teil der Tiere zwar Apoptose in der Leber, nicht jedoch im Herzen auftrat (128). Auch bei NF- κ B p65-knockout Mäusen wurde nicht über Apoptose im Herzen berichtet. In isolierten Herzzellen von p65-kockout-Mäusen verursachte die Stimulation mit TNF- α keine gesteigerte Apoptose (164).

Gegen eine entscheidende Rolle von NF- κ B bei der Herzentwicklung spricht auch der Befund, dass sich bei TNF/p65-Doppelknockout-Mäusen, die mangels TNF- α vor Apoptose geschützt sind, morphologisch normale Herzen entwickeln (164). Auch Mäuse, denen entweder p50/p105 oder p52/p100 fehlt, entwickeln normale Herzen (165,166). Die übrigen Mitglieder der NF- κ B-Familie (c-Rel und RelB) werden nicht im Herzen, sondern nur in hematopoietischen Zellen exprimiert (167). Weiterhin wurde bei NF- κ B-Reporter-Mäusen während der Embryogenese im Herzen keine NF- κ B-Aktivität festgestellt (168). Dies lässt darauf schliessen, dass NF- κ B bei der Herzentwicklung keine tragende Rolle spielt.

Als zweite Ursache für die geringere Anzahl an ΔN^{MHC} -Nachkommen kommt die Toxizität der Cre-Rekombinase in Frage. Die Cre-Rekombinase inhibiert in Säugerzellen *in vitro* die Proliferation und verursacht Schäden an der DNA. Dabei besteht eine positive Korrelation zwischen der Häufigkeit der DNA-Schäden und dem Expressionsniveau der Cre-Rekombinase (169). Als Ursache für die Cre-induzierten DNA-Schäden kommen kryptische loxP-Sequenzen in Frage, die natürlicherweise im Säurgerenom vorkommen (169). Eine

intensive Proliferation von Kardiomyozyten findet während der Herzentwicklung zwischen Tag E15 und der Geburt statt (s. Einleitung). Diese könnte bei manchen Tieren durch eine erhöhte Cre-Aktivität gestört worden sein. In diesem Fall sollte auch die Anzahl positiver Nachkommen bei den Cre^{MHC}-Mäusen vermindert sein. Tatsächlich war der Anteil positiver Tiere mit 43% geringer als die erwarteten 50% (n=158).

Schliesslich könnte die Kombination von MHC-Transgen und gefloxtem IκBαΔN-knockin eine unbekannte negative Wirkung auslösen, die in einigen ΔN^{MHC}-Tieren während der Embryogenese zum Tod führte.

Postnatal verursachte die Kardiomyozyten-spezifische Expression von IκBαΔN bei ΔN^{MHC}-Mäusen unter basalen Bedingungen keinen mittels Echokardiographie nachweisbaren Phänotyp (Tabelle 3). Die Ausmaße der Wanddicken von linksventrikulärem Septum und linksventrikulärer Hinterwand waren bei Kontroll- und ΔN^{MHC}-Mäusen vergleichbar (Tabelle 3).

Auch in zwei vergleichbaren, anderen Mausmodellen war unter basalen Bedingungen im Herzen kein anormaler Phänotyp feststellbar: Im ersten Fall wurden transgene Mäuse generiert, die nicht degradierbares IκBαΔN (es fehlen die ersten 36 Aminosäuren des N-Terminus) unter der Kontrolle des herzspezifischen Promotors α-myosin heavy chain (α-MHC) exprimieren (170). Beim zweiten transgenen Modell waren bei IκBα die für die Phosphorylierung und Ubiquitylierung notwendigen Serinreste 32 und 36 durch Alaninreste ersetzt (171). Auch in diesem Fall unterlag die Expression des mutierten IκBα dem α-MHC-Promotor. Keine der transgenen Mäuse hatte morphologische Herzanomalien.

Eine andere Gruppe hat kürzlich die Funktion von NF-κB bei der pathologischen Hypertrophie *in vivo* mittels adenoviraler Expression von IκBαΔN untersucht (172). Der Transfer des Virus wurde durch direkte Injektion in den linken Ventrikel realisiert. Dieses Modell hat im Vergleich zu genetisch veränderten Mäusen viele Unsicherheiten: Erstens stellt die Operation zur Öffnung des Brustraumes für die Injektion eine erhebliche Stresssituation für das Tier dar. Zweitens macht die Injektion die Expression des Proteins in einem spezifischen Zelltyp unmöglich. Li et al. berichteten, dass die Expression von IκBαΔN in Kardiomyozyten und Endothelzellen nachgewiesen wurde. Drittens sind mit zunehmender Entfernung vom Injektionsort abnehmende Viruskonzentrationen und parallel dazu abnehmende Expressionsniveaus zu erwarten. Viertens fanden Li et al. eine kontinuierliche Abnahme viruspositiver Zellen mit fortschreitender Versuchsdauer. Schliesslich verursachte der Gentransfer mittels Viren eine Entzündungsreaktion der Arterien des Herzmuskels (172). Im Vergleich dazu scheinen die genetischen Veränderungen bei den ΔN^{MHC}-Mäusen zwar die

Anzahl der Nachkommen zu reduzieren. Überlebende Tiere haben unter basalen Bedingungen jedoch keinen offensichtlichen Phänotyp.

3.1.2. *In vitro* Modelle: Adulte versus neonatale Kardiomyozyten

In dieser Arbeit wurden zur Untersuchung von Hypertrophie-Signalwegen *in vitro* adulte Kardiomyozyten eingesetzt. Viele Gruppen verwenden aufgrund der höheren Ausbeute neonatale Kardiomyozyten. Ob letztere ein geeignetes Modell der pathologischen Hypertrophie darstellen, ist zweifelhaft, da die pathologische Hypertrophie auch beim Menschen im adulten Organismus stattfindet. Darüber hinaus weisen neonatale und adulte Kardiomyozyten deutliche Unterschiede auf. Erstere sind noch undifferenzierte Zellen, die weiterhin die Fähigkeit zur Proliferation besitzen (s. Kapitel Einleitung). Dies scheint unter bestimmten Bedingungen zu einer erhöhten Anfälligkeit für Apoptose zu führen (s.u.). Auch morphologisch bestehen Unterschiede: Neonatale Kardiomyozyten besitzen eine irreguläre Form und nur einen Zellkern. Hingegen sind adulte Kardiomyozyten enddifferenzierte, langgestreckte Zellen mit zwei Zellkernen. Beide Zellformen unterscheiden sich auch bezüglich der Genexpression, z. B. im Bezug auf die Isoformen kontraktiler Proteine (s. Kapitel Molekulare Veränderungen der Hypertrophie).

Zusätzlich besteht bei Kulturen von neonatalen Kardiomyozyten oft ein Problem: Der Anteil von Nichtmyozyten liegt bei $\geq 10\%$ (173). Kardiale Fibroblasten setzen basal und nach Stimulation Signalmoleküle frei, die Kardiomyozyten beeinflussen. Bei Fibroblasten in Kultur induzierte AngII die Aktivierung von ERK und CREB (Abb. 11A). Diese Signalwege sind in der AngII-gesteigerten Expression von IL-6 involviert (156). IL-6 aktiviert in adulten Kardiomyozyten NF- κ B (Abb. 15B). Zudem können Signalereignisse in Nichtmyozyten diejenigen in Kardiomyozyten überlagern. Ein entsprechendes Problem trat bei dem Nachweis der NF- κ B-Inhibition in ΔN^{MHC} -Mäusen nach TNF- α -Stimulation auf. In Gesamtherzextrakten wurde nur eine geringe Inhibition der DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B festgestellt, da TNF- α NF- κ B auch in Nichtmyozyten aktiviert.

Die Trennung von neonatalen Kardiomyozyten und Nichtmyozyten ist schwierig, da die Zellgrößen ähnlich sind und somit eine gravimetrische Separierung erschweren. Hingegen sind adulte Kardiomyozyten wesentlich größer als Nichtmyozyten. Die Zentrifugation mit geringer g-Zahl führt zur Sedimentierung der Kardiomyozyten, während die Nichtmyozyten im Überstand verbleiben. Die Reinheit der eingesetzten Kardiomyozytenkulturen wurde durch den Vergleich mit Nichtmyozytenkulturen demonstriert: Während AngII in Nichtmyozyten zu

einer deutlichen Phosphorylierung der MAP-Kinasen führte, war in adulten Kardiomyozyten unter denselben Bedingungen keine Phosphorylierung nachweisbar (Abb. 15A und B).

Eigene Ergebnisse bestätigen Unterschiede zwischen beiden Modellen: In neonatalen Kardiomyozyten führte der adrenerge Agonist Phenylephrin (PE), wie zuvor von anderer Seite berichtet, zur Aktivierung NF- κ B und den MAP-Kinasen (Abb. 14C). In adulten Kardiomyozyten hingegen aktivierte PE nur die MAPK, nicht jedoch NF- κ B (Abb. 14B). Demzufolge führt derselbe Stimulus in beiden Modellen zu Aktivierung von unterschiedlichen Signalwegen. Ein anschauliches Beispiel für die Unterschiedlichkeit von neonatalen und adulten Kardiomyozyten *in vivo* stellt die Arbeit von Bowman et al. dar. Während die herzspezifische Überexpression von PKC β in adulten Tieren zu einer moderaten Hypertrophie mit erschwelter, diastolischer Entspannung führte, verursachte die Expression bei Neugeborenen starke Anomalien bezüglich der Regulation intrazellulären Kalziums und den plötzlichen Tod der Tiere (174).

3.2 Die Inhibition der NF- κ B-Aktivität hat keinen Einfluss auf die physiologische Hypertrophie, schützt aber vor pathologischer Hypertrophie

Postnatal verlieren Kardiomyozyten ihre Fähigkeit zur Teilung. Die erhöhten Anforderungen an das Herz durch Wachstum des Organismus werden durch die physiologische Hypertrophie kompensiert (s. Einleitung). In ΔN^{MHC} -Mäusen war die physiologische Hypertrophie des Herzens nach der Geburt nicht vermindert: Echokardiographisch entsprachen die Ausmaße der Herzwände bei den ΔN^{MHC} -Mäusen denen der Kontrollen (Tabelle 3). Ähnliche Befunde sind von anderen Gruppen publiziert worden. Ein gutes Beispiel ist Nab1 (NGF1A-binding protein), ein Mitglied aus der Familie der Repressoren der early growth response (Egr)-Transkriptionsfaktoren. Die herzspezifische Überexpression von Nab1 verhinderte weder die physiologische Hypertrophie bei Kardiomyozyten nach der Geburt noch im adulten Herzen nach Bewegungstraining (175). Hingegen inhibierte überexprimiertes Nab1 die pathologische Hypertrophie nach α/β -adrenerger Kostimulation und nach partieller Aortenligatur (175). Bei den ΔN^{MHC} -Mäusen wurde nur die Hypertrophie nach der Geburt analysiert. Zusätzliche Versuche sind nötig, um die Wirkung der herzspezifischen Inhibition von NF- κ B auf die physiologische Hypertrophie im adulten Organismus zu definieren.

Zur Induktion von pathologischer Hypertrophie wurde in der hier vorgestellten Arbeit u. a. AngII eingesetzt. Im Tiermodell werden für AngII niedrige Dosen, die keine Erhöhung des Blutdrucks zur Folge haben (sog. „subpressure dose“, 0,21 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, (176)) von höheren, blutdrucksteigernden Dosen unterschieden. Die für die Kontroll- oder ΔN^{MHC} -Mäuse

eingesetzte hohe Dosis (1,4 µg/kg/min) hat mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer Erhöhung des Blutdrucks geführt. AngII bewirkt die Erhöhung des Blutdrucks (Hypertonie) durch verstärkte Kontraktion der Blutgefäße, verminderte Ausscheidung von Natrium durch die Niere, Ausschüttung des Vasokonstriktors Vasopressin aus dem Hypothalamus etc. Da in den ΔN^{MHC} -Mäusen NF- κ B ausschliesslich in den Kardiomyozyten inhibiert war, ist die Inhibition der Hypertrophie als Folge einer verminderten Hypertonie eher unwahrscheinlich. Zusätzliche Versuche sind nötig, um diese Annahme zu überprüfen.

Die pathologische Hypertrophie wurde durch die herzspezifische Expression von I κ B α Δ N sowohl nach Kurzzeit (Isoproterenol, AngII) - als auch nach Langzeitstress (partielle Aortenligatur) verhindert. Dies wurde mittels Herzgewichtsbestimmung, Histologie und Echokardiographie nachgewiesen. Auf molekularer Ebene wurde die mRNA-Expression von typischen Hypertrophie markern untersucht. Hierbei zeigten ΔN^{MHC} -Mäuse nach AngII-Gabe eine differentielle Regulation: In AngII-behandelten ΔN^{MHC} -Mäusen war die mRNA-Menge von ANP und β -MHC moderat bzw. deutlich geringer als bei den gleichbehandelten Kontrollen. Im Gegensatz dazu war die Expression von BNP und skeletal Aktin bei AngII-behandelten ΔN^{MHC} - und Kontrollmäusen vergleichbar (Abb. 10). Die differentielle Regulation von Hypertrophie markern in genetischen Hypertrophie modellen wurde bereits von anderen Gruppen berichtet. Die durch herzspezifische Expression von Calcineurin induzierte Hypertrophie wurde in Mäusen durch die gleichzeitige Expression von konstitutiv aktiver GSK-3 inhibiert. Erwartungsgemäß war in den doppelt transgenen Tieren die Expression des Hypertrophie markers β -MHC vermindert; hingegen zeigte sich für die Expression von ANP und BNP sogar eine Erhöhung (88). Ein Grund für die im Vergleich zu scheinoperierten Kontrolltieren erhöhte Expression von ANP und BNP bei AngII-behandelten ΔN^{MHC} -Mäusen könnte die antihypertrophische Wirkung der beiden Peptide sein. ANP und BNP antagonisieren die Hypertrophie-induzierende Wirkung von AngII (177).

Die differentielle Funktion von NF- κ B und anderen Regulatoren bei physiologischer und pathologischer Hypertrophie deutet auf wichtige Unterschiede zwischen normalem und stress-induziertem Herzwachstum. Ein gravierender Unterschied ist die Persistenz des Hypertrophie-induzierenden Stimulus. Während das Herz bei Hochleistungssportlern abwechselnd Belastungs- und Ruhephasen ausgesetzt ist, steht es im Falle einer krankhaften Verengung der Aorta unter permanenter Drucküberbelastung. Letztere führt auf Dauer zu Herzinsuffizienz. Hingegen ist die physiologische Hypertrophie in der Regel reversibel (178).

Es ist unklar, ob einzelne Signalmoleküle bei beiden Hypertrophieformen eine Rolle spielen. Die Überexpression von MCIP1 (myocyte-enriched calcineurin-interacting protein),

einem endogenen Inhibitor von Calcineurin, inhibierte sowohl die durch partielle Aortenligatur-induzierte (94) als auch die Trainings-induzierte Hypertrophie (93). Andere Befunde sprechen dafür, dass Calcineurin nur die pathologische Hypertrophie vermittelt (179).

3.3 NF- κ B und gp 130: Ein Modell für die Verbindung zweier kardialer Zelltypen und zweier prohypertrophischer Signalwege

AngII wirkt nicht nur auf Kardiomyozyten, sondern auch auf kardiale Fibroblasten. Sano et al. fanden, dass AngII in kardialen Fibroblasten zu einer Erhöhung der mRNA-Expression von Mitgliedern der IL-6-Zytokinfamilie führt, darunter IL-6, Leukemia inhibitory factor (LIF) und Cardiotrophin-1 (CT-1). Für IL-6 resultierte dies in einer erhöhten Freisetzung in das Medium (66). Doppelt transgene Mäuse für IL-6 und den IL-6 Rezeptor entwickeln Hypertrophie (77). Eigene Versuche zeigen, dass IL-6, LIF und CT-1 einzeln oder in Kombination in adulten Rattenkardiomyozyten *in vitro* zu einer Aktivierung von NF- κ B führen (Abb. 15A). Demzufolge aktiviert AngII NF- κ B in Kardiomyozyten sowohl direkt als auch indirekt über die Freisetzung von IL-6-Zytokinen aus Fibroblasten. Dies deutet auf eine wichtige Rolle der Fibroblasten bei der AngII-vermittelten Hypertrophie.

In Kardiomyozyten bestand die Verbindung zwischen den prohypertrophischen Signalwegen von NF- κ B und IL-6 einerseits durch die Aktivierung von NF- κ B durch das Zytokin. Daneben bestand eine Regulation des IL-6-Signalweges durch NF- κ B: Bei Adenovirus-vermittelter Expression von I κ B α Δ N in Kardiomyozyten war die mRNA-Expression der Signal-vermittelnden Rezeptoruntereinheit für IL-6-Zytokine, gp130, erniedrigt. Auch in Herzen von von AngII-behandelten Δ N^{MHC}-Mäusen war die gp130 mRNA-Menge im Vergleich zu Kontrollmäusen verringert. Dies hat möglicherweise Auswirkungen auf die gp130 Proteinmenge nach der Stimulation. Umgekehrt könnte dies bedeuten, dass die Hypertrophie-induzierende Wirkung von NF- κ B zumindest teilweise auf einer positiven Regulation des prohypertrophischen IL-6/gp130-Signalweges beruht. Zur Überprüfung dieser Hypothese sind zusätzliche Versuche nötig. Weiterhin ist unklar, ob die Regulation der gp130 Expression durch NF- κ B auf direktem oder indirektem Wege geschieht. Promotorstudien deuten auf eine indirekte Beteiligung. Die potentiellen Verbindungen zwischen beiden Hypertrophie-induzierenden Signalwegen sind in Abb. 20 dargestellt.

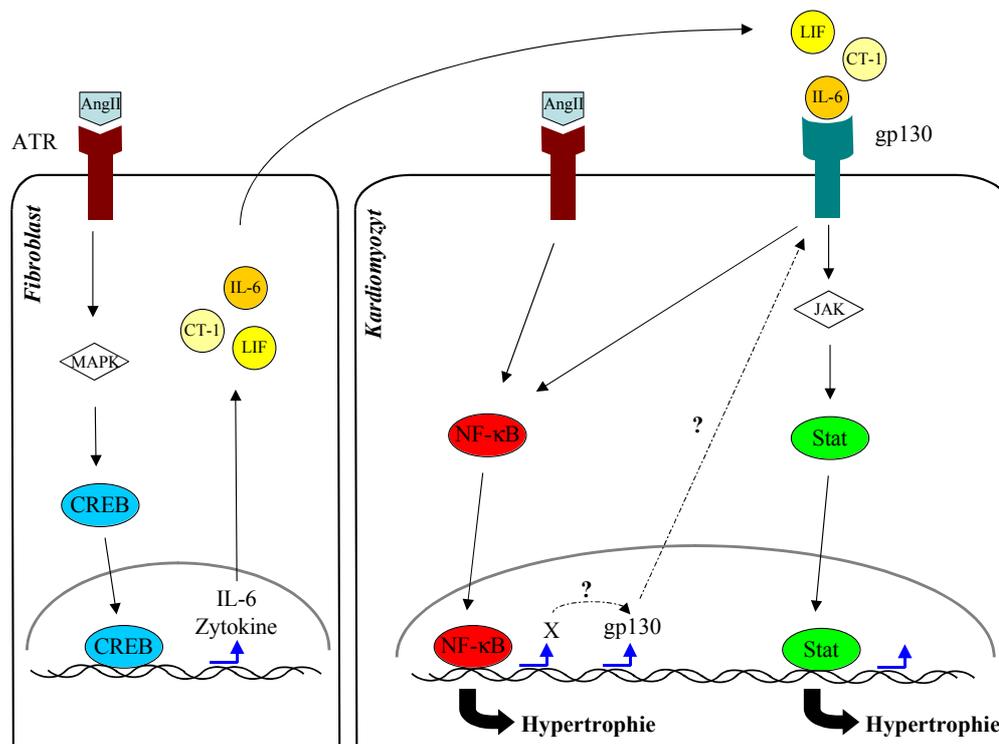


Abb. 20: Modell der Verknüpfung der prohypertropischen Signalwege von NF- κ B und gp 130. AngII aktiviert in kardialen Fibroblasten die MAP-Kinasen (MAPK) und den Transkriptionsfaktor CREB. Diese Signalwege führen zur verstärkten mRNA-Expression von Mitgliedern der Interleukin (IL)-6-Zytokinfamilie: IL-6, Cardiotrophin-1 (CT-1) und Leukemia inhibitory factor (LIF). Diese werden von Fibroblasten (links) sezerniert und aktivieren in Kardiomyozyten (rechts) die prohypertropischen Signalwege von NF- κ B und gp130. NF- κ B wiederum reguliert indirekt die Expression von gp130 auf mRNA-Ebene. Weitere Abkürzungen: Januskinase (JAK), Signal transducer and activator of transcription (STAT). Ein durchgängiger Pfeil bedeutet nicht zwangsläufig eine direkte Interaktion zwischen zwei Molekülen.

3.4 NF- κ B: Ein Überlebensfaktor für Kardiomyozyten *in vivo* und *in vitro*?

Eine entscheidende Frage bei den ΔN^{MHC} -Mäusen war die Auswirkung der Inhibition von NF- κ B auf die Apoptose von Kardiomyozyten. NF- κ B ist für verschiedene Zelltypen als Überlebensfaktor beschrieben worden, der vor Apoptose schützt. Ein anschauliches Beispiel stellen Tumore mit konstitutiver Aktivierung von NF- κ B dar, deren Sensitivität gegenüber Apoptose verringert ist (180). Die antiapoptotische Wirkung von NF- κ B beruht auf der Kontrolle der Expression verschiedener antiapoptotischer Proteine; dazu zählen die inhibitors of apoptosis (c-IAPs), c-FLIP (Flice inhibitory protein), Mitglieder der Bcl-2 Familie etc. (134). Für Kardiomyozyten wurde NF- κ B bereits als Überlebensfaktor unter *in vivo* Bedingungen beschrieben: Bei transgenen Mäusen mit Kardiomyozyten-spezifischer Inhibition von NF- κ B war die Infarktgröße nach Verschluss eines Herzkranzgefäßes nach 24 Stunden im Vergleich zu Wildtypmäusen nahezu verdoppelt. Ursache hierfür war eine gesteigerte Apoptose bei Kardiomyozyten. Die Proteinmengen an c-IAP1 und Bcl-2 waren in diesen Mäusen signifikant erniedrigt (139).

In den in dieser Arbeit verwendeten ΔN^{MHC} Mäusen konnte nach AngII-Stimulation mittels TUNEL-Test und echokardiographisch keine gesteigerte Apoptose festgestellt werden. Für das Ausbleiben der Apoptose kommen mehrere Möglichkeiten in Betracht: Erstens ist denkbar, dass die Inhibition von NF- κ B nicht vollständig war, d. h., dass eine gewisses Restpotential zur Aktivierung von NF- κ B bestand. Ähnliches ist bereits für die ebenfalls in dieser Arbeit verwendeten ΔN^{ubi} Mäuse postuliert worden. 20% der ΔN^{ubi} -Embryonen sterben vor der Geburt aufgrund von erhöhter Apoptose in der Leber ((128), hier mit $c^{\text{IkB}\alpha\Delta N}$ bezeichnet). Bei den überlebenden Mäusen könnte diese durch eine Restaktivität von NF- κ B begrenzt worden sein (128). Ähnliches könnte für die ΔN^{MHC} Mäuse gelten, bei denen die herzspezifische Expression von $\text{IkB}\alpha\Delta N$ relativ schwach war. In Gesamtherzextrakten von ΔN^{MHC} Mäusen betrug das Verhältnis von endogenem $\text{IkB}\alpha$ - zu $\text{IkB}\alpha\Delta N$ -Protein ungefähr 5,3:1 (Abb. 7, ImageJ-Programm). Im Vergleich dazu war das Verhältnis bei ΔN^{ubi} Mäusen ungefähr 2:1. Letztere exprimieren $\text{IkB}\alpha\Delta N$ allerdings auch in Nichtmyozyten, deren Anteil an der gesamten Zellpopulation des Herzens ungefähr zwei Drittel ausmacht. Ein direkter Vergleich ist schwierig, da die $\text{IkB}\alpha\Delta N$ -Expressionsniveaus in den verschiedenen Zelltypen nicht untersucht wurden. Vielmehr müssten die Verhältnisse in isolierten Kardiomyozyten von beiden Maustämmen bestimmt werden.

Eine zweite Erklärungsmöglichkeit für das Ausbleiben der Apoptose ist, dass AngII als Stressstimulus *in vivo* nicht ausreicht, um in $\text{IkB}\alpha\Delta N$ -exprimierenden Kardiomyozyten Apoptose zu induzieren. Misra et al. berichteten, dass Mäuse mit einer herzspezifischen Expression von $\text{IkB}\alpha\Delta N$ nach Infarkt verstärkt Apoptose im Vergleich zu Wildtyptieren haben (139). Allerdings stellt der durch Verschluss eines Herzkranzgefäßes verursachte Infarkt eine viel drastischere Stresssituation für das betroffene Gewebe dar: Es kommt zu einer reduzierten Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie dem verlangsamten Abtransport von nekrotischen Zellen und Metaboliten (15). Zusätzlich werden beim Infarkt inflammatorische Zytokine wie TNF- α vermehrt freigesetzt (181). TNF- α aktiviert sowohl proapoptotische als auch NF- κ B als antiapoptisches Signalmolekül (158).

Ein besonderer Überlebensschutz adulter Kardiomyozyten erscheint sinnvoll, da es sich um enddifferenzierte Zellen handelt, die sich in der Regel nicht mehr teilen. Auch die Regeneration über Stammzellen ist begrenzt (182). Dies hat zur Folge, dass verlorene Kardiomyozyten kaum ersetzt werden können. In dem Maße wie bei diesen Zellen die Möglichkeit zur Proliferation durch Arretierung des Zellzyklus gehemmt ist (s. Kapitel Einleitung), sollte auch die Möglichkeit zum programmierten Zelltod streng reguliert sein.

Für diese Annahme spricht auch die Tatsache, dass in p65 knockout Mäusen Apoptose in Leberzellen, nicht jedoch in Herzzellen festgestellt wurde (123). Die Leber ist im Gegensatz zum Herzen ein Organ mit großer Regenerationsfähigkeit (183).

Auch *in vitro* wurde die Anfälligkeit von adulten Kardiomyozyten gegenüber Apoptose getestet. Weder die Expression von $I\kappa B\alpha\Delta N$ alleine noch in Verbindung mit $TNF-\alpha$ führte zu vermehrtem programmierten Zelltod. Diese Ergebnisse unterstreichen die besondere Apoptoseresistenz dieses Zelltyps. Sie stehen allerdings im Widerspruch mit Ergebnissen von Versuchen mit neonatalen Kardiomyozyten. Hier induzierte $TNF-\alpha$ in $I\kappa B\alpha\Delta N$ -exprimierenden Zellen Apoptose (135,136). Die im vorhergehenden Abschnitt geäußerte Hypothese, dass der Differenzierungsgrad von Zellen mit ihrer Apoptoseresistenz korreliert, könnte auch die Unterschiede zwischen neonatalen und adulten Kardiomyozyten erklären: Im Gegensatz zu den enddifferenzierten, adulten Kardiomyozyten besitzen die undifferenzierten, neonatalen Kardiomyozyten noch die Fähigkeit zur Teilung (s. Einleitung). Für diese Hypothese sprechen auch die *in vivo* Ergebnisse von Syed et al. (184). In dieser Arbeit wurde das proapoptotische Mitglied der Bcl-2-Familie, Nix, sowohl bei neugeborenen als auch bei adulten Mäusen herzspezifisch überexprimiert. In neonatalen Mäusen verursachte Nix eine deutlich erhöhte Apoptose mit nachfolgender Dilatation des Ventrikels. Bei adulten Mäusen bewirkte eine vergleichbare Überexpression von Nix hingegen nur eine geringe Steigerung der Apoptose, die sich nur minimal auf die Herzmorphologie auswirkte (184).

3.5 NF- κ B und andere Hypertrophiemoleküle: Welche eignen sich potentiell für die pharmakologische Inhibition?

Ähnlich wie bei NF- κ B besteht bei vielen bisher identifizierten Signalwegen, die eine Rolle bei der Hypertrophie spielen, ein enger Zusammenhang zur Apoptose. Dies ist zum Beispiel für gp130 und Calcineurin beschrieben worden: Mäuse mit konstitutiver Aktivierung von gp130 durch Überexpression von IL-6 und IL-6R entwickeln Hypertrophie (77). Gleichzeitig wirkt gp130 antiapoptotisch: Die herzspezifische Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 α , über den das Signal von gp130 zum Kern geleitet wird, führt zu moderater Hypertrophie bei gleichzeitiger Resistenz gegenüber Doxorubizin-induzierter Apoptose (100). Im Einklang damit verursacht Drucküberbelastung bei Mäusen mit herzspezifischem Knockout von gp130 die Apoptose von Kardiomyozyten mit nachfolgender Herzinsuffizienz und verringerter Überlebensrate (185).

Die Kalzium-aktivierte Phosphatase Calcineurin hat ebenfalls eine Wirkung sowohl auf die Hypertrophie als auch auf das Überleben von Kardiomyozyten. Mäuse mit herzspezifischer

Überexpression von Calcineurin entwickeln Hypertrophie und sind vor durch Ischämie-Reperfusion-induzierter Apoptose geschützt (109).

Eine Inhibition genannter Moleküle würde zwar die Hypertrophie verhindern; gleichzeitig wäre eine vermehrte Apoptose bei Kardiomyozyten zu erwarten. Im Gegensatz dazu reichte die Inhibition von NF- κ B in dem in dieser Arbeit verwendeten Mausmodell aus, um die GPCR-induzierte Hypertrophie zu unterbinden; gleichzeitig ergaben sich keine kurzfristigen negativen Folgen für das Überleben der Kardiomyozyten.

Für eine pharmakologische Inhibition von Hypertrophie kommen nur Moleküle in Betracht, die die pathologische, nicht aber die physiologische Hypertrophie verursachen. NF- κ B wäre hierfür ein guter Kandidat, falls die herzspezifische Expression von I κ B α Δ N keine Auswirkung auf die Ausbildung der Hypertrophie nach Bewegungstraining beim adulten Organismus zeigt.

Zur pharmakologischen Inhibition von NF- κ B bei der Hypertrophie *in vivo* wurde bereits das Antioxidans Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) eingesetzt. In Herzen von spontan hypertensiven Ratten wird die erhöhte DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B durch PDTC vermindert (186). PDTC, das von Beginn der Induktion der Drucküberbelastung bis zum Versuchsende verabreicht wurde, verminderte bei einer 50%igen Inhibition der NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität die Hypertrophie ebenfalls um die Hälfte (172). Weiterhin wurde gezeigt, dass PDTC zu einer teilweisen Regression einer bereits ausgebildeten Hypertrophie führen kann. In spontan hypertensiven Ratten führte die Gabe von PDTC zur einer moderaten Reduktion des Herzgewichtes (187). Es ist nicht eindeutig erwiesen, dass die beschriebene Wirkung von PDTC nur auf der Inhibition von NF- κ B beruht. Vielmehr scheint PDTC auch andere Signalmoleküle zu beeinflussen. In glatten Gefäßmuskelzellen aktiviert PDTC die Stresskinasen p38 und JNK (188). In der HeLa-Zelllinie inhibierte PDTC die Proteasom-abhängige Proteolyse (189).

Der Einsatz von spezifischeren NF- κ B-Inhibitoren ist nötig, um die Wirkung einer systemischen Inhibition auf die Hypertrophie *in vivo* zu testen. Dazu eignen sich zum Beispiel Inhibitoren des IKK-Komplexes, von denen bereits einige entwickelt wurden. In den Δ N^{MHC}-Mäusen war die Expression von I κ B α Δ N nur relativ schwach. Dennoch war dies ausreichend, um die Hypertrophie zu verhindern ohne gleichzeitig vermehrt Apoptose zu verursachen. Demnach könnte für die pharmakologische Inhibition die Dosierung von entscheidender Bedeutung sein. Weiterhin muss die Wirkung einer systemischen Inhibition von NF- κ B im adulten Organismus untersucht werden.