

VII. Anhang

7.1 Zusammenfassung

Adulte Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) sind enddifferenzierte Zellen, die die Fähigkeit zur Teilung verloren haben. Im Falle einer erhöhten Arbeitsbelastung des Herzens kommt es folglich nicht zu einer Bildung neuer Kardiomyozyten durch Proliferation, sondern zu einem Größenwachstum der vorhandenen Kardiomyozyten, das in einer Vermehrung der kontraktilen Einheiten pro Zelle resultiert (Hypertrophie). Obwohl die Hypertrophie zunächst die Herzfunktion verbessert, stellt sie langfristig ein erhöhtes Risiko für die Herzinsuffizienz dar. Aktuelle Behandlungsmethoden von Herzinsuffizienz in der Klinik beschränken sich auf die Blockade von Oberflächenrezeptoren. Es besteht jedoch weiterhin eine erhöhte Mortalität. Daher stellen in der Signalkaskade stromabwärts zu findende Signalmoleküle, insbesondere Transkriptionsfaktoren, potentiell geeignetere Ziele zur Behandlung der Herzinsuffizienz dar.

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wird durch inflammatorische Zytokine, mikrobielle Pathogene, morphogenetische Signale, Zellstress und Wachstumsfaktoren aktiviert. Bisher veröffentlichte *in vitro* Arbeiten deuteten darauf hin, dass NF- κ B Hypertrophie induzieren kann. Dabei blieb unklar, ob dies auch für die Hypertrophie *in vivo* gilt. Zusätzlich wurde NF- κ B im Herzen als antiapoptotisch beschrieben.

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war die Untersuchung der Funktion von NF- κ B bei der Hypertrophie und der Apoptose *in vivo*. Dazu wurde NF- κ B herzspezifisch inhibiert. Dies erfolgte durch Kardiomyozyten-spezifische Expression des NF- κ B-Superrepressors I κ B α Δ N mit Hilfe des Cre/loxP-Systems.

Mäuse mit Kardiomyozyten-spezifischer Expression von I κ B α Δ N (Δ N^{MHC} Mäuse) hatten unter basalen Bedingungen im Vergleich zu Kontrolltieren keine veränderten Herzen, wie mittels Echokardiographie und histologischen Schnitten gezeigt wurde. Durch Immunhistochemie wurde nachgewiesen, dass die Aktivierung von NF- κ B in Kardiomyozyten von Δ N^{MHC} Mäusen nach Stimulation mit TNF- α unterdrückt war. Hypertrophie wurde durch Angiotensin II (AngII) oder den β -adrenergen Agonist Isoproterenol induziert, die durch implantierte, mikroosmotische Pumpen für 14 bzw. 7 Tage verabreicht wurden. In Kontrolltieren induzierte AngII erwartungsgemäß Hypertrophie, wie mittels Histologie, Echokardiographie, Bestimmung des Herzgewichtes und der Quantifizierung der mRNA-Expression von Hypertrophie markern nachgewiesen wurde. Im Gegensatz dazu entwickelten Δ N^{MHC} Mäuse keine Hypertrophie. Zusätzlich verursachte die

Inhibition von NF- κ B *in vivo* nach AngII-Gabe keine erhöhte Apoptose bei Kardiomyozyten, wie mittels TUNEL-Test und Echokardiographie nachgewiesen wurde. Auch die typischerweise durch AngII-induzierte perivaskuläre Infiltration von inflammatorischen Zellen war durch die kardiomyozyten-spezifische Inhibition von NF- κ B nicht betroffen.

Auch die durch Langzeitstress-induzierte Hypertrophie, die durch eine zweimonatige Drucküberbelastung des Herzens mittels Aortenkonstriktion bewirkt wurde, war in den ΔN^{MHC} Mäusen inhibiert.

Ein weiteres Ziel der Doktorarbeit war die Untersuchung von Hypertrophie-Signalwegen in adulten Kardiomyozyten in Kultur. In adulten Rattenkardiomyozyten *in vitro* induzierten physiologische Konzentrationen von AngII eine moderate Steigerung der NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität. Die induzierten Heterodimere bestanden aus den NF- κ B-Untereinheiten p65 und p50.

Aus der Literatur war bekannt, dass Ang II bei Fibroblasten aus dem Herzen die Expression von Zytokinen der Interleukin(IL)-6 Familie steigert, und diese Zytokine zu AngII-induzierter Hypertrophie beitragen. In eigenen Versuchen mit adulten Rattenkardiomyozyten *in vitro* konnte gezeigt werden, dass verschiedene Mitglieder der IL-6-Familie die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B steigern. Demnach aktiviert AngII NF- κ B in adulten Rattenkardiomyozyten *in vitro* sowohl direkt als auch indirekt durch IL-6-Zytokine.

Als Mass der Hypertrophie *in vitro* wurde die Proteinsynthese mittels Einbau der radioaktiv markierten Aminosäure Leucin untersucht. Wider Erwarten konnte nach AngII-Gabe mit dieser Methode keine Hypertrophie nachgewiesen werden. Dies war jedoch nach FCS-Stimulation der Fall. Um die Rolle von NF- κ B bei der Hypertrophie *in vitro* zu untersuchen, wurde $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ in diesen Zellen mittels adenoviralem Transfer exprimiert. Die Inhibition von NF- κ B hatte keinen Einfluss auf die FCS-induzierte Hypertrophie.

Mittels adenoviraler Expression von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ wurde auch die Wirkung der Inhibition von NF- κ B in Bezug auf die Apoptose in adulten Rattenkardiomyozyten untersucht. Weder die Expression von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ alleine noch die gleichzeitige Stimulation mit TNF- α führte zu einer gesteigerten Apoptose im TUNEL-Test. Hingegen induzierte das als Positivkontrolle eingesetzte Doxorubicin erwartungsgemäß Apoptose.

Zur Identifizierung von potentiellen prohypertrophischen Zielgenen von NF- κ B wurde eine Gen-Chipanalyse durchgeführt. In Rattenkardiomyozyten, in denen NF- κ B inhibiert war, war die mRNA-Menge von gp130 reduziert. gp130 ist die signalvermittelnde Untereinheit des IL-6-Rezeptors und verursacht bekanntermaßen Hypertrophie. Mittels realtime RT-PCR wurde

die Reduktion der gp130 mRNA-Mengen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestätigt. Auf Proteinebene war die Menge an gp130 in Kardiomyozyten von ΔN^{MHC} Mäusen nicht unter basalen Bedingungen, jedoch nach 30minütiger Kostimulation mit AngII und IL-6 reduziert. Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal *in vivo*, dass die Kardiomyozyten-spezifische Inhibition von NF- κ B die Hypertrophie sowohl nach Kurzzeit- als auch nach Langzeitstress verhindert. Gleichzeitig wurde keine erhöhte Apoptose festgestellt. Zukünftige Experimente müssen zeigen, ob auch die pharmakologische Inhibition von NF- κ B die Hypertrophie *in vivo* verhindern kann.

7.2 Summary

Adult cardiomyocytes are terminally differentiated cells which have lost the ability to undergo cell division. Thus, these cells respond to work overload with an increase in cell size, which is accompanied by a higher number of contractile units per cell (hypertrophy). Hypertrophy may eventually lead to heart failure. Current heart failure treatment relies on potent cell surface blockade of the renin-angiotensin and the β -adrenergic system. As mortality remains elevated, downstream molecules such as transcription factors may represent more specific drug targets.

The ubiquitous transcription factor NF- κ B is activated by inflammatory cytokines, pathogens, cellular stress and growth factors. *In vitro* experiments with neonatal cardiomyocytes proposed a potential role for NF- κ B in cardiac hypertrophy. Furthermore NF- κ B was described as a survival factor for the heart.

The aim of this thesis was to investigate the function of NF- κ B in cardiac hypertrophy and apoptosis *in vivo*. Therefore NF- κ B was inhibited in a heart-specific manner by use of the Cre/loxP system. Mice with cardiomyocyte-specific expression of the NF- κ B superrepressor I κ B α Δ N (ΔN^{MHC} -mice) had normal hearts under baseline conditions, as determined by echocardiography and gross morphology. In isolated cardiomyocytes of ΔN^{MHC} -mice I κ B α Δ N effectively inhibited nuclear translocation of NF- κ B-p65 after stimulation with TNF- α . In order to induce cardiac hypertrophy in mice, microosmotic pumps were implanted subcutaneously, releasing angiotensin II (AngII) or the β -adrenergic agonist isoproterenol (Iso) during 14 or 7 days, respectively. As expected, AngII caused hypertrophy in control animals as assessed by histology, echocardiography, heart weight and quantitation of mRNA-expression of hypertrophic marker genes. In contrast, ΔN^{MHC} -mice did not mount a hypertrophic response. This was also true after stimulation with Iso. In addition, inhibition of

NF- κ B *in vivo* did not result in increased apoptosis of cardiomyocytes as tested by TUNEL assay and echocardiography. Finally, AngII-induced perivascular inflammation was not altered in ΔN^{MHC} -mice. Thus, NF- κ B is specifically involved in the hypertrophic response of cardiomyocytes to AngII. In order to generate longterm cardiac stress, pressure overload was induced by partial aortic constriction (TAC). In contrast to control mice ΔN^{MHC} -mice did not develop hypertrophy after 8 weeks of TAC.

To study signal transduction involving AngII and NF- κ B *in vitro*, isolated adult rat cardiomyocytes were used. Physiological concentrations of AngII activated NF- κ B p50 and p65, as determined by electrophoresis mobility shift assay (EMSA). Importantly, apart from AngII different members of the IL-6 cytokine family induced NF- κ B-DNA binding activity. These cytokines are known to be released by cardiac fibroblasts upon AngII stimulation.

The measurement of protein synthesis was used to study the function of NF- κ B in cardiac hypertrophy in isolated adult cardiomyocytes. Unexpectedly AngII did not induce an increase in protein synthesis in these cells. Although FCS induced increased cardiomyocyte protein synthesis, this process was independent of NF- κ B because adenoviral expression of I κ B α Δ N had no effect. Furthermore, in contrast to neonatal cardiomyocytes, inhibition of NF- κ B in adult cardiomyocytes did not increase apoptosis after stimulation with TNF- α .

A microarray assay revealed that in adult rat cardiomyocytes with inhibited NF- κ B activity the mRNA of gp130 was downregulated. gp130 is the signaltransducing subunit of the receptors for ligands of the IL-6 cytokine family and has been shown to mediate cardiac hypertrophy. Downregulation of gp130 mRNA after blocking NF- κ B activity *in vitro* and *in vivo* was confirmed by realtime RT-PCR. Interestingly, gp130 protein levels were unchanged in cardiomyocytes of ΔN^{MHC} -mice under basal conditions, but were diminished 30 min after stimulation of gp130 in comparison to stimulated cells of control animals. Further experiments are needed to confirm the hypothesis that gp130 is a prohypertrophic downstream target of NF- κ B.

This is the first report showing that cardiomyocyte-specific inhibition of NF- κ B prevents hypertrophy without causing apoptosis *in vivo*. Future studies have to proof if NF- κ B represents an effective target for the pharmacological inhibition of hypertrophy.

7.3 Publikationen

Teile dieser Arbeit sind in folgende Publikationen eingegangen:

Freund C, Schmidt-Ullrich R, Baurand A, Dunger S, Schneider W, Loser P, El-Jamali A, Dietz R, Scheidereit C, Bergmann MW.

Requirement of nuclear factor-kappaB in angiotensin II- and isoproterenol-induced cardiac hypertrophy *in vivo*. *Circulation*. 2005 May 10;111(18):2319-25.

El Jamali A, Freund C, Rechner C, Scheidereit C, Dietz R, Bergmann MW.

Reoxygenation after severe hypoxia induces cardiomyocyte hypertrophy *in vitro*: activation of CREB downstream of GSK3beta. *FASEB J*. 2004 Jul;18(10):1096-8.

7.4 Danksagung

Bei Martin und Claus möchte ich mich herzlich bedanken für das spannende Thema der Doktorarbeit, das stetige Interesse und die vielfältigen Anregungen, die für ihr Gelingen unerlässlich waren. Bei Martin bedanke ich mich zudem für die praktische Unterstützung sowie die gute Arbeitsatmosphäre im Labor.

Ruth danke ich sehr für ihre praktischen Ratschläge, die Diskussionen, die moralische Unterstützung und die ungezählten Mittagstischrunden.

Bei Anthony, Bärbel, Russel und Sandra bedanke ich mich besonders für die nette Arbeitsatmosphäre im Labor und auch für die praktische Unterstützung u. a. bei der Fertigstellung der Publikation.

Bei den folgenden Mitgliedern der Labore Bergmann/Scheidereit möchte ich mich für diverse kleinere und größere (un)wissenschaftliche Beiträge und für die angenehme Zusammenarbeit bedanken: Amina, Andrea, Anette, Benjamin, Daniela, Daniel, Elmar, Erika, Eva, Jan, Joshi, Karin, Liron, Meike, Michael (2x), Mira, Norbert, Rudolf, Sabine, Sarah, Sebastian, Seda, Vigo.

Schliesslich danke ich auch meiner Familie und meinen Freunden für ihre großartige Unterstützung.