

III) Diskussion

Bei den hier zusammengefassten Arbeiten wurde mit den Methoden der Molekularen Medizin der Wirkungsmechanismus von Glukokortikoiden bei chronisch entzündlichen Erkrankungen sowie der Effekt von Statinen und β -Blockern im Rahmen des myokardialen Remodellings untersucht. Darüber hinaus wurden neue Erkenntnisse zur spezifischen Rolle der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, CREB und β -catenin bei der Pathogenese dieser beiden Erkrankungsgruppen vorgestellt. Die Publikationen legen die Grundlage für eine Reihe von Anschlussarbeiten in Richtung eines tiefer gehenden pathophysiologischen Verständnisses sowie möglicher Therapieansätze.

Die Erkenntnisse zur NF- κ B Regulation durch nicht-klassische Mitglieder der Protein Kinase C Familie, der MAPK p38 sowie der PC-PLC erschließen neue Möglichkeiten zur Inhibition und Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors und sind damit von grundlegender Bedeutung. Da im Zusammenhang mit verschiedenen onkologischen Erkrankungen spezifische Inhibitoren dieser Signalmoleküle entwickelt wurden, muss in der Untersuchung der klinischen Wirkung dieser Substanzen eine Beeinflussung des NF- κ B Signalweges berücksichtigt werden. Zudem kann die Identifizierung organ-spezifischer PKC-Isoformen eine gezielte Beeinflussung des NF- κ B Signalweges ermöglichen. Das hier beschriebene Reporter-gen-system kann auch verwendet werden, um im Zusammenhang mit der Rolle von NF- κ B im Rahmen der myokardialen Hypertrophie eine Strategie zur herzspezifischen Inhibition zu entwickeln.

Die Arbeiten zum molekularen Wirkmechanismus von Glukokortikoiden verändern das gültige Model der hochpotenten anti-inflammatorischen Wirkung über eine direkte NF- κ B Inhibition. Die Daten fügen sich ein in eine Reihe von neueren Publikationen, die alternative molekulare Mechanismen beschreiben. Einige Untersuchungen weisen auf eine Beeinflussung von Histon Deacetylasen hin, die in der Folge einen breiten Effekt auf die Gentranskription haben (Ito et al., 2000). Allerdings erklären diese Ergebnisse noch nicht den hier nachgewiesenen Effekt auf die post-transkriptionelle Regulation pro-inflammatorischer Zytokine durch Glukokortikoide. Dieser Effekt steht am ehesten im Zusammenhang mit spezifischen Proteinbindungen an das AU-reiche Element (ARE) der mRNA dieser Zytokine. ARE-bindende Proteine regulieren nicht nur die mRNA Halbwertszeit sondern auch unabhängig davon die Rate der Protein-Translation. Die

Untersuchung von zwei spezifischen ARE-bindenden Proteinen in unseren Arbeiten zeigte jedoch keine Regulation durch Dexamethason (Bergmann et al., 2004b; Bergmann et al., 2004c). Weitere Untersuchungen sind daher notwendig, um den molekularen Mechanismus zu identifizieren. Möglicherweise können hier neu gewonnene molekularbiologische Möglichkeiten, die unter den Stichworten „Genomics“ und „Proteomics“ zusammengefasst werden, neue Ansätze liefern. Das gesuchte Protein wird entweder auf transkriptioneller Ebene durch den intrazellulären Glukokortikoidrezeptor reguliert oder beeinflusst durch eine direkte Protein-Proteinbindung die ARE-gesteuerte Translation.

Die vorgestellten Daten zeigen *in vitro* eine Rolle von NF- κ B als Überlebensfaktor im Zusammenhang mit der Apoptose von Kardiomyozyten. Zusammenfassend lassen die bisher veröffentlichten Arbeiten zu diesem Thema jedoch zwei mögliche Szenarien zu:

- 1) *in vivo* führt eine NF- κ B Inhibition zur beschleunigten Entwicklung einer Herzinsuffizienz, da die Apoptose-Rate gesteigert wird.
- 2) *in vivo* bremst eine NF- κ B Inhibition die Entwicklung einer Herzinsuffizienz, da die myokardiale Hypertrophie unterdrückt wird.

Um die Rolle von NF- κ B bei der Vermittlung anti-apoptotischer und anti-hypertropher Effekte im Rahmen der Herzinsuffizienz zu klären, hat die Arbeitsgruppe daher in Kooperation mit der MDC-Arbeitsgruppe „Transkriptionsfaktoren“ (Prof. Dr. C. Scheidereit) ein transgenes Mausmodell etabliert. Dabei wurde das Cre/lox System verwendet, welches eine herzspezifische Expression eines Transgen oder die Deletion eines Exons gestattet (Minamino et al., 2001). Mit Hilfe dieses Systems wurde eine Maus mit herzspezifischer Expression des NF- κ B Inhibitors I κ B α Δ N generiert. Die Rolle dieses Transkriptionsfaktors bei myokardialer Apoptose und Hypertrophie konnte in diesem Model *in vivo* untersucht werden. Die erarbeiteten Daten sind zur Veröffentlichung eingereicht und bestätigen die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF- κ B im myokardialen Remodelling. Die Daten zeigen eine Unterdrückung der Hypertrophie ohne Nachweis einer vermehrten Apoptose. Im nächsten Schritt soll nun mit Hilfe spezifischer NF- κ B Inhibitoren im Tiermodell untersucht werden, ob sich aus der Unterdrückung der NF- κ B Aktivierung ein neues Therapiekonzept der Herzinsuffizienz entwickeln lässt.

Die experimentelle Schlussfolgerung der Aktivierung des PI3-kinase/AKT Signalpfades durch Statine in Kardiomyozyten ist die Überprüfung der Bedeutung des Transkriptionsfaktors β -catenin im Tiermodell. Die Arbeitsgruppe hat eine transgene Maus mit induzierbarer, herzspezifischer Deletion des Transkriptionsfaktors β -catenin generiert. Hiermit wird es möglich, die Rolle von β -catenin im Rahmen des anti-apoptotischen Effektes von Statinen spezifisch zu überprüfen. Eine Reihe von in vitro Daten weist zudem auf eine interessante Rolle dieses Faktors bei der Differenzierung von myokardialen Progenitorzellen hin (Nakamura et al., 2003).

Die klinische Konsequenz des hier gezeigten direkten Effektes von Statinen auf das Überleben von Kardiomyozyten sind Studien zur Statin-Therapie der Herzinsuffizienz unabhängig vom Vorliegen einer Arteriosklerose. Auf Grund von klinischen Beobachtungen wurden vor kurzer Zeit eine Reihe von Studien zu diesem Thema initiiert, deren Ergebnisse in Kürze zur Verfügung stehen sollten (Yeung and Tsao, 2002). Wichtiger Endpunkt dieser Studien wird dabei die Entwicklung der linksventrikulären Funktion sein. Sollte sich tatsächlich ein positiver Effekt von Statinen bei dieser Indikation nachweisen lassen, stellt der hier beschriebene Signaltransduktionsweg einen möglichen Mechanismus dar.

Die Daten bezüglich der Hypoxie-induzierten Hypertrophie führen zu der Schlussfolgerung, dass die Blockade des β 2-Adrenorezeptors einen anti-hypertrophen Effekt hat. Eine Reihe von Publikationen kommt zu dem Schluss, dass die Aktivierung des β 1-Adrenorezeptors vor allem die Apoptose von Kardiomyozyten induziert (Communal et al., 1999). Klinisch sollte daher die Blockade des β 1- und β 2-Adrenorezeptors der alleinigen β 1-Blockade im Hinblick auf die Entwicklung und Progredienz einer Herzinsuffizienz überlegen sein. Tatsächlich wurde im direkten Vergleich des β 1-selektiven Antagonisten Metoprolol mit dem nicht-selektiven β -Blocker Carvedilol in einem Rattenmodell koronarer Ischämie ein Vorteil zugunsten von Carvedilol gefunden (Yaoita et al., 2002). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine multizentrische, klinische Studie; allerdings wurde hier im Metoprolol-Arm eine zu niedrige Dosierung gewählt (Poole-Wilson et al., 2003).

Zur Rolle der GSK3 β bei der Hypertrophie von Kardiomyozyten existieren genetische Daten, die eine entscheidende Rolle bei der myokardialen Hypertrophie belegen (Antos et al., 2002). Ob hierbei CREB das entscheidende Zielprotein ist, muss in weiteren Untersuchungen geklärt

werden. Auch hier bietet sich ein transgenes Tiermodell der induzierbaren, herzspezifischen Deletion der DNA-bindenden Domäne an.

Zusammenfassend zeigen die hier vorgelegten Arbeiten exemplarisch wie die Verknüpfung klinischer Daten mit molekularen Ansätzen zur Entwicklung neuer Hypothesen zu Pathomechanismus und Therapie chronischer Erkrankungen wie das Asthma bronchiale und der Herzinsuffizienz führen kann. Die vorgestellten Arbeiten lassen sich auch mit dem zweiten Teil des Terminus „the full circle: from bench to bedside – and back to bench“ zusammenfassen, der von einigen Autoren als eine wichtige Entwicklungs-Strategie in der Molekularen Medizin erachtet wird. Die bisher auf Rezeptoren der Zelloberfläche gerichtete Therapie der Herzinsuffizienz mit β -Blockern und ACE-Hemmern kann in Zukunft möglicherweise um eine auf die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren gerichtete Therapie ergänzt werden. Die prinzipielle Eignung von Transkriptionsfaktoren als Zielproteine einer pharmakologischen Behandlung kann seit Einführung von spezifischen Aktivatoren des Transkriptionsfaktors PPAR- γ , so genannter Glitazone, in die Behandlung des Diabetes mellitus Typ II als erwiesen gelten. Auch dieser Faktor scheint eine Rolle im Rahmen der Hypertrophie von Herzmuskelzellen zu spielen (Yamamoto et al., 2001). Die hier untersuchten Faktoren NF- κ B, CREB und β -catenin sind als mögliche Zielproteine einer pharmakologischen Therapie der Herzinsuffizienz geeignet, da sie wesentliche Signalkaskaden integrieren. Nach den Zellkulturversuchen steht hier als nächster Schritt die Überprüfung der Hypothesen im transgenen Mausmodell an, gefolgt von der Identifizierung geeigneter Signalmoleküle zur organ-spezifischen Beeinflussung der Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren.

IV) Zusammenfassung

Die hier zusammengefassten molekularen Arbeiten lassen sich vor dem klinischen Hintergrund des Asthma bronchiale und der Herzinsuffizienz unter zwei Leitgedanken subsumieren:

- 1) Pathophysiologisch bedeutsame Signaltransduktionswege münden in die Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren, deren pharmakologische Inhibition eine neue therapeutische Option darstellen könnte.

- 2) Die Untersuchung der molekularen Wirkmechanismen etablierter pharmakologischer Therapieansätze im Hinblick auf die beeinflussten Transkriptionsfaktoren kann dazu beitragen, bisher unberücksichtigte klinische Effekte zu identifizieren.

Das Asthma bronchiale ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des Bronchialepithels. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B steuert die Aktivierung einer Vielzahl von pro-inflammatorischen Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmolekülen. Die Untersuchung der NF- κ B Aktivierungswege identifizierte die Faktoren PC-PLC, PKC und MAPK p38 als entscheidende Signalmoleküle, die die NF- κ B abhängige Transkription zusätzlich zur Proteasom-vermittelten Degradation der inhibitorischen Untereinheit I κ B α steuern. Der durch eine NF- κ B Bindungsstelle in seinem Promotor regulierte Wachstumsfaktor GM-CSF wurde im folgenden verwendet, um den Mechanismus der hochpotenten anti-inflammatorischen Wirkung von Glukokortikoiden auf molekularer Ebene zu klären. Es konnte kein Effekt von Dexamethason auf die NF- κ B Aktivierung in T-Zellen gefunden werden. Vielmehr inhibiert Dexamethason die GM-CSF Freisetzung von T-Zellen auf post-transkriptioneller Ebene.

Der klinisch manifesten Herzinsuffizienz geht auf molekularer Ebene häufig ein einheitlicher Kompensationsmechanismus voraus: die gemeinsame Endstrecke einer chronischen Druck- oder Volumenbelastung sowie einer ischämischen Herzerkrankung ist die myokardiale Hypertrophie. Die Vermehrung der kontraktile Elemente einer einzelnen Herzmuskelzelle kann jedoch nur vorübergehend das Defizit an Herzmuskelkraft ausgleichen. Parallel kommt es zum apoptotischen Untergang von Herzmuskelzellen. Zudem sind hypertrophierte Kardiomyozyten anfälliger für Stress-Stimuli und vollziehen ebenfalls gehäuft den programmierten Zelltod.

Eigene Arbeiten zeigen, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B nach TNF- α Stimulation ein Überlebenssignal darstellt. Die Inkubation von Kardiomyozyten mit Statinen, einer Medikamentenklasse zur Sekundärprophylaxe arteriosklerotischer Gefäßveränderungen, verminderte die durch Hypoxie induzierte Apoptose von Herzmuskelzellen in vitro. Dieser Effekt war jedoch nicht durch eine Aktivierung von NF- κ B oder CREB bedingt, sondern durch Phosphorylierung der GSK3 β . Dies war assoziiert mit einer Stabilisation des Transkriptionsfaktors β -catenin. Eine vorübergehende Hypoxie, gefolgt von einer Phase der Reoxygenierung, induzierte zudem direkt die Hypertrophie von Kardiomyozyten. Dieser Effekt war mit der Freisetzung von Sauerstoffradikalen (ROS) verknüpft. ROS aktivieren über eine Kopplung an heterotrimere, Gi-gekoppelte Rezeptoren (u.a. β 2-Adrenorezeptor) den PI3-Kinase/AKT Pfad. Zudem kommt es zu einer Phosphorylierung der GSK3 β , die die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors CREB reguliert. Die CREB-Aktivierung über diesen Signalpfad ist essentiell für die Hypoxie-induzierte Hypertrophie in diesem Modell.

Die vorgelegten Daten fügen die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, CREB und β -catenin in die Modelle der Signaltransduktionswege bei Apoptose und Hypertrophie von Kardiomyozyten ein. Die mögliche klinische Relevanz muss in weiteren genetischen Untersuchungen bzw. klinischen Studien geklärt werden.

V) Terminologie

Apoptose

Der programmierte Zelltod, Apoptose, ist im Unterschied zur Nekrose ein durch spezifische Signaltransduktionswege gesteuerter Prozess des Zelluntergangs ohne Auslösung einer entzündlichen Reaktion im umliegenden Gewebe. Er wird durch eine Kette von Caspasen exekutiert. Eine der frühen Veränderungen im Rahmen der Apoptose betrifft das Membranpotential der Mitochondrien, welches durch Proteine der bcl-2 Familie reguliert wird.

Asthma bronchiale

Das Asthma bronchiale ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des Bronchialepithels. Pathognomonisch ist die Einwanderung von eosinophilen Granulozyten, die durch eine Histaminfreisetzung die klinisch imponierende Engstellung der Bronchien induzieren. Neben einer symptomatischen Therapie durch β -Mimetika zur Weitstellung der Bronchien stellen inhalative Glukokortikoide das entscheidende langfristige Therapiekonzept zur Eindämmung der entzündlichen Reaktion dar.

Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz geht mit einem hohen Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko einher. Pathophysiologisch kann die Ursache einer eingeschränkten Pumpleistung des Herzens in einer ischämischen Herzerkrankung, einem arteriellen Hypertonus, Klappenvitien, einer Myokarditis oder in genetischen Erkrankungen liegen. Die Prognose konnte insbesondere durch Einführung der Behandlung mit β -Blockern und ACE-Hemmern im letzten Jahrzehnt erheblich verbessert werden.

Hypertrophie

Die Möglichkeiten des Myokard, auf ein Missverhältnis zwischen gefordertem Herzzeitvolumen und der aktuellen Pumpleistung mittelfristig zu reagieren, sind beschränkt. Das Herzkreislaufsystem kann seine Leistung über die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems sowie eine erhöhte Katecholaminfreisetzung kurzfristig steigern. Diese Stimuli induzieren mittelfristig die Hypertrophie einzelner Kardiomyozyten. Die Hypertrophie lässt sich über die Vergrößerung der Zelloberfläche sowie eine gesteigerte Proteinsynthese in vitro messen. Eine

Proliferation von Kardiomyozyten in signifikantem Ausmaß ist ausgeschlossen, da es sich ähnlich wie bei Neuronen um end-differenzierte Zellen handelt. Als Folge dieses Prozesses kommt es zu einer Herzwandverdickung und damit einer Abnahme der Elastizität. Die Hypertrophie kann jedoch nur kurzfristig eine erhöhte Auswurfleistung bewirken; langfristig stellt sie über bisher im Detail noch ungeklärte Mechanismen, wie möglicherweise eine gesteigerte Apoptose-Rate, den ersten Schritt in Richtung einer Herzschwäche dar.

Transkriptionsfaktor

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die durch Bindung an spezifische DNA-Sequenzen die Transkriptions-Rate eines Gens steuern. Die Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren finden sich zumeist im Bereich des Promotors, eines Genabschnitts im 5'-Bereich der kodierenden Gensequenz. Durch Bindung spezifischer Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B kommt es zur Rekrutierung des basalen Transkriptionsfaktorkomplexes an die TATA-Box. Die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren lässt sich durch DNA-Bindungsassays (EMSA) sowie Reporterassays nachweisen. Dabei wird in vitro die Interaktion Protein - doppelsträngige DNA bzw. die Transkription eines einfach zu quantifizierenden Proteins wie z.B. des Enzyms Luziferase nachgewiesen.

VI) Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin converting enzyme; limitierender Schritt der Angiotensin II Synthese
AKT	Serine/Threonine Kinase; Aktivierung durch Phosphorylierung am Serinrest 473
ANP	Atrial natriuretic peptide; Marker der myokardialen Hypertrophie
AP-1	Activator protein 1; Transkriptionsfaktor mit den Untereinheiten c-fos/c-jun
ARE	AU rich element; 3`terminales Ende der cDNA. Reguliert mRNA Halbwertszeit und Translation
bcl-2	Membranprotein der Mitochondrien; Überlebensfaktor
β -Blocker	Inhibitoren der β -Adrenorezeptoren
CREB	Transkriptionsfaktor cAMP responsive element binding protein; K-CREB ist eine dominant negative Mutante durch Deletion der DNA-bindenden Domäne
EMSA	Electro mobility shift assay; Nachweis der DNA Bindung von Transkriptionsfaktoren
ERK	Extracellular regulated Kinase; Mitglied der Gruppe der MAPK
GATA	Zink-Finger Transkriptionsfaktor mit der Erkennungssequenz (A/T)GATA(A/G)
Gi	Untereinheit bestimmter heterotrimerer, G-Protein gekoppelter Rezeptoren (z.B. β 2-Adrenorezeptor)
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
gp130	Glykoprotein 130; Rezeptor für IL-6 Familie
GRE	Glucocorticoid responsive element; DNA Bindungssequenz für den Glukokortikoid-komplex
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 β
HIF-1 α	Hypoxia inducible factor 1 α ; Transkriptionsfaktor
iAP	Inhibitor of apoptosis protein; Familie von Überlebensfaktoren
I κ B α	inhibitorische Untereinheit des zytosolischen NF- κ B Komplexes
IL-1 β	Interleukin 1 β ; multipotentes proinflammatorisches Zytokin
IL-5	Interleukin 5; Mobilisierungs- und Überlebensfaktor für eosinophile Granulozyten
LPS	Lipopolysacharide; proinflammatorisches Endotoxin gramnegativer Bakterien
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase; Familie von Kinasen (ERK, JNK, p38)
mRNA	Messenger RNA, die als Template für die Proteinsynthese dient
MG132	spezifischer Proteasominhibitor
NF-AT	Nuclear factor of activated T-cells; Transkriptionsfaktor
NF- κ B	Nuclear factor κ B; heterodimerer Transkriptionsfaktor zumeist mit den Untereinheiten p50 (DNA-bindend) + p65 (Transaktivierung)
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells; Monozyten; T-Zellen und B-Zellen
PC-PLC	phosphatidyl cholin spezifische Phospholipase C
PI3-Kinase	phosphatidyl inositol 3 Kinase
PKC	Protein Kinasen C (Untergruppen: klassische, neue, atypische)
PMA	phorbol myristate acetate; Aktivator aller klassischen Protein Kinasen C
PHA	Phytohämagglutin; Lektin als Kostimulans des T-Zell CD28 Rezeptors
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor; Transkriptionsfaktor
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction; Amplifikation von mRNA
STAT	Signal transducer of activated T-cells; Transkriptionsfaktor
TNF- α	Tumor Nekrosis Factor; proinflammatorisches Zytokin

VII) Danksagung

Herrn Prof. Dr. Rainer Dietz möchte ich für die kontinuierliche Unterstützung in der klinischen und wissenschaftlichen Tätigkeit sowie seine wissenschaftliche Begeisterungsfähigkeit trotz schwieriger Rahmenbedingungen am Campus Buch danken. Herrn Prof. Peter Barnes danke ich für eine intensive und inspirierende Zeit am National Heart and Lung Institute London, die die Basis für die anschließende selbständige Projektdurchführung legte. Dr. Robert Newton danke ich für intensive Diskussionen und fruchtbare Zusammenarbeit. Meinen langjährigen Berliner Mitarbeitern Christian Freund, Gabi Welsch, Amina El Jamali und Cindy Rechner danke ich für ihr kontinuierliches Engagement. Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jürgen Barth danke ich für seine Unterstützung zu Beginn der universitären Laufbahn und die langfristig wertvolle Einführung in die entscheidenden Etappenziele der Grundlagenforschung innerhalb einer medizinischen Fakultät.