

# Funktionelle Genomik des druckbelasteten Kardiozyten: Etomoxir bei Herzinsuffizienz?

Heinz Rupp, Bernhard Maisch<sup>1</sup>

**Hintergrund:** Pharmaka zur Abschwächung der neuroendokrinen Aktivierung können bei einer Herzinsuffizienz den deletären Umbau der Extrazellulärmatrix reduzieren oder rückgängig machen. Häufig kann aber das Fortschreiten der Herzinsuffizienz nicht verhindert werden, und es stellt sich daher die Frage, ob wichtige pharmakologische Targets nicht berücksichtigt werden. Vielversprechend erscheinen Therapieansätze, um die frühe Progression der Herzinsuffizienz und damit ein Einsetzen der neuroendokrinen Aktivierung zu verhindern. Vor allem die linksventrikuläre Dysfunktion könnte ein neues Therapieziel sein.

**Pathophysiologie:** Häufig tritt eine linksventrikuläre Dysfunktion im hypertrophierten Herzen auf. Nicht alle molekularen Strukturen des Kardiozyten sind an die Hypertrophie angepasst. So wird die Ca<sup>2+</sup>-Pumpe (SERCA 2) des sarkoplasmatischen

Retikulums nicht ausreichend exprimiert, und es kommt zu einer reduzierten Kraftentwicklung und Relaxation des Kardiozyten.

**Etomoxir:** Noch in der Entwicklung befindliche Pharmaka (CPT-1-Hemmer/PPAR-alpha-Aktivatoren), die zu einer erhöhten Glucoseoxidation führen, steigern die Genexpression der SERCA 2. Die Leitsubstanz Etomoxir hatte bei druckbelasteten Herzen einen weitgehend selektiven Einfluss auf die Kontraktionsgeschwindigkeit. Da die funktionellen Parameter mit dem Anteil an alpha-Myosin-Ketten korrelierten, verbesserte die teilweise Verhinderung des fetalen Phänotyps die kardiale Funktion. Da virale oder entzündliche Schädigungen des Herzmuskels auch zu einem fetalen Phänotyp führen können, kämen metabolische Modulatoren wie Etomoxir auch bei Kardiomyopathien zur Steigerung der SERCA-2-Expression in Frage.

**Schlüsselwörter:** Kardiozyt · Genexpression · Etomoxir · Herzinsuffizienz

Herz 2002;27:166–73

DOI 10.1007/s00059-002-2357-8

## Functional Genomics of the Pressure Loaded Cardiomyocyte: Is Heart Failure a Target for Etomoxir?

**Background:** Drugs for counteracting the neuroendocrine activation in heart failure can reduce the adverse remodelling of the extracellular matrix of the heart. Progression of heart failure can, however, often not be prevented and the question arises whether important pharmacological targets remain unidentified. Promising are drugs targeted at ventricular diastolic dysfunction which is a marker of early progression of heart failure.

**Pathophysiology:** Left ventricular dysfunction is characteristic of overloaded hypertrophied hearts with molecular structures that are not adapted to the increased Ca<sup>2+</sup> diffusion distances. Thus, the Ca<sup>2+</sup>-pump (SERCA2) of sarcoplasmic reticulum is in-

adequately expressed leading to a reduced force development and relaxation of hypertrophied cardiomyocytes.

**Etomoxir:** Drugs in development (CPT-1 inhibitor/PPARalpha activator) that increase glucose oxidation can enhance SERCA2 expression. The lead compound etomoxir had a selective influence on the contraction and relaxation rate of pressure-overloaded hearts. The functional parameters were correlated with the proportion of alpha-myosin heavy chains. Since viral or inflammatory injury of the heart can also induce a fetal phenotype, metabolic modulators such as etomoxir represent a promising therapeutic approach also for cardiomyopathies with inadequate SERCA2 expression.

**Key Words:** Cardiomyocyte · Gene expression · Etomoxir · Heart failure

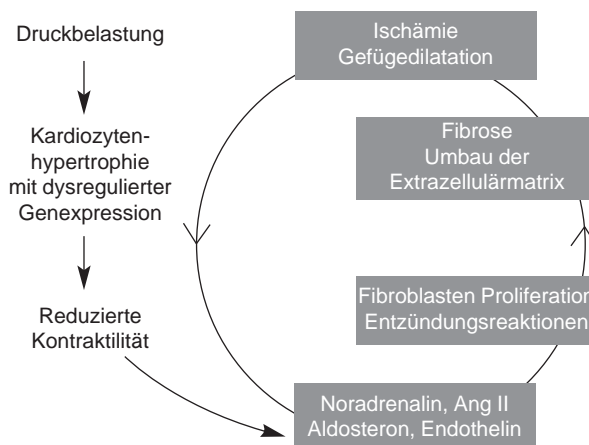
<sup>1</sup> Molekular-kardiologisches Labor, Klinik für Innere Medizin – Kardiologie, Philipps-Universität Marburg.

## Einleitung

Die Herzinsuffizienz ist eine Erkrankung mit stetig zunehmender Inzidenz. Ein wesentlicher Grund wird außer in der verbesserten Versorgung akuter kardialer Ereignisse im zunehmenden Alter der Bevölkerung gesehen, das häufig mit einer nicht ausreichend behandelten Hypertonie einhergeht und zu einer chronischen Druckbelastung des linken Ventrikels führt. Das Syndrom „Herzinsuffizienz“ wird in der Öffentlichkeit immer noch unterschätzt, obwohl es häufiger als Zervixtumoren oder Brustkrebs vorkommt [6]. So hat sich in den USA die Inzidenz der Herzinsuffizienz zwischen 1974 und 1994 verdreifacht, wobei 75% der Patienten über 65 Jahre alt sind [15].

Die Herzinsuffizienz ist die Endstrecke einer Reihe von Erkrankungen wie Hypertonie, koronare Herzerkrankung, Myokarditis, Kardiomyopathien, Herzklappenfehlern, kardialen Gendefekten, Diabetes mellitus und Sepsis. Eine Hypertonie und Herzhypertrophie besteht bei ca. 90% der Patienten mit Herzinsuffizienz [16]. Obwohl die Vermeidung eines hohen Blutdrucks im Vordergrund der Behandlung stehen sollte, kann vor allem beim älteren Hypertoniker ein meist systolisch erhöhter Blutdruck oft nicht mehr so weit gesenkt werden, dass keine pathologische Druckbelastung des Herzens verbleibt. Auch bei der koronaren Herzerkrankung ist die Vermeidung von auslösenden Risikofaktoren nicht in absehbarer Zukunft zu erwarten. Nach einem Herzinfarkt kommt es auch häufig im nicht infarktgeschädigten Myokard zu einer Überbelastung („Remodeling“) und damit zu einer Funktionseinschränkung des gesamten Herzens. Da zurzeit keine diagnostischen Maßnahmen zur Erkennung des Frühstadiums der Herzinsuffizienz zum Einsatz kommen, wird die Erkrankung häufig erst spät und nach dem Auftreten von Symptomen, wie Luftnot bei körperlicher Belastung, erkannt. Die heutige Standardtherapie ist auf die Verhinderung der weiteren Progression des bereits geschädigten Herzmuskels ausgerichtet, wobei die Behandlung bei vielen Patienten nur unzureichend ist [22].

Bei der bisherigen Behandlung der symptomatischen Herzinsuffizienz steht die Beeinflussung der als Folge einer nachlassenden Leistung des Herzmuskels auftretenden Aktivierung des neuroendokrinen Systems und des Endothelinsystems im Vordergrund. Wie bei einem akuten Blutverlust kommt es zu einer zunächst akuten, später chronischen Aktivierung des Sympathikus und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) (Abbildung 1). Da das Herz bereits



**Abbildung 1.** Schematische Darstellung von Vorgängen im druckbelasteten Herzen, die zu einer verminderten Funktion und damit zu einer neuroendokrinen Aktivierung führen. Pharmakologische Interventionen sind erforderlich, die eine Dysregulation der Genexpression des Kardiozyten (z.B. nicht ausreichende Expression der SERCA 2) korrigieren können.

**Figure 1.** Schematic representation of processes which result in an impaired function and thus neuroendocrine activation of failing hearts. Pharmacological interventions are required which can correct a dysregulated gene expression of the cardiomyocytes, e.g. inadequate SERCA2 expression.

geschädigt ist, führt die Aktivierung des Sympathikus und des RAAS häufig nicht zu einer Steigerung der Pumpfunktion. Wegen der komplexen Reparationsprozesse können Pharmaka, die einzelne Komponenten der neuroendokrinen Aktivierung blockieren, das Fortschreiten der Herzinsuffizienz nur verlangsamen, aber nicht aufhalten. Selbst wenn eine komplette Blockierung von Sympathikus, RAAS und Endothelinsystem gelingen würde, wäre nur der Zustand erreicht, der ursprünglich zu einer neuroendokrinen Aktivierung führte. Es sind daher dringend weitere Kenntnisse über die frühe Progression der Herzinsuffizienz erforderlich. Vor allem sollten Therapieansätze entwickelt werden, die den Übergang von der asymptotischen in die symptomatische Herzinsuffizienz verhindern.

## Linksventrikuläre Dysfunktion

Die Pumpfunktion des Herzens ist bereits über einen längeren Zeitraum vermindert, bevor Symptome einer Herzinsuffizienz bemerkt werden. Die Verbreitung der linksventrikulären Dysfunktion kann anhand der „Strong Heart Study“ abgeschätzt werden. Eine Dysfunktion (Ejektionsfraktion < 40%) war bei ungefähr 14% aller älteren Personen nachweisbar [5]. Einfache Screening-Verfahren zur Früherkennung der linksven-

trikulären Dysfunktion in der Allgemeinbevölkerung wären vor allem dann gerechtfertigt, wenn es zusätzlich zur ACE-Hemmung [18] neue pharmakologische Targets zur Behandlung geben würde.

Die Diagnostik der linksventrikulären Dysfunktion dürfte über Messungen von natriuretischen Peptiden im Serum möglich sein. Vor allem das BNP, das im belasteten Ventrikel gebildet wird, ist bereits erhöht und steigt mit zunehmendem Funktionsverlust des linken Ventrikels an [17, 19]. Ungeklärt ist zurzeit, ob BNP diagnostisch beweisend für – vor allem im Tierversuch beschriebene – Veränderungen in der Genexpression des hypertrophierten Kardiozyten ist und in welchem Umfang sie durch neue pharmakologische Interventionen beeinflusst werden können.

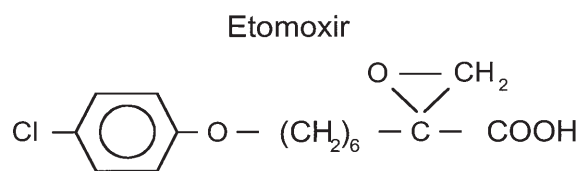
### Proteinphänotyp des Kardiozyten

Als Folge einer Hypertrophie kommt es zu charakteristischen Veränderungen in der Genexpression des Kardiozyten. DNA-Chip-Untersuchungen an Ratten nach Myokardinfarkt zeigten, dass die früher detailliert untersuchten Gene wie Myosin und  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe (SERCA 2) des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) als Marker einer Gruppe von koordiniert exprimierten Genen zu sehen sind. Es konnte auch das fetale Expressionsmuster, das anfänglich anhand einer verminderten Expression der alpha-Myosin-schweren-Kette (alpha-MHC) in mehreren Modellen der kardialen Überbelastung charakterisiert wurde, beobachtet werden [34]. Es zeigte sich, dass die Veränderungen in der Genexpression umfangreicher sind und das ursprüngliche Konzept eines fetalen Phänotyps nur einen Teil der beobachteten Veränderungen in der Genexpression erklären kann. Mit Hilfe der DNA-Chip-Technik wurde bei mehr als 200 der ca. 4 000 untersuchten Gene eine veränderte Expression im hypertrophierten nicht ischämischen Ventrikel nach einem Myokardinfarkt beobachtet [34]. Zunächst unerwartet war der Befund, dass viele der differenziell exprimierten Gene für Enzyme des Energiestoffwechsels kodieren, die auch in der fetalen Phase nicht oder vermindert exprimiert werden [13]. Besonders deutlich war eine Repression von Genen, die für den Abbau von Fettsäuren verantwortlich sind. Hierzu gehören die Enoyl-CoA-Isomerase, Dienoyl-CoA-Reduktase, Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase, Acyl-CoA-Synthase und Ketoacyl-CoA-Thiolase [34]. Diese koordinierte Repression von an der  $\beta$ -Oxidation beteiligten Enzymen [32] deutet auf eine verminderte Fettsäureutilisation hin. Weiterhin waren die Lipopro-

teinlipase und CD36, ein Fettsäuretransporter, reprimiert [34]. Die Befunde erklären die schon früher gemachte Beobachtung, dass es als Folge einer Druckbelastung zu einer auf Kosten der Fettsäureutilisation gesteigerten Glucoseverwertung kommt [2, 4, 7, 35].

Da Gene des Fettsäureabbaus vom Transkriptionsfaktor PPAR alpha reguliert werden und da PPAR alpha als Folge einer Druckbelastung vermindert exprimiert wird [31], wurde dieses charakteristische Muster der Genexpression auf einen reduzierten Einfluss von PPAR alpha zurückgeführt [1]. Bedeutsam ist, dass dieser fetale Phänotyp auch nach einer Cocksackie-B3-Infektion der Maus beobachtet wurde [9, 10, 36]. Es wurde gefolgert, dass die nach einer virusbedingten Schädigung verbliebenen Kardiozyten hypertrophieren und das vermutlich stereotyp ablaufende Muster einer veränderten Genexpression aufweisen [36]. Die nach einer Virusinfektion eingeschränkte Herzfunktion ist daher nicht nur auf den Verlust von Kardiozyten zurückzuführen, sondern auch auf einen molekularen Umbau des Kardiozyten.

Die DNA-Chip-Befunde zu PPAR-alpha-regulierten Genen ermöglichen auch eine weiterführende Interpretation unserer langjährigen Untersuchungen zu Etomoxir, das einen selektiven Einfluss auf den Proteinphänotyp des hypertrophierten Kardiozyten hat. Etomoxir wurde anfänglich als Hemmer der mitochondrialen Carnitinpalmitoyltransferase 1 (CPT-1) entwickelt, ist aber wegen des langen Fettsäurerestes auch ein PPAR-alpha-Agonist [21] (Abbildung 2). Eine CPT-1-Hemmung allein würde dazu führen, dass die beim druckbelasteten Herzen verminderte Fettsäureoxidation noch weiter reduziert wird. Weitgehend un-



CPT-1 Hemmer: gesteigerte Glukoseoxidation  
reduzierte Fettsäureoxidation

Acetyl-CoA-Carboxylase-Hemmer: reduzierte Fettsäuresynthese  
PPA-Ralpha-Aktivator

**Abbildung 2.** Etomoxir reduziert nicht nur die Carnitinpalmitoyltransferase-1-Aktivität des Herzens, sondern hat auch eine hemmende Wirkung auf die De-novo-Fettsäuresynthese. Zusätzlich ist Etomoxir ein PPAR-alpha-Aktivator.

**Figure 2.** Etomoxir reduces not only the carnitine palmitoyltransferase-1 activity but has also an inhibitory effect on the de novo fatty acid synthesis. In addition, etomoxir is a PPARalpha activator.

beachtet blieb die Bedeutung der zusätzlichen PPAR-alpha-Wirkung. Dass die PPAR-alpha-Aktivität möglicherweise unterschätzt wurde, ergibt sich aus der protektiven Wirkung von Etomoxir bei einer Ischämie/Reperfusion der Niere, die auch durch einen reinen PPAR-alpha-Agonisten zu erreichen ist [21]. Es stellt sich daher die Frage, ob die von uns beschriebene Funktionsverbesserung und die zugrunde liegenden biochemischen Veränderungen nach Etomoxir-Behandlung des druckbelasteten Herzens nur auf eine CPT-1-Hemmung und/oder eine PPAR-alpha-Wirkung zurückzuführen sind [45] und ob es einen direkten Zusammenhang mit der Expression von Genen des Fettsäureabbaus und weiterer funktionell relevanter Gene gibt. Die weitere Aufklärung der vermutlich komplexen Wirkung metabolisch wirksamer Pharmaka ist wichtig, da sie eine als günstig einzustufende Steigerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transports des sarkoplasmatischen Retikulums bewirken können.

Eine nicht ausreichende Funktion des sarkoplasmatischen Retikulums führt zu einer verzögerten Relaxation, die nicht nur zu einer Beeinträchtigung der Füllung des Herzens, sondern vermutlich auch der Koronarperfusion führt. Wegen der konsekutiv reduzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher des sarkoplasmatischen Retikulums ist auch die systolische Druckentwicklung des Herzens vermindert. Unsere Daten belegen, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpaktivität des sarkoplasmatischen Retikulums bei einer chronischen Druckbelastung nicht proportional zur Hypertrophie des Ventrikels gesteigert wird [29]. Da die Menge an freizusetzendem  $\text{Ca}^{2+}$  proportional zum Kardiozytenvolumen ansteigt, sind die Auswirkungen einer reduzierten Funktion des sarkoplasmatischen Retikulums umso stärker, je größer die Hypertrophie ist. Wegen der vergrößerten Diffusionswege kommt es wahrscheinlich beim hypertrophierten Kardiozyten auch zu einer verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung [43]. Auf mRNA-Ebene konnte mehrfach gezeigt werden, dass die SERCA 2a nach einer Druckbelastung bei der Ratte vermindert ist [20, 46]. Es wurden aber auch unveränderte Spiegel beschrieben [44]. Entscheidend für die Progression der Herzinsuffizienz ist, dass es beim druckbelasteten Herzen nicht zu einer der Hypertrophie proportionalen Zunahme der SERCA-2-Expression kommt und dass eine gesteigerte adrenerge Aktivität zu einer weiteren Aktivitätsabnahme des sarkoplasmatischen Retikulums führen kann [27]. Es stellte sich daher die Frage, ob durch pharmakologische Interventionen die SERCA-2-Expression gesteigert werden kann.

### **Genexpression des Kardiozyten als pharmakologisches Target**

#### **Etomoxir bei normotensiven Ratten**

In langjährigen Untersuchungen prüften wir eine Reihe pharmakologischer Interventionen zur Beeinflussung der Genexpression des normalen und druckbelasteten Kardiozyten [23]. Im Mittelpunkt stand die Frage, ob Veränderungen in der Genexpression Auswirkungen auf die Funktion des Herzens haben. Als Marker eines fetalen Phänotyps wurde die Abnahme der alpha-MHC-Expression verwendet, die im Gegensatz zu der früher vertretenen Meinung mittlerweile auch im menschlichen Ventrikel nachgewiesen werden konnte und dessen Verschwinden als ein früher Marker einer eingeschränkten Herzfunktion eingestuft wird [14]. Vergleichend untersuchten wir mit verschiedenen methodischen Ansätzen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportfunktion des sarkoplasmatischen Retikulums. Im Vordergrund unserer Untersuchungen stand das als Typ-II-Antidiabetikum entwickelte Etomoxir, das keinen akuten Einfluss auf Herz- und Kreislaufparameter hat. So veränderte Etomoxir weder die radiotelemetrisch gemessene Herzfrequenz noch den systolischen oder diastolischen Blutdruck. Bei einem gängigen pharmakologischen Screening herzwirksamer Substanzen wäre diese Substanz nicht weiter geprüft worden. Ein möglicher Behandlungserfolg mit Etomoxir setzt einen molekularen Umbau des Kardiozyten voraus. Die Zeit, nach der die Hälfte der  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen des sarkoplasmatischen Retikulums ersetzt wird, beträgt wenige Tage. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass Proteine des sarkoplasmatischen Retikulums und des kontraktile Apparats eine relativ kurze Halbwertszeit haben und dass Defekte in der Signalkaskade der Genexpression dazu führen, dass wesentliche Proteine nicht in adäquater Menge produziert werden. Dies ist vermutlich auch die Ursache für den mikroskopisch erkennbaren strukturellen Umbau des druckbelasteten Myokards.

Eine chronische Behandlung mit Etomoxir führte in unseren Experimenten zu einer Steigerung der Funktion des sarkoplasmatischen Retikulums (Zunahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase [24], der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität [30], der aktiven [E~P]- $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen [28, 42], des SERCA-Proteins [28,42] und der SERCA-2-mRNA [46]). Der parallel dazu erhöhte Anteil von alpha-MHC oder Myosin V1 (2-alpha-MHC) deutet auf eine koordinierte Expression kardialer Gene hin. Da Etomoxir auch bei kultivierten neonatalen Herzmuskelzellen den  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport des sarkoplasmatischen Retikulums steigerte (Vet-

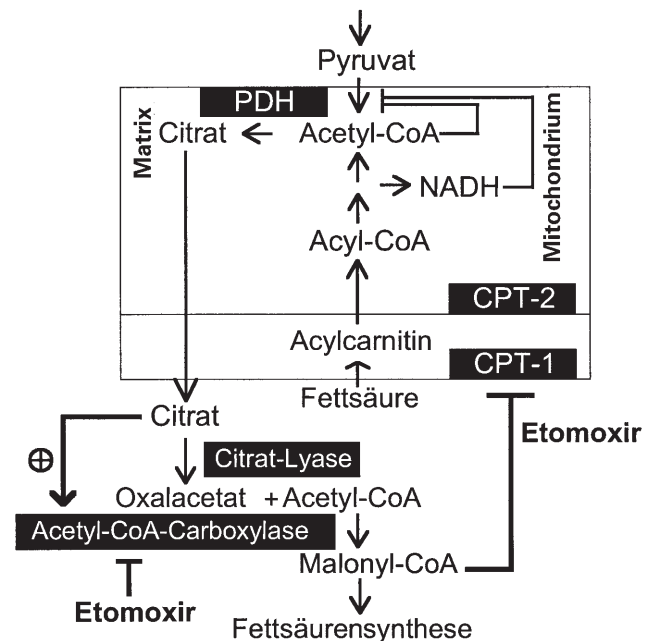
ter & Rupp, unveröffentlicht), kann eine direkte Wirkung von Etomoxir angenommen werden.

Als Kandidaten für die Etomoxir-induzierte Steigerung der SERCA-Expression kommen mehrere Sequenzen des proximalen Promotors der SERCA in Frage [45]. Der proximale Promotor enthält zusätzlich zum „Thyroid Response Element“ neun potentielle Sp1-Bindungsstellen (5'-GGGCGG-3', 5'-CCGCCC-3' und 5'-GGGAGG-3') und ein E-box Motif (5'-CACATG-3'), die als „Glucose-Response“-Elemente identifiziert werden können. Diese Region enthält auch zwei Sequenzen, die als potentielle „Fettsäuren-Response“-Elemente (5'-GGGGGA-3') in Frage kommen. Es wurde von uns vermutet, dass die Wirkung von Etomoxir von einem veränderten Energiestoffwechsel (Abbildung 3) und/oder einer PPAR-alpha-Aktivierung ausgeht [45]. Weiterführende Arbeiten zur Überprüfung dieser Hypothese sind notwendig. Etomoxir wurde als Leitsubstanz von sog. „Transkriptionsmodulatoren“ identifiziert, die über eine veränderte Genexpression des Kardiozyten zu einer Funktionsverbesserung des Herzens führen.

#### Etomoxir beim kompensierten druckbelasteten Herzen

Die Etomoxir-induzierten Veränderungen in der Genexpression des Kardiozyten führten zu einer Verbesserung der Pumpfunktion des druckbelasteten Herzens [37]. Bedeutsam ist, dass Etomoxir einen weitgehend selektiven Einfluss auf den druckbelasteten linken Ventrikel bei Ratten mit einer Aortenstenose hatte und bei niedriger Dosierung sowohl die myokardiale Arbeitskapazität als auch die Kontraktions- und Erschlaffungsgeschwindigkeit des isovolumetrisch schlagenden Herzens steigerte [37].

In Fortsetzung früherer Arbeiten, bei denen Etomoxir zu Beginn bei der Einengung der Aorta verabreicht wurde [37], überprüften wir, ob Etomoxir die Herzfunktion auch nach einer bereits länger bestehenden Druckbelastung, die zu keinem Lungenödem führte, verbessern kann [39]. Etomoxir wurde daher erst 6 Wochen nach der Operation verabreicht. Die Behandlung verhinderte die Zunahme des linksventrikulären Innenvolumens und damit den Beginn der Dilatation. Weiterhin war der Anteil an alpha-MHC gesteigert. Auch waren der maximal isovolumetrisch entwickelte Druck und die Geschwindigkeit der Druckentwicklung und des Druckabfalls gesteigert. Nach Umwandlung der Druckwerte in Wandspannungswerte zeigte sich auch eine verbesserte



**Abbildung 3.** Stoffwechselwege, die von Etomoxir beeinflusst werden. Etomoxir hemmt wie Malonyl-CoA die Carnitinpalmityltransferase 1 (CPT-1) und steigert damit über eine Aktivierung der Pyruvatdehydrogenase (PDH) die Glucoseoxidation. Etomoxir hemmt weiterhin die Acetyl-CoA-Carboxylase und reduziert damit die De-novo-Fettsäuresynthese.

**Figure 3.** Metabolic pathways influenced by etomoxir. Etomoxir, like malonyl CoA, reduces the activity of carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) and thereby increases the activity of pyruvate dehydrogenase (PDH) and thus glucose oxidation. Etomoxir reduces also the acetyl CoA carboxylase activity resulting in a lower de novo fatty acid synthesis.

Myokardfunktion. Die koordinierte Wirkung von Etomoxir auf ventrikuläres Gewicht, Geometrie und myokardialen Phänotyp verbesserte daher auch die Funktion des bereits druckbelasteten linken Ventrikels und verzögerte die deletäre Dilatation.

#### Etomoxir beim dekompensierten druckbelasteten Herzen

Es wurde geprüft, ob Etomoxir auch den Übergang in die symptomatische Herzinsuffizienz, die mit einem Lungenödem einhergeht, beeinflusst [29]. Nach einer starken Einengung der Aorta war nach 8, 10, 14 und 28 Wochen eine ausgeprägte linksventrikuläre Hypertrophie (+62% bis +103%) vorhanden, und es trat ein Lungenödem bei 60–100% der Tiere auf. Die Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme des sarkoplasmatischen Retikulums pro g Feuchtgewicht war um 30% vermindert, unabhängig von der Phospholamban-Phosphorylierung und Hemmung der Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung des sarkoplasmatischen Retikulums.

Das SERCA-2-Protein war ebenfalls um 30% reduziert. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme des sarkoplasmatischen Retikulums war invers mit dem linksventrikulären Gewicht korreliert und wurde nicht durch das Auftreten eines Lungenödems beeinflusst. Da der berechnete  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport des sarkoplasmatischen Retikulums des gesamten Ventrikels nicht vermindert war, ist eine der Hypertrophie proportionale Verdünnung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen des sarkoplasmatischen Retikulums wahrscheinlich, die dem Auftreten eines Lungenödems vorausgeht. Eine Behandlung mit Etomoxir veränderte nicht das linksventrikuläre Gewicht, reduzierte aber die als Folge eines Lungenödems auftretende rechtsventrikuläre Hypertrophie. Parallel dazu waren die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme des sarkoplasmatischen Retikulums und der Anteil an Myosin V1 gesteigert. Es wurde gefolgert, dass Etomoxir auch eine Kandidatensubstanz zu Verhinderung der Progression der Herzinsuffizienz beim druckbelasteten Herzen ist, wobei die Substanz einen – angenähert proportional zur Hypertrophie – gesteigerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport des sarkoplasmatischen Retikulums bewirkt.

#### **Etomoxir bei Patienten mit Herzinsuffizienz**

Eine erste Pilotstudie bei Patienten mit Herzinsuffizienz, aber ohne Diabetes Typ II zeigte, dass sich die Funktion des Herzens 8 Wochen nach Behandlung mit Etomoxir verbesserte [33]. Dieser neue und unabhängig von einer neuroendokrinen Aktivierung laufende therapeutische Ansatz stieß auf großes Interesse und wurde als neuer Ansatz zur Verhinderung der chronischen Herzinsuffizienz eingestuft [3]. Zurzeit läuft die Phase-II-ERGO-Studie (Medigene AG), um die therapeutische Dosis bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz zu ermitteln.

#### **Insulin und Glucosetransportertranslokation**

Zur weiteren Aufklärung metabolischer Signale wurde überprüft, ob die als Folge eines intermittierenden Fastens auftretenden reduzierten Insulinspiegel den Einfluss einer Druckbelastung verändern können [25]. Intermittierendes Fasten, das zu einer verminderten Glucoseaufnahme führt, reduzierte wie eine Druckbelastung den Anteil von Myosin V1 und die  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulierte ATPase-Aktivität des sarkoplasmatischen Retikulums. Wenn beide Interventionen kombiniert wurden, war die Hypertrophie nicht im Vergleich zu ad libitum gefütterten Tieren verändert, es konnte aber keine additive Wirkung auf Myosin und das sarkoplasmatische Retikulum beobachtet werden. Weiterhin verhinderte die Verabrei-

chung von 0,8% Saccharose im Trinkwasser die Veränderungen in Myosin und sarkoplasmatischem Retikulum bei Ratten mit einer Druckbelastung, nach intermittierendem Fasten und in der Kombinationsgruppe. Vermutlich wird die Wirkung von Saccharose durch Incretin-vermittelte Signale und einen erhöhten Insulin-Einfluss [8, 26] vermittelt. Es werden daher bei intermittierendem Fasten und einer linksventrikulären Druckbelastung metabolische Signale rekrutiert, die in der Endstrecke ähnlich sind und bei Fasten nicht mehr durch eine Druckbelastung verstärkt werden können.

Um zu prüfen, ob die Wirkung von Etomoxir auch durch eine Substanz zu erzielen ist, die nur eine Steigerung der Glucosetransportertranslokation bewirkt, wurden Ratten mit einer abdominalen Aortenstenose mit BM13.907 (als Typ-II-Antidiabetikum entwickelt) behandelt [25]. Die Behandlung vergrößerte die linksventrikuläre Hypertrophie, reduzierte aber im Gegensatz zu Etomoxir den Anteil von alpha-MHC. Es wurde eine inverse Beziehung zwischen Zunahme an linksventrikulärem Gewicht und alpha-MHC beobachtet. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulierte ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums druckbelasteter Herzen war aber nicht, wie man anhand der Myosindaten erwarten könnte, vermindert. Es wurde gefolgert, dass eine Substanz, die zu einer erhöhten Glucosetransportertranslokation führt, die Herzhypertrophie beeinflusst, aber nur teilweise den charakteristischen Phänotyp eines druckbelasteten Herzens verhindern kann.

#### **AT<sub>1</sub>-Blocker und ACE-Hemmer**

Unsere früheren Studien zeigten, dass eine Betablockade mit Atenolol oder Alphablockade mit Terazosin die reduzierte alpha-MHC-Expression des druckbelasteten Herzens nicht verhindern kann [12]. Ungeklärt blieb, ob eine systemische AT<sub>1</sub>-Blockade die Entwicklung einer Hypertrophie als Folge einer Aortenstenose beeinflussen kann [38]. Weder die konzentrische Hypertrophie noch die reduzierte myokardiale Kontraktilität und alpha-MHC-Expression wurden durch den AT<sub>1</sub>-Blocker Losartan signifikant beeinflusst. Die initiale Expression des fetalen Phänotyps eines druckbelasteten Herzens, bestimmt am Beispiel der alpha-MHC-Expression, scheint daher nicht durch AT<sub>1</sub>-Blocker beeinflusst zu werden. Diese Schlussfolgerung wird durch den Befund von Yazaki et al. erhärtet, dass die linksventrikuläre Hypertrophie, Fibrose und Expression fetaler Gene bei AT<sub>1</sub>-Knockout-Mäusen mit einer abdominalen Aortenstenose nicht verändert sind [11].

Es wurde weiterhin geprüft, ob der ACE-Hemmer Quinapril die MHC-Expression verändert und ob eine ACE-Hemmung das Einsetzen einer Herzinsuffizienz bei Ratten mit einer fixierten Druckbelastung des linken Ventrikels verhindern kann [40]. Während einer 24-wöchigen Beobachtungsphase verminderte Quinapril die Mortalität. Die charakteristische Abnahme der alpha-MHC-Expression konnte aber nur in den ersten Wochen durch Quinapril teilweise verhindert werden. Am Ende der 24-wöchigen Beobachtungsphase gab es aber keinen Unterschied mehr zwischen der Quinapril- und der Placebogruppe. Unabhängig von der Behandlung zeigten herzinsuffiziente hypertrophierte Ventrikel eine Zunahme des linksventrikulären Volumens, eine weitere Abnahme der alpha-MHC-Expression und eine gesteigerte Hydroxyprolinkonzentration. Obwohl die Ursache der verminderten Mortalität der mit Quinapril behandelten Ratten noch nicht geklärt ist, hatte Quinapril bei einer länger dauernden Druckbelastung keinen Einfluss mehr auf die Expression des fetalen Phänotyps druckbelasteter Kardiozyten, der mit einer verminderten myokardialen Leistung, ventrikulärer Dysfunktion und einer vermutlich konsekutiv gesteigerten Fibrose einherging.

Ungeklärt blieb, ob neben der ACE-Hemmung noch weitere Wirkungen eines ACE-Hemmers zu berücksichtigen sind, vor allem, ob das als Folge einer ACE-Hemmung gesteigerte Bradykinin einen Einfluss auf die Hypertrophieentwicklung hat [41]. Als ACE-Hemmer wurde Captopril verwendet, das eine SH-Gruppe enthält und daher unter anderem das zelluläre Redoxpotential verändern kann. Unerwartet war der Befund, dass Captopril den Anteil an alpha-MHC bei Ratten mit einer Aortenstenose und bei scheinoperierten Ratten steigerte. Der Anteil an alpha-MHC war invers mit dem linksventrikulären Gewicht korreliert, und es wurden zwei verschiedene Korrelationsgeraden für nicht behandelte und mit Captopril behandelte Ratten beobachtet. Eine gleichzeitige Verabreichung von HOE 140 (Bradykinin-B2-Rezeptorantagonist) hatte keine Wirkung. Es wurde gefolgert, dass die Stimulierung von Bradykinin-B2-Rezeptoren keinen Einfluss auf kardiales Wachstum und Myosin während der Entwicklung der Hypertrophie hat. Da eine Behandlung mit Lisinopril den Anteil an alpha-MHC nicht veränderte (nicht publizierte Daten), scheinen Captopril-spezifische Mechanismen in Frage zu kommen. Es ist auch noch nicht geklärt, ob Captopril in Analogie zu Etomoxir den  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport des sarkoplasmatischen Retikulums steigerte.

### Ausblick

Noch in der Entwicklung befindliche Pharmaka, die zu einer erhöhten Glucoseoxidation des Herzmuskels führen, steigern die Genexpression und Zahl der aktiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen des sarkoplasmatischen Retikulums. Als Leitsubstanz wurde Etomoxir identifiziert, das bei druckbelasteten Herzen einen weitgehend selektiven Einfluss auf die Kontraktionsparameter hatte. Da die funktionellen Parameter mit dem Anteil an alpha-Myosin-Ketten korrelierten, führte die teilweise Verhinderung des fetalen Phänotyps zu einer verbesserten Funktion des Herzens. Da virale oder entzündliche Schädigungen des Herzmuskels auch zu einem fetalen Phänotyp führen können, kämen solche metabolische Modulatoren auch bei Kardiomyopathien zur Steigerung der SERCA-2-Expression in Frage.

### Danksagung

Die experimentellen Studien wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt (Ru 245/7-1).

### Literatur

1. Barger PM, Brandt JM, Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP. Deactivation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha during cardiac hypertrophic growth. *J Clin Invest* 2000;105:1723-30.
2. Bishop SP, Altschuld RA. Increased glycolytic metabolism in cardiac hypertrophy and congestive failure. *Am J Physiol* 1970;218:153-9.
3. Bristow M. Etomoxir: a new approach to treatment of chronic heart failure. *Lancet* 2000;356:1621-2.
4. Christe ME, Rodgers RL. Altered glucose and fatty acid oxidation in hearts of the spontaneously hypertensive rat. *J Mol Cell Cardiol* 1994;26:1371-5.
5. Devereux RB, Roman MJ, Paranicas M, et al. A population-based assessment of left ventricular systolic dysfunction in middle-aged and older adults: The Strong Heart Study. *Am Heart J* 2001;141:439-46.
6. Eriksson H. Heart failure: a growing public health problem. *J Intern Med* 1995;237:135-41.
7. Feinendegen LE, Henrich MM, Kuikka JT, Thompson KH, Vester EG, Strauer B. Myocardial lipid turnover in dilated cardiomyopathy: a dual in vivo tracer approach. *J Nucl Cardiol* 1995;2:42-52.
8. Fukase N, Takahashi H, Manaka H, et al. Differences in glucagon-like peptide-1 and GIP responses following sucrose ingestion. *Diabetes Res Clin Pract* 1992;15:187-95.
9. Hamrell BB, Huber SA, Leslie KO. Reduced unloaded sarcomere shortening velocity and a shift to a slower myosin isoform in acute murine coxsackievirus myocarditis. *Circ Res* 1994;75:462-72.
10. Hamrell BB, Huber SA, Leslie KO. Depressed unloaded sarcomere shortening velocity in acute murine coxsackievirus myocarditis: myocardial remodelling in the absence of necrosis or hypertrophy. *Eur Heart J* 1995;16:Suppl O:31-5.
11. Harada K, Komuro I, Shiojima I, et al. Pressure overload induces cardiac hypertrophy in angiotensin II type 1A receptor knockout mice. *Circulation* 1998;97:1952-9.
12. Jacob R, Brandle M, Dierberger B, Rupp H. Functional conse-

- quences of cardiac hypertrophy and dilatation. *Basic Res Cardiol* 1991;86:Suppl 1:113–30.
13. Kelly DP, Gordon JJ, Alpers R, Strauss AW. The tissue-specific expression and developmental regulation of two nuclear genes encoding rat mitochondrial proteins. Medium chain acyl-CoA dehydrogenase and mitochondrial malate dehydrogenase. *J Biol Chem* 1989;264:18921–5.
  14. Kinugawa K, Minobe WA, Wood WM, et al. Signaling pathways responsible for fetal gene induction in the failing human heart: Evidence for altered thyroid hormone receptor gene expression. *Circulation* 2001;103:1089–94.
  15. Lenfant C. Fixing the failing heart. *Circulation* 1997;95:771–2.
  16. Lenfant C, Roccella EJ. A call to action for more aggressive treatment of hypertension. *J Hypertens* 1999;17:Suppl:S3–7.
  17. Luchner A, Burnett JC, Jougasaki M, et al. Evaluation of brain natriuretic peptide as marker of left ventricular dysfunction and hypertrophy in the population. *J Hypertens* 2000;18:1121–8.
  18. Malik IS, Bhatia VK, Kooner JS. Cost effectiveness of ramipril treatment for cardiovascular risk reduction. *Heart* 2001;85:539–43.
  19. McDonagh TA, Robb SD, Murdoch DR, et al. Biochemical detection of left-ventricular systolic dysfunction. *Lancet* 1998;351:9–13.
  20. Nagai R, Zarain-Herzberg A, Brandl CJ, et al. Regulation of myocardial Ca<sup>2+</sup>-ATPase and phospholamban mRNA expression in response to pressure overload and thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2966–70.
  21. Portilla D, Dai G, Peters JM, Gonzalez FJ, Crew MD, Proia AD. Etomoxir-induced PPARalpha-modulated enzymes protect during acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;278:F667–75.
  22. Remme WJ. Towards the better treatment of heart failure. *Eur Heart J* 1998;19:Suppl L:L36–42.
  23. Rupp H, Benkel M, Maisch B. Control of cardiomyocyte gene expression as drug target. *Mol Cell Biochem* 2000;212:135–42.
  24. Rupp H, Elimban V, Dhalla NS. Modification of subcellular organelles in pressure-overloaded heart by etomoxir, a carnitine palmitoyltransferase I inhibitor. *FASEB J* 1992;6:2349–53.
  25. Rupp H, Elimban V, Dhalla NS. Differential influence of fasting and BM13,907 treatment on growth and phenotype of pressure overloaded rat heart. *Mol Cell Biochem* 1998;188:209–15.
  26. Rupp H, Maisch B. Radiotelemetric characterization of overweight-associated rises in blood pressure and heart rate. *Am J Physiol* 1999;277:H1540–5.
  27. Rupp H, Maisch B, Brilla CG. Schedule-induced psychological stress and molecular structures of cardiomyocytes. *Am J Physiol* 1997;272:R776–82.
  28. Rupp H, Schulze W, Vetter R. Dietary medium-chain triglycerides can prevent changes in myosin and SR due to CPT-1 inhibition by etomoxir. *Am J Physiol* 1995;269:R630–40.
  29. Rupp H, Vetter R. Sarcoplasmic reticulum function and carnitine palmitoyltransferase-1 inhibition during progression of heart failure. *Br J Pharmacol* 2000;131:1748–56.
  30. Rupp H, Wahl R, Hansen M. Influence of diet and carnitine palmitoyltransferase I inhibition on myosin and sarcoplasmic reticulum. *J Appl Physiol* 1992;72:352–60.
  31. Sack MN, Disch DL, Rockman HA, Kelly DP. A role for Sp and nuclear receptor transcription factors in a cardiac hypertrophic growth program. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:6438–43.
  32. Sack MN, Rader TA, Park S, Bastin J, McCune SA, Kelly DP. Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. *Circulation* 1996;94:2837–42.
  33. Schmidt-Schweda S, Holubarsch C. First clinical trial with etomoxir in patients with chronic congestive heart failure. *Clin Sci (Colch)* 2000;99:27–35.
  34. Stanton LW, Garrard LJ, Damm D, et al. Altered patterns of gene expression in response to myocardial infarction. *Circ Res* 2000;86:939–45.
  35. Taegtmeier H, Overturf ML. Effects of moderate hypertension on cardiac function and metabolism in the rabbit. *Hypertension* 1988;11:416–26.
  36. Taylor LA, Carthy CM, Yang D, et al. Host gene regulation during coxsackievirus B3 infection in mice: assessment by microarrays. *Circ Res* 2000;87:328–34.
  37. Turcani M, Rupp H. Etomoxir improves left ventricular performance of pressure-overloaded rat heart. *Circulation* 1997;96:3681–6.
  38. Turcani M, Rupp H. Development of pressure overload induced cardiac hypertrophy is unaffected by long-term treatment with losartan. *Mol Cell Biochem* 1998;188:225–33.
  39. Turcani M, Rupp H. Modification of left ventricular hypertrophy by chronic etomoxir treatment. *Br J Pharmacol* 1999;126:501–7.
  40. Turcani M, Rupp H. Heart failure development in rats with ascending aortic constriction and angiotensin-converting enzyme inhibition. *Br J Pharmacol* 2000;130:1671–7.
  41. Turcani M, Rupp H. Bradykinin (B2) independent effect of captopril on the development of pressure overload cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biochem* 2000;212:219–25.
  42. Vetter R, Rupp H. CPT-1 inhibition by etomoxir has a chamber-related action on cardiac sarcoplasmic reticulum and isomyosins. *Am J Physiol* 1994;267:H2091–9.
  43. Wang SQ, Song LS, Lakatta EG, Cheng H. Ca<sup>2+</sup> signalling between single L-type Ca<sup>2+</sup> channels and ryanodine receptors in heart cells. *Nature* 2001;410:592–6.
  44. Yue P, Long CS, Austin R, Chang KC, Simpson PC, Massie BM. Post-infarction heart failure in the rat is associated with distinct alterations in cardiac myocyte molecular phenotype. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:1615–30.
  45. Zarain-Herzberg A, Rupp H. Transcriptional modulators targeted at fuel metabolism of hypertrophied heart. *Am J Cardiol* 1999;83:31H–7H.
  46. Zarain-Herzberg A, Rupp H, Elimban V, Dhalla NS. Modification of sarcoplasmic reticulum gene expression in pressure overload cardiac hypertrophy by etomoxir. *FASEB J* 1996;10:1303–9.

#### Korrespondenzanschrift

Prof. Dr. Heinz Rupp  
Molekular-Kardiologisches Labor  
Klinik für Innere Medizin – Kardiologie  
Karl-von-Frisch-Straße 1  
35033 Marburg  
Deutschland  
Telefon (+49/6421) 286 5032, Fax -8964  
E-Mail: Rupp@mail.uni-marburg.de