

Aus dem Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung,
W.G. Kerckhoff-Institut, Abteilung für Experimentelle Kardiologie, Bad Nauheim

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und
-Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Differentielle Genexpression bei der dilatativen Kardiomyopathie des Menschen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Andrea Maria Donay

Gießen 2003

Aus dem Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung,
W.G. Kerckhoff-Institut, Abteilung für Experimentelle Kardiologie, Bad Nauheim
Betreuerin: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Schaper

Eingereicht über das Institut für Veterinär- Anatomie, -Histologie und
-Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen
im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. Dr. h.c. R. Leiser

Differentielle Genexpression bei der dilatativen Kardiomyopathie des Menschen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Andrea Maria Donay

Tierärztin aus Koblenz

Gießen 2003

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Schaper

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. R. Leiser

Tag der mündlichen Prüfung:

06.05.2003

Für
Silke, Andreas
und meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	1
II. LITERATURÜBERSICHT	2
1. Die dilatative Kardiomyopathie des Menschen	2
1.1 Definition	2
1.2 Epidemiologie	2
1.3 Ätiologie	2
1.3.1 Idiopathische DCM	3
1.3.2 Familiäre DCM	4
1.3.3 Entzündliche Kardiomyopathie	6
1.4 Pathophysiologie	7
1.5 Histologie	7
1.6 Klinik	7
2. Zelluläre und molekulare Grundlagen der DCM	8
2.1 Aufbau der Herzmuskelzelle	8
2.2 Zelluläre Veränderungen in der DCM	11
2.3 Molekulare Veränderungen in der DCM	13
2.3.1 Defizite struktureller Proteine	13
2.3.2 Signaltransduktion	14
2.3.3 Aktivierung fetaler Gene	15
2.3.4 Veränderter Energiemetabolismus	15
2.3.5 Gestörte Kalziumhomöostase	16
2.3.6 Pro- und anti-apoptische Signalwege	17
3. DCM im Tiermodell und in Zellkulturstudien	18
3.1 DCM im Tiermodell	18
3.2 Zellkulturstudien	20
4. Expressionsanalysen	20
4.1 Expressionsanalyse mit Genarrays	21
4.1.1 Funktionsprinzip der Array Analyse	21
4.1.2 Array-Varianten	21
4.1.3 Atlas TM cDNA Expression Arrays	22
4.2 Expressionsanalyse von Proteinen	23
5. Ziel der eigenen Untersuchungen und Versuchsaufbau	23

III. MATERIAL UND METHODEN	26
1. Untersuchungsmaterial	26
1.1 Gewinnung der Proben.....	26
1.2 Auswahl der Proben.....	26
2. RNA-Isolierung	28
2.1 RNA-Isolierung mittels RNeasy® Midi Kit	28
2.2 RNA-Isolierung nach Chomczynski und Sacchi.....	28
3. Nukleinsäuren-Quantifizierung und Gelelektrophorese	29
3.1 Absorptionsmessung	29
3.2 Gelelektrophorese	29
3.2.1 Prinzip	29
3.2.2 RNA-Gelelektrophorese.....	30
3.2.3 DNA-Gelelektrophorese.....	31
4. Array Analyse	31
4.1 Array Hybridisierung	31
4.2 Auswertung der Arrays	32
5. Northern Blot Analyse	33
5.1 Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA und Kapillartransfer.....	34
5.2 Herstellung der Sonden.....	35
5.2.1 Prinzip	35
5.2.2 Erzeugung und Transformation kompetenter Bakterien	38
5.2.3 Amplifikation und Plasmidpräparation	39
5.2.4 Restriktionsverdau	40
5.2.5 Insertisolierung mit UltraClean™ DNA Purification Kit	41
5.3 Radioaktive Markierung.....	41
5.3.1 Radioaktive Markierung von cDNA	41
5.3.2 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden	42
5.3.3 Einbaukontrolle.....	43
5.4 Northern Hybridisierung	43
5.4.1 Hybridisierung	43
5.4.2 Auswertung der Northern Blots.....	44
6. Western Blot Analyse	44
6.1 Protein-Isolierung und Konzentrationsbestimmung	45
6.2 Western Blot.....	45
6.2.1 Prinzip der SDS-Gelelektrophorese	45
6.2.2 Elektrophorese und Transfer	46
6.2.3 Immunologische Detektion der Proteine.....	47
6.2.4 Auswertung der Western Blots.....	49

7. Immunhistochemie und Konfokalanalyse	49
7.1 Immunhistochemie	49
7.2 Konfokale Lasermikroskopie	50
VI. ERGEBNISSE	52
1. Qualität der RNA	52
2. Normalisierung	53
2.1 Northern Blot Analyse	53
2.2 Western Blot Analyse	53
3. Ergebnisse der Array Analyse	56
3.1 Atlas TM Human Cardiovascular Array.....	56
3.2 Atlas TM Human 1.2 Array	59
3.3 Identifikation von Markergenen.....	62
3.4 Vergleich der Nachweissensitivität von Array und Northern Blot Analyse.....	62
3.4.1 Northern Blot Analyse der Zyxin mRNA Expression	63
3.4.2 Northern Blot Analyse der Desmin mRNA Expression	64
4. Annexin I	65
5. Integrin β1	66
6. Helix-loop-helix Protein Id3	67
7. Plakoglobin	68
8. N-Cadherin	69
8.1 Northern Blot Analyse der N-Cadherin mRNA Expression.....	69
8.2 Western Blot Analyse der N-Cadherin Protein Expression.....	70
8.3 Quantitative Immunokonfokalanalyse der N-Cadherin Protein Expression.....	71
8.4 Immunohistochemische Analyse der N-Cadherin Protein Verteilung	72
9. α- und β-Catenin	73
9.1 Northern und Western Blot Analyse der α - Catenin Expression.....	73
9.2 Northern und Western Blot Analyse der β -Catenin Expression	75
10. Carp	77
10.1 Northern Blot Analyse der Carp mRNA Expression	77
10.2 Western Blot Analyse der Carp Protein Expression.....	78
11. Cofilin 2	79
11.1 Northern Blot Analyse der Cofilin 2 mRNA Expression	79
11.2 Western Blot Analyse der Cofilin 2 Protein Expression	80
12. Zusammenfassung der Ergebnisse	81

V. DISKUSSION	83
1. Diskussion der Methoden	83
1.1 Wahl des Untersuchungsmaterials.....	83
1.2 Array Analyse.....	84
1.3 Durchführung und Auswertung der Array Analyse.....	85
1.4 Ergebnisse der Array Analyse	87
1.5 Detektionssensitivität der Array Analyse.....	87
1.6 Weiterführende Untersuchungen.....	88
1.7 Normalisierung der Northern und Western Blot Analysen.....	89
2. Differentiell exprimierte Gene	89
3. Remodeling	89
3.1 Remodeling der extrazellulären Matrix	90
3.1.1 Vermehrte Expression von N-Acetylglucosamine-6-sulfatase mRNA.....	90
3.1.2 Vermehrte Expression von Kollagen und Fibronectin.....	92
3.2 Vermehrte Expression von Integrin β 1 mRNA und Protein.....	92
3.3 Remodeling der Glanzstreifen.....	94
3.3.1 Gestörte N-Cadherin Expression und Verteilung in der DCM.....	95
3.3.2 Konstitutive α - und β -Catenin mRNA und Protein Expression in der DCM	96
3.3.3 Verminderte Expression von Plakoglobin mRNA und Protein.....	96
3.4 Remodeling zytoskeletärer und Membran assoziierter Proteine	98
3.4.1 Vermehrte Expression von Desmin mRNA	98
3.4.2 Konstitutive Expression von Zyxin mRNA	98
3.5 Remodeling kontraktile Proteine.....	99
3.5.1 Verminderte Expression von MLC2 mRNA	99
3.5.2 Induktion aktindepolymerisierender Gene	100
3.6 Apoptose	102
3.6.1 Vermehrte Expression von Id3 mRNA und Protein	102
3.6.2 Verminderte Expression von Telomerase reverse transkriptase (TERT) mRNA.....	103
3.6.3 Reduzierte Expression von NF-ATc mRNA	104
3.7 Verminderte Kallistatin mRNA Expression.....	104
4. Kalzium-abhängige Pathomechanismen	105
4.1 Verminderte Expression von S100 A1 mRNA	106
4.2 Reduzierte Annexin VI mRNA Expression	106
5. Reaktivierung fetal exprimierter Gene	107
5.1 Vermehrte Expression der ANF mRNA	107
5.2 Erhöhte Carp mRNA und Protein Expression.....	108
5.3 Erhöhte Expression von Fatty acid binding protein 4 mRNA	108

6. Entzündungsreaktionen	109
6.1 Verminderte Expression von LFA-1 α mRNA	110
6.2 Reduktion der Rantes mRNA Expression	110
6.3 Verminderte Expression von Phospholipase A2 Rezeptor mRNA	111
6.4 Erhöhte Annexin I mRNA und Protein Expression	111
7. Differentielle Expression weiterer Gene	113
7.1 Verminderte Expression der Tyrosinkinase 1 mRNA	113
7.2 Reduzierte Expression der nikotinergen Acetylcholinrezeptor β 4 mRNA	113
VI. ZUSAMMENFASSUNG	115
VII. SUMMARY	118
VIII. ANHANG	121
1. Veröffentlichungen	121
2. Verzeichnis der verwendeten Materialien und Reagentien	121
2.1 Arbeitsvorschriften und Allgemeine Materialien	121
2.1.1 Arbeitsvorschriften	121
2.1.2 Allgemeine Materialien und Reagentien	121
2.2 Untersuchungsmaterial: Kontroll-Proben	122
2.3 RNA-Isolierung	122
2.3.1 RNA-Isolierung mittels Qiagen RNeasy® Midi Kit	122
2.3.2 RNA Isolierung nach Chomczynski und Sacchi	122
2.4 Nukleinsäuren-Quantifizierung und Gelelektrophorese	123
2.5 Array Analyse	123
2.6 Northern Blot Analyse	124
2.6.1 RNA-Gelelektrophorese: siehe 2.4	124
2.6.2 Northern Transfer	124
2.6.3 Herstellung von Sonden	124
2.7 Western Blot Analyse	126
2.7.1 Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung	126
2.7.2 Western Blot Analyse	126
2.8. Immunhistochemie und Konfokalanalyse	127
3. Abkürzungsverzeichnis	128
IX. LITERATURVERZEICHNIS	131
DANKSAGUNG	

I. EINLEITUNG

Das Herzversagen stellt ein komplexes pathophysiologisches Geschehen dar, das durch eine Vielzahl kardiovaskulärer Erkrankungen hervorgerufen werden kann. Die zweithäufigste Ursache für Herzversagen, nach der koronaren Herzerkrankung, ist die dilatative Kardiomyopathie (DCM) [Osterziel et al., 2001]. Diese ist durch eine Erweiterung und verminderte Kontraktionskraft der linken oder beider Herzkammern gekennzeichnet. Sie kann durch Infektionen, Immunreaktionen, verschiedene Noxen, sowie durch eine Überlastung der Ventrikel ausgelöst werden und mit anderen Herzkreislauf-Erkrankungen assoziiert, hereditär oder idiopathisch sein [WHO, 1996]. Da die therapeutischen Möglichkeiten der DCM gering sind, benötigen die meisten Patienten eine Herztransplantation, die die einzige kausale Therapieform darstellt [Cobet et al., 1998].

Auf Grund der schlechten Prognose der DCM ist das Studium der pathophysiologischen Prozesse, die ihr zu Grunde liegen, von großer Bedeutung [Towbin, 1998]. Nach dem aktuellen Stand der Forschung verursachen initiale Störungen, wie Mutationen oder Drucküberlastung, einen Verlust der strukturellen Integrität der Kardiomyozyten. Verschiedene Signale vermitteln diesen Verlust an den Zellkern und induzieren die Expression von Genen, die zu einem Umbau der Herzkammer führen [Nicol et al., 2000]. Diese Umstrukturierung kann die Schädigung der Herzmuskelzellen zunächst kompensieren. Die verlängerten Diffusionsstrecken im dilatierten Herzen führen jedoch zu einer Unterversorgung und langfristig zu einem Verlust der Zellen [Cobet et al., 1998]. Vermutlich finden parallel Verschiebungen im Expressionsmuster der Gene statt, die den Umbau steuern. Dadurch gerät dieser außer Kontrolle und verursacht eine reduzierte Herzfunktion [Hoshijima und Kenneth, 2002]. Durch das Versagen protektiver Signalwege kommt es zu einem weiteren Verlust von Herzmuskelzellen und die Endphase des Herzversagens wird eingeleitet [Chien, 2000].

Nach wie vor sind die initialen Auslöser der idiopathischen DCM und die molekularen Grundlagen des strukturellen Umbaus sowie des Herzversagens nur teilweise erforscht. Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von Gen Arrays und anderen Techniken einen Überblick über die Veränderung der Genexpression bei der DCM zu geben. Dadurch sollten neue Erkenntnisse über die pathophysiologischen Prozesse, die Ursache oder Folge der DCM sind, gewonnen werden und eventuell Gene, denen eine therapeutische oder diagnostische Bedeutung zukommen könnte, identifiziert werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Die dilatative Kardiomyopathie des Menschen

1.1 Definition

Kardiomyopathien sind laut Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) Erkrankungen des Herzmuskels, die mit einer Herzdysfunktion einhergehen. Sie werden gemäß ihrer Pathophysiologie als dilatative, hypertrophe, restriktive oder arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie klassifiziert. Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist durch eine Erweiterung und eine verminderte Kontraktionsleistung der linken oder beider Herzkammern gekennzeichnet. Die DCM stellt den Endzustand verschiedener Schädigungen des Herzmuskels dar. Sie ist häufig mit einer kompensatorischen Hypertrophie und/oder Arrhythmien assoziiert und führt durch kongestives Herzversagen zum Tode [WHO, 1980; WHO, 1996].

1.2 Epidemiologie

Die Inzidenz der DCM liegt in westlichen Industrienationen bei sechs bis acht Fällen pro 100.000 Einwohner. Die Krankheit tritt meist im mittleren Lebensalter (30-50 Jahre) auf. Männer sind häufiger betroffen als Frauen. Die Mortalität liegt bei 5-15 % pro Jahr und die Überlebensrate nach 6 Jahren bei 3 % [Cobert et al., 1998; National Heart, 1997; Wynne und Braunwald, 1980].

1.3 Ätiologie

Herzerkrankungen werden durch ein komplexes Zusammenwirken zwischen genetischen Faktoren, dem Lebenswandel und der Umwelt verursacht [Schönberger und Seidman, 2001]. In den meisten Fällen ist die DCM idiopathisch, das heisst, die eigentliche Genese ist unbekannt. Weiterhin treten Kardiomyopathien in Folge von Volumen- und Drucküberlastung des linken Ventrikels, toxischen oder physikalischen Einflüssen, Mangelerkrankungen, immunologischen oder viralen Erkrankungen auf [Cobert et al., 1998; National Heart, 1997; Wynne und Braunwald, 1980]. Eine Übersicht über die vielfältigen Ursachen der DCM gibt Tabelle 1.

Tab. 1: Ätiologie der DCM

Ätiologie der DCM			
[Osterziel et al., 2001; Wynne und Braunwald, 1980; Goodwin, 1982; WHO, 1980]			
Idiopathisch	40 %	Infiltrativ	6 %
Familiär	25 %	Amyloidose	
Inflammatorisch		Sarkoidose	
Autoimmun		Hämochromatose	
Infektiös	15 %	Endokrin	1 %
viral z.B. Coxsackie		Hypothyreoidismus	
rickettsial z.B. Coxiella		Adrenokortikale Insuffizienz	
bakterial z.B. Staphylokokken		Phaeochromozytom	
fungal z.B. Aspergillus		Mangelkrankheiten	
protozoal z.B. Chagas		Beri-beri	
metozoal z.B. Filarien		Thiamin-, Selen-, Carnitin-Mangel	
Toxisch		Kalium-Metabolismus-Störungen	
Alkohol	3 %	Hypophosphatämie, -kalzämie	
Anthrazykline	1 %	Systemische Erkrankungen	
Cocain	1 %	systemischer Lupus erythematosus	
Peripartal	5 %	Polyarthritis nodosa	
Kollagenose	4 %	Leukämie	

1.3.1 Idiopathische DCM

Ursprünglich wurden nur die primären beziehungsweise idiopathischen Kardiomyopathien als DCM im engeren Sinne betrachtet [WHO, 1980]. Die Entdeckung, dass viele scheinbar idiopathische Kardiomyopathien auf Mutationen beruhen und vererbar sind, führte dazu, dass die Einteilung in primäre und sekundäre Kardiomyopathien aufgegeben wurde. In der aktuellen Definition der WHO werden auch Herzmuskelerkrankungen, die eine bekannte Ursache haben oder mit anderen Erkrankungen assoziiert sind, zur DCM gezählt [WHO, 1996]. Mit der Erkenntnis, dass die DCM genetisch bedingt sein kann, wuchs die Bedeutung der molekularen Forschung zur Identifikation der Ursachen der (idiopathischen) DCM [Seidman und Seidman, 2001].

1.3.2 Familiäre DCM

Zirka ein Viertel der Fälle von DCM sind hereditär. Dabei handelt es sich überwiegend um autosomal dominant vererbte Mutationen. Es sind jedoch auch Fälle von rezessiven und gonosomalen Mutationen, sowie mitochondriale Deletionen bekannt [Ruppert und Maisch, 2000]. Auch bei den dominanten Mutationen beträgt die Penetranz durch den Einfluss modifizierender Gene und der Umwelt häufig nicht 100 % [Schönberger und Seidman, 2001]. Die Mutationen sind durch eine große klinische Variabilität, auch innerhalb einer Familie mit der gleichen Mutation, gekennzeichnet. Das Alter, in dem die Krankheit ausbricht, reicht von der frühen Kindheit bis zum hohen Alter. Ebenso schwankt die Schwere der Symptomatik und die Überlebensrate [Fatkin et al., 1999; Schönberger und Seidman, 2001]. Des Weiteren findet sich eine hohe genetische Heterogenität. Verschiedene Mutationen in einem Gen können unterschiedliche Krankheiten hervorrufen. So verursachen Mutationen im Lamin A/C Gen sowohl DCM als auch Emery-Dreifuss Muskeldystrophie, je nach dem, welche Region des Moleküls betroffen ist [Fatkin et al., 1999; Bonne et al., 1999]. Einige der bisher bekannten Mutationen verursachen eine reine DCM. Bei anderen treten weitere Phänotypen, wie mitraler Klappenvorfall, Gefäßerkrankungen, Skelettmuskelerkrankungen oder ein sensorineuraler Hörverlust auf [Schönberger und Seidman, 2001].

Neben der Suche nach chromosomalen Abberationen werden auch gezielt einzelne Proteine, denen eine mögliche Rolle in der Pathogenese zugeschrieben wird, auf Mutationen untersucht. So konnte zum Beispiel bei 350 Patienten mit einer DCM eine Mutation in Metavinculin, einem Protein, das die Aktinfilamente an den Glanzstreifen verankert, nachgewiesen werden. Der späte Krankheitsausbruch bei den betroffenen Patienten lässt vermuten, dass die Wirkung der Mutation in einer erhöhten Anfälligkeit besteht und erst durch das Zusammenkommen mehrerer Faktoren eine Krankheit ausgelöst wird [Olson et al., 2002].

Tabelle 2 stellt die bisher identifizierten mutierten Genloci bei der DCM, sowie die ihnen zugehörigen Gene, dar, soweit diese bekannt sind.

Tab. 2: Familiäre DCM

Krankheit	Erbgang	Chromosomale Lokation	Gen	Literaturquelle
DCM mit Gefäßerkrankung	AD	1p1-q21	Lamin A/C	[Fatkin et al., 1999]
DCM mit Gefäßerkrankung	AD	1p1-1q1	unbekannt	[Kass et al., 1994]
DCM	AD	1q32	Troponin T	[Durand et al., 1995]
DCM mit Gefäßerkrankung	AD	2q14-q22	unbekannt	[Jung et al., 1999]
DCM	AD	2q31	Titin	[Gerull et al., 2002; Siu et al., 1999]
DCM mit Skelettmuskelmyopathie	AD	2q35	Desmin	[Li et al., 1999]
DCM mit Gefäßerkrankung	AD	3p25-q22	unbekannt	[Olson und Keating, 1996]
DCM	AD	5q33-q34	δ -Sarcoglycan	[Tsubata et al., 2000]
DCM	AD	6q12-q16	unbekannt	[Sylvius et al., 2001]
DCM mit Gefäßerkrankung und Skelettmuskelmyopathie	AD	6q23	unbekannt	[Messina et al., 1997]
DCM mit sensorineuralem Hörverlust	AD	6q23-q24	unbekannt	[Schönberger et al., 2000]
DCM mit wolligem Haar und Keratoderma	AR	6p24	Desmoplakin	[Norgett et al., 2000]
DCM	AD	9q13-q22	unbekannt	[Krajinovic et al., 1995]
DCM mit Vorfall der Mitralklappe	AD	10q21-q23	unbekannt	[Bowles et al., 1996]
DCM	AD	14q11.2-q13	β -Myosin Heavy Chain	[Kamisago et al., 2000]
DCM	AD	15q14	kardiales Aktin	[Olson et al., 1998]
DCM	AD	15q22.1	α -Tropomyosin	[Olson et al., 2001]
DCM	XC	Xp21.2	Dystrophin	[Towbin et al., 1993]
DCM (Barth Syndrom)	XC	Xq28	Taffazin	[Bione et al., 1996]

AD: autosomomal dominant ; AR: autosomal rezessiv; XC: X-chromosomal

1.3.3 Entzündliche Kardiomyopathie

In einigen Fällen geht eine DCM auf ein inflammatorisches Geschehen durch Infektionen oder Autoimmunantikörper zurück [Wynne und Braunwald, 1980]. Diese können durch den Nachweis von inflammatorischen Infiltraten, wie Leukozyten, Makrophagen, etc. in Biopsiematerial diagnostiziert werden, wobei man ab einem Gehalt von ≥ 14 Leukozyten/mm² von einer Myokarditis spricht. Der Nachweis von Makrophagen, Lymphozyten oder Monozyten spricht für eine chronische Erkrankung [Maisch et al., 2000]. Eine der Hauptursachen für entzündliche Kardiomyopathien sind virale Infektionen, die durch einen Erregernachweis mittels PCR diagnostiziert werden können [Wynne und Braunwald, 1980; Maisch et al., 2000]. Ein wesentlicher Grund für die Schädigung der Herzfunktion bei (viralen) Infektionen ist die Freisetzung von Zytokinen wie TNF, welches über eine Aktivierung der Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) und die damit verbundene NO-Produktion die Kontraktilität reduziert [Maisch et al., 2000].

Eine weitere Ursache inflammatorischer Kardiomyopathien sind Autoantikörper. Diese treten zum Teil lediglich in Folge eines myokardialen Gewebeschadens auf, ohne eine pathogene Rolle zu spielen [Maisch et al., 1988]. In einigen Fällen konnte die pathogenetische Bedeutung der Antikörper experimentell nachgewiesen werden. So wurde in Rattenkardiomyozyten gezeigt, dass Anti-Myolemma-Antikörper eine lytische Aktivität haben [Maisch et al., 1993]. Antikörper gegen den β_1 adrenergen Rezeptor, die bei Patienten mit DCM isoliert werden konnten, verstärkten die Kontraktionskraft und verlängerten die Aktionspotentialdauer in isolierten Kardiomyozyten, was in vivo einen kardiotoxischen Effekt haben könnte [Christ et al., 2001]. Für Antikörper gegen den muskarinergen M2-Rezeptor konnte in Zellkulturstudien ein negativ chronotopischer Effekt nachgewiesen werden [Wallukat et al., 2000]. Antikörper gegen Rezeptoren des sympathischen und parasympathischen Nervensystems beeinflussen die myokardiale Funktion in vitro [Goin et al., 1999; Limas et al., 1990]. Weiterhin wurden unter anderem Antikörper gegen Strukturproteine wie Vimentin, Desmin, Laminin [Wilke et al., 1995], α - und β -Myosin [Carforio et al., 1996; Warraich et al., 1999] und Aktin [Maisch et al., 1993], gegen Proteine des Energiemetabolismus wie ANT [Schulze und Schultheiss, 1995] und NADD [Pohlner et al., 1997] sowie gegen Kalzium-Kanäle [Schulze et al., 1999] identifiziert.

1.4 Pathophysiologie

Unabhängig von der auslösenden Ursache ist die DCM durch eine Beeinträchtigung der Muskelfasern, die zu einer Umstrukturierung der Kammermuskulatur führt, charakterisiert. Durch den vergrößerten Kammerdurchmesser entsteht gemäß dem LaPlace-Gesetz eine erhöhte linksventrikuläre Wandspannung, so dass eine größere Kraft für die Muskelkontraktion benötigt wird. Dies bedingt eine kompensatorische Hypertrophie der Muskulatur, die initial zu einer Normalisierung des Volumen/Masse-Verhältnisses und damit zu einer sinkenden Wandspannung führt [Cobet et al., 1998]. Langfristig ist diese Kompensation den Anforderungen des Kreislaufs jedoch nicht gewachsen, zumal mit der Umordnung der Muskelfasern eine Verlängerung der Diffusionsstrecke und somit eine Unterversorgung der Myozyten einhergeht, die zu einem weiteren Verlust von Herzmuskelzellen und folgender Fibrotisierung führt. Es kommt somit zu einer sinkenden ventrikulären Kontraktilität, die eine erniedrigte Auswurffraktion und ein erhöhtes enddiastolisches Volumen bedingt. In Folge des Blutstaus können Thromben und Ödeme entstehen [Cobet et al., 1998; Natarajan et al., 2001].

1.5 Histologie

Die histologischen Veränderungen bei der DCM sind unspezifisch. Die Muskelfasern sind zum Teil hypertroph; häufig finden sich ungeordnete oder atrophische Myozyten. Die Zahl der Myofilamente und der funktionsfähigen Myozyten ist reduziert. In Bereichen mit hohem Muskelzellverlust überwiegt eine Ersatzfibrose [Ehler et al., 2001]. Weiterhin tritt eine perivaskuläre und interstitielle Fibrose auf. Teilweise finden sich inflammatorische Infiltrate. Es zeigen sich vergrößerte Zellkerne, veränderte Mitochondrien, eine Proliferierung der T-Tubuli, sowie eine Ansammlung von Lipiden und Glykogen [Saborowski; Wynne und Braunwald, 1980].

1.6 Klinik

Klinisch ist die DCM vor allem durch eine Dyspnoe und mangelnde Belastbarkeit gekennzeichnet. Zum Teil treten auch Lungenstauungen und Ödeme oder Zeichen einer Angina pectoris auf [Saborowski]. Die Prognose ist generell schlecht. Bei Patienten über 55 Jahren beträgt die 6-Jahres-Überlebensrate lediglich 3 %. Ab einer Auswurffraktion von <40 % treten die Symptome der Herzinsuffizienz auch in Ruhe auf [Natarajan et al., 2001]. Die Therapie zielt auf eine Reduktion der Insuffizienzsymptome ab und hat häufig keine lebensverlängernde Wirkung, weshalb die meisten Patienten eine Transplantation benötigen [Cobet et al., 1998].

2. Zelluläre und molekulare Grundlagen der DCM

Das Herz kann durch verschiedene Mechanismen auf Veränderungen reagieren: Mit jedem Schlag reagiert es auf die aktuelle Hämodynamik gemäß Starlings Gesetz, wobei durch eine angepasste Kontraktion die Vor- und Nachlast konstant gehalten werden. Kurzfristig kann die myokardiale Kontraktionskraft durch Veränderungen der Erregungs-Kontraktionskopplung reguliert werden. Auf langfristige Umstellungen reagiert das Herz mit einer veränderten Genexpression [Katz, 1988]. Obwohl die Pathophysiologie der DCM gut erforscht ist, sind ihre zellulären und molekularen Grundlagen noch weitgehend unbekannt [Towbin, 1998; Barrans et al., 2002].

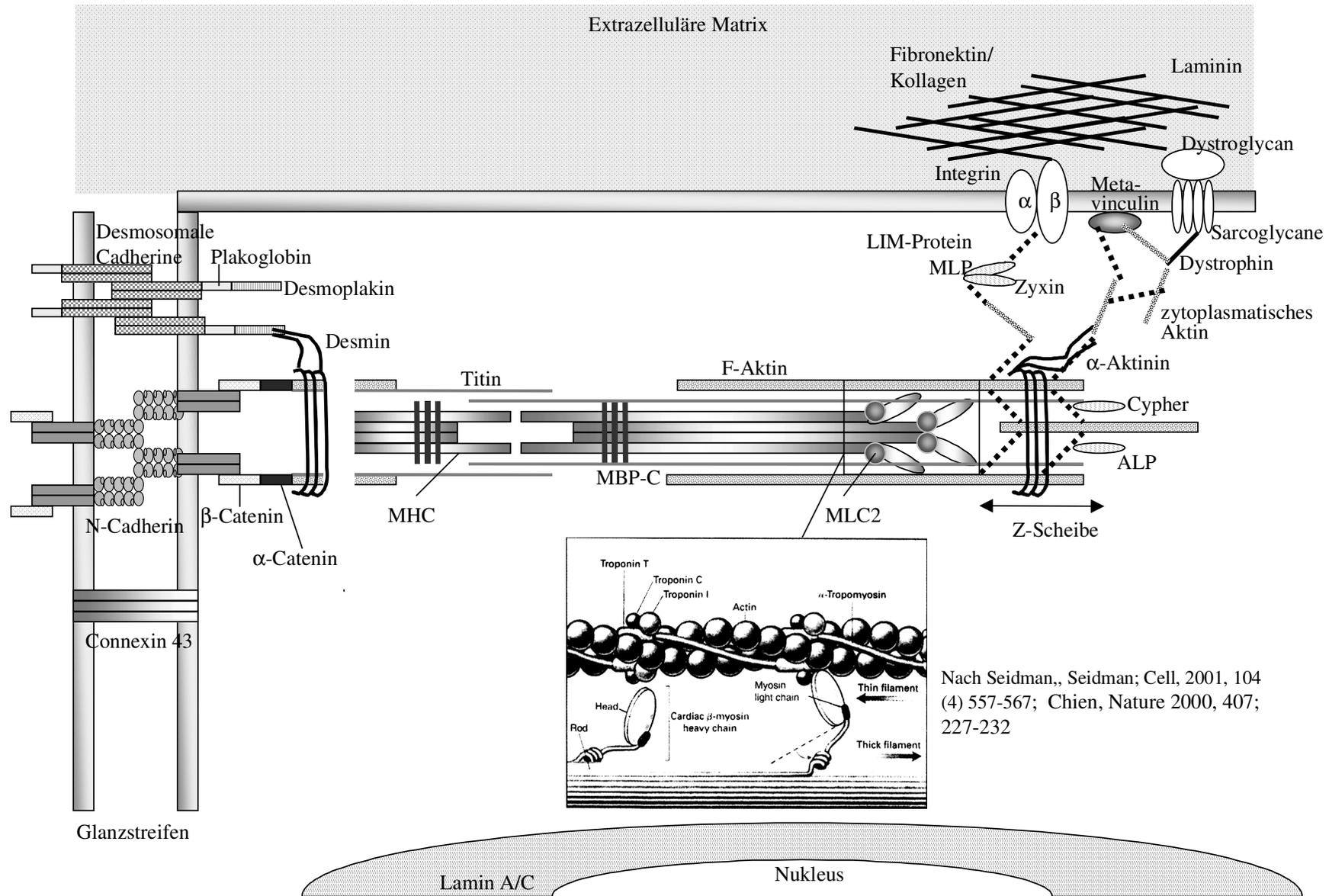
2.1 Aufbau der Herzmuskelzelle

Das kontraktile Gewebe des Herzens besteht aus Herzmuskelzellen, die durch spezielle interzelluläre Verbindungen, die Glanzstreifen, miteinander verbunden sind. Die bipolaren Kardiomyozyten sind mit kontraktile Elementen, den Myofibrillen gefüllt, deren basale Untereinheit das Sarkomer ist. Das Sarkomer ist definiert als der Abschnitt zwischen zwei Z-Scheiben, an denen die dünnen Filamente (Aktin) verankert sind. Diese sind verbunden mit Tropomyosin, welches mit dem Troponinkomplex (Troponin T, C, I) assoziiert ist. Der Troponinkomplex ist Kalzium-sensitiv und steuert die Kontraktion, die aus einer Interaktion der dünnen Filamente mit den Myosin-Köpfen der dicken Filamente resultiert. Die schweren Myosinketten sind im Zentrum des Sarkomers angeordnet und werden dort durch die M-Bande in Position gehalten. An die Köpfe der schweren Myosinkette sind leichte Myosinketten (alkalische und essentielle) gebunden, die die ATPase Aktivität der Köpfe regulieren [Alberts et al., 1994].

Das sarkomerische Skelett besteht aus den Proteinen Titin, α -Aktinin, und den Proteinen der M-Bande. Es ist verantwortlich für die Elastizität und Stabilität des Sarkomers.

Das Zytoskelett der Herzmuskelzelle dient dem Erhalt der Zellform und der mechanischen Resistenz. Es ist involviert in Signaltransduktionen und es verankert, unterstützt durch Membran assoziierte Proteine, subzelluläre Strukturen (Golgiapparat, Mitochondrien, Myofibrillen). Durch die Integrine ist es mit der extrazellulären Matrix verbunden [Hein et al., 1998b; Hein et al., 1998a].

Die Moleküle der extrazellulären Matrix (EM) werden von Fibroblasten sekretiert. Die EM besteht aus zwei Klassen von Makromolekülen. Die Glycosaminoglycane sind Polysaccharidketten, die meistens an Proteine gebunden als Proteoglycane vorliegen und eine stark hydrierte, gelartige Substanz bilden, in die die fibrösen Proteine eingebettet sind. Es gibt



Nach Seidman., Seidman; Cell, 2001, 104 (4) 557-567; Chien, Nature 2000, 407; 227-232

Abb. 1 Aufbau der Kardiomyozyte.

2.2 Zelluläre Veränderungen in der DCM

Der erste Schritt auf dem Weg zum Herzversagen sind intrinsische oder extrinsische Störungen. Zu den intrinsischen Faktoren zählen kontraktile oder zytoskeletäre Defizite. Extrinsische Einflüsse stellen die Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren durch extrazelluläre Liganden oder biomechanischer Stress durch Volumenüberlastung dar [Nicol et al., 2000]. Durch diese Störungen werden die Herzmuskelzellen fragiler. Um dies zu kompensieren, werden eine Reihe von Veränderungen ausgelöst, die als Remodeling bezeichnet werden. Unter diesem Begriff werden alle Prozesse zusammengefasst, die zu einer Veränderung der Herzform, -größe und -funktion führen. Dazu gehören die Verlängerung, die Hypertrophie und der Verlust von Kardiomyozyten, die Wandverdünnung und -erweiterung des linken Ventrikels, der Umbau der strukturellen Proteine und die Fibrose des Interstitiums [Cohn et al., 2000; Elsässer et al.].

In der ersten Phase erfolgt als Reaktion auf intrinsische Defizite oder extrinsische Stresssignale eine vermehrte Produktion von zytoskeletären Proteinen, wie Desmin und Tubulin. Da eine direkte Korrelation zwischen dem Anstieg zytoskeletärer Proteine und dem erhöhten linksventrikulären enddiastolischen Druck besteht, ist zu vermuten, dass letzterer auf eine erhöhte Steifigkeit des Myokards zurückzuführen ist [Heling et al., 2000].

In der zweiten Phase erfolgt ein Verlust von kontraktile Filamenten, der eine zusätzliche Verdichtung von Mikrotubuli und Disorganisation von Desmin nach sich zieht [Heling et al., 2000]. Dadurch wird zwar den Verlust von Myofibrillen kompensiert, es kommt aber zu einem weiteren Elastizitätsverlust. Mit der Reduktion von Proteinen des sarkomerischen Skeletts (Titin, α -Aktinin, Myomesin) schreitet die ventrikuläre Dysfunktion fort [Hein et al., 2000].

Von den Umbauprozessen sind auch die Glanzstreifen betroffen. Hier findet sich ein gestörtes Verteilungsmuster von interzellulären Verbindungsproteinen. Besonders in Regionen mit einer Umstrukturierung der Myofibrillen zeigt sich eine Umverteilung von N-Cadherin an die laterale Membran sowie eine reduzierte Expression und Disorganisation von Connexin 43, welches die Gap Junctions bildet [Hein et al., 1998b; Kostin et al., 1998].

Die Membran-assoziierten Proteine Vinkulin, Dystrophin, Spektrin und Talin werden als letztes vom Umbau betroffen. Diese sind mit dem Zytoskelett verbunden und stellen somit eine Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix und intrazellulären Strukturen her, wodurch sie normalerweise die Zelle stabilisieren. In der DCM werden sie vermehrt exprimiert und sind irregulär verteilt, was eine Störung der Zelladhäsion bedingt [Hein und Schaper, 1996a]. Die

Umordnung und Anhäufung dieser Proteine ist vermutlich ein Versuch die Deformation aufzuhalten.

In der extrazellulären Matrix findet sich eine Fibrose, gekennzeichnet durch die Anhäufung und unregelmäßige Verteilung von Fibronectin, Laminin und Kollagen I, III, IV [Nogami et al., 1996]. Die erhöhte Expression von Vimentin, einem Intermediärfilament von Fibroblasten, ist ebenfalls ein Zeichen für die zunehmende Fibrosierung des Gewebes [Heling et al., 2000]. Die Umordnung der Proteine der EM ist wahrscheinlich auf eine Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen in der DCM zurückzuführen. Diese bewirken einen verstärkten Abbau der Komponenten der EM, die durch eine überschießende Produktion unorganisierter Proteine ersetzt werden [Spinale, 2002]. Eine weitere Ursache für diese Prozesse ist vermutlich der Verlust von Myozyten durch Nekrose, Apoptose und andere Mechanismen, die Fibroblasten und Makrophagen zur Kollagen- und Fibronectinproduktion anregen [Hein und Schaper, 1996b].

Der zunehmende Zelltod im Verlauf der DCM wird darüber hinaus für den Übergang zur Dekompensation verantwortlich gemacht und ist auf vielfältige Ursachen zurückzuführen [Nicol et al., 2000]. Die Bedeutung der Apoptose, das heißt des programmierten Zelltodes, für die Progression der DCM konnte zum Beispiel in einem Hundemodell gezeigt werden, bei dem ein direkter Zusammenhang zwischen der zunehmenden Apoptose und der ventrikulären Dekompensation nachgewiesen wurde [Ceselli et al., 2001]. Die Bedeutung der Apoptose in der DCM des Menschen ist jedoch umstritten. Die Hauptursache für den Zellverlust ist wahrscheinlich der autophagische Zelltod durch Ubiquitinierung. Weiterhin spielt der Zellverlust durch Onkose (ischämischer Zelltod), der durch Komplement 9-Aktivierung nachgewiesen wird, eine große Rolle [Kostin et al., 2002]. Der geschätzte Verlust an Myozyten durch Apoptose pro Jahr liegt zwischen 83 % [Olivetti et al., 1997] und 1,3 % [Schaper et al., 1999]. Diese Diskrepanz liegt zum Teil daran, dass verschiedene Gruppen unterschiedliche Nachweismethoden, wie Elektronenmikroskopie, DNA-Laddering, Caspase Aktivierung, TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick end labeling), ISEL (in situ end labeling), verwenden und daran, dass es eine Vielzahl pro- und anti-apoptotischer Gene und Signalwege gibt.

2.3 Molekulare Veränderungen in der DCM

Zum endgültigen Verständnis der Zusammenhänge der DCM, wird es notwendig sein, Verbindungen zwischen klinischen Symptomen und den ihnen zu Grunde liegenden molekularen Veränderungen herzustellen [Towbin, 1998].

2.3.1 Defizite struktureller Proteine

Ein Weg dazu ist die Suche nach Mutationen (siehe Abschnitt 1.3.2). Dadurch konnten die Defizite verschiedener Strukturproteine als eine Ursache der DCM erkannt werden. Im Gegensatz zur idiopathischen hypertrophen Kardiomyopathie, die auf Grund der bisher erkannten genetischen Veränderungen als eine Störung des Sarkomers definiert werden konnte [Bowles et al., 2000], scheinen die Verhältnisse in der DCM jedoch komplexer zu sein. Von verschiedenen Autoren wurde die DCM als Zytoskeletopathie definiert, da einige Mutationen zytoskeletäre Protein wie Desmin oder Aktin betreffen [Bowles et al., 2000; Towbin, 1998]. Auch die Mutationen von Dystrophin, Metavinkulin, und Lamin A/C sprechen dafür, dass in der DCM vor allem Gene betroffen sind, deren Proteine für den Erhalt der strukturellen Integrität der Kardiomyozyte verantwortlich sind [Chien, 2000]. Darüber hinaus führen aber auch andere Pathomechanismen zu diesem Krankheitsbild [Seidman und Seidman, 2001]. Die Mutationen von β -Myosin heavy chain, Troponin T und α -Tropomyosin deuten auf eine verminderte Kontraktionskraft des Sarkomers als Verursacher der DCM in diesen Familien hin [Morimoto et al., 2001; Schönberger und Seidman, 2001]. Die DCM wurde auch als eine Krankheit mit gestörter Kraftübertragung definiert, da zum Beispiel die Mutation im Aktin die Region betrifft, die für die Verankerung an der Z-Bande verantwortlich ist und eine verminderte Kraftübertragung vom Sarkomer auf die extrazelluläre Matrix bedingt [Nicol et al., 2000].

Einige der durch Mutationssuche erkannten Pathomechanismen spielen auch in der idiopathischen oder inflammatorischen DCM eine Rolle. So verursacht die Desminmutation in den betroffenen Familien eine Akkumulation des mutierten Proteins [Li et al., 1999]. Diese Anhäufung findet sich auch bei Patienten mit idiopathischer DCM [Heling et al., 2000], und in der entzündlichen DCM konnten Autoantikörper gegen Desmin nachgewiesen werden [Wilke et al., 1995].

Die Kraftübertragung durch den Dystrophin-Glycoprotein-Komplex kann sowohl durch eine Mutation von δ -Sarcoglycan [Tsubata et al., 2000], als auch durch eine enterovirale Myokarditis beeinträchtigt werden, da die Viren eine Protease produzieren, die im Modell den Dystrophin-Glycoprotein-Komplex spalten kann [Badorff et al., 1999]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass

diese beiden Mechanismen sich verstärken können. Dystrophin-null-Mäuse weisen eine erhöhte Anfälligkeit für eine Enterovirus-induzierte Kardiomyopathie auf. Eine Reexpression von Dystrophin hat eine protektive Wirkung. Dies könnte bedeuten, dass auch Menschen mit einer familiären DCM stärker durch Enterovirusinfektionen gefährdet sind [Xiong et al., 2002].

2.3.2 Signaltransduktion

Damit es zu den in 2.2 beschriebenen zellulären Veränderungen kommen kann, muss die Zelle ihre Genexpression umstellen. Störungen in der kontraktilen Funktion oder im Wandstress müssen über Signalwege an den Zellkern weitergeleitet werden, wo sie die Transkription verschiedener Gene beeinflussen, die zum Phänotyp der DCM führen [Nicol et al., 2000].

In Folge von mechanischem Stress erfolgt durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) die Aktivierung des MAPK-Signalweges, über den verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie die Kinasen JAK, ERK, p38 oder JNK, gesteuert werden [Nicol et al., 2000]. Diese steigern entweder die Überlebensfähigkeit oder das Wachstum der Myozyten [Hoshijima und Kenneth, 2002]. Durch die Aktivierung dieser Kinasen würde eine unkontrollierte Hypertrophie ausgelöst. Parallel dazu werden jedoch auch Gegenspieler, wie zum Beispiel SOCS3, ein Suppressor der gp130-JAK Signaltransduktionskette, induziert. Diese Balance führt zu einer kompensatorischen Hypertrophie als Reaktion auf die Dehnungsbelastung. Störungen in diesem Gleichgewichts sind eventuell für eine weitere Funktionsstörung des Herzens verantwortlich [Hoshijima und Kenneth, 2002].

Ein weiterer Pathomechanismus der DCM ist die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems in Folge des beeinträchtigten Kreislaufs [Sereneri et al., 2001]. Es konnten eine vermehrte Expression von Renin, Angiotensin II [Sereneri et al., 2001], Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) [Studer et al., 1994], der ACE Bindungsstellen und eine erhöhte ACE Aktivität [Zisman et al., 1998] im Herzversagen nachgewiesen werden. ACE katalysiert die Aktivierung von Angiotensin II aus Angiotensin I und ist darüber hinaus identisch mit der Kininase II, die Bradykinin und andere Kinine inaktiviert.

Die erhöhte ACE Aktivität, die zu einer Kinindeaktivierung führt, trägt vermutlich zur Fibrose in der DCM bei, da in Mausmodellen ein direkter Zusammenhang zwischen Kininaktivität, Fibrose und Herzfunktion gezeigt werden konnte [Tschöpe et al., 1997]. Eine erhöhte Kininaktivität reduziert die Fibrose und verbessert die Herzfunktion [Linz et al., 1995a; Linz et al., 1995b]. Dahingegen induziert der Knockout des Bradykinin B2 Rezeptors [Emanuelli et al., 1999] oder des Kininaktivators (Kallikrein) [Meneton et al., 2001] eine reparative Fibrose mit Wandverdünnung und eingeschränkter Herzfunktion. Angiotensin II und Aldosteron sind ebenfalls mitverantwortlich für den Umbau des kardialen Interstitiums und die erhöhte Steifigkeit, da sie

kardiale Fibroblasten aktivieren, die daraufhin vermehrt Kollagen I und III produzieren [Wilke et al., 1996].

Weiterhin induziert Angiotensin II die Transkription hypertropher Gene [Molkentin et al., 1998]. Angiotensin II, GATA 4 und Endothelin 1 sind Faktoren, die in der Phase der kompensatorischen Hypertrophie durch Bindung an den α -adrenergen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) die Phospholipase C (PLC) aktivieren. Diese wiederum führt über Diacylglycerol (DAG) zu einer Aktivierung von Kalzium/Calmodulin, das über Calcineurin und NFAT beziehungsweise über die CaMKinase die Expression verschiedener Gene, wie TNF und ANF beeinflusst [Nicol et al., 2000].

2.3.3 Aktivierung fetaler Gene

Ein charakteristisches Merkmal der kompensatorischen Hypertrophie ist die Induktion von Genen beziehungsweise Isoformen, die normalerweise fetal aktiv sind [Hoshijima und Kenneth, 2002]. Das bekannteste Beispiel dafür ist die erhöhte ventrikuläre Produktion des atrialen natriuretischen Faktors ANF, der im gesunden adulten Herzen nur im Vorhof exprimiert wird [Nicol et al., 2000]. Ebenso typisch ist der Wechsel zum fetalen Energiemetabolismus (siehe 2.3.4).

2.3.4 Veränderter Energiemetabolismus

Der verschlechterte Energiemetabolismus des Herzens wird als weiterer Pathomechanismus der DCM gesehen. Dafür spricht die Tatsache, dass mitochondriale Mutationen DCM verursachen können [Ruppert und Maisch, 2000]. Die Störung der mitochondrialen DNA ist vermutlich sekundärer Natur und auf eine Schädigung durch freie Radikale zurückzuführen [Jarreta et al., 2000]. Weiterhin wurde in verschiedenen Studien eine Reduktion mitochondrialer Enzymaktivitäten und Änderungen im Expressionsmuster beobachtet. Jarreta et al. fanden zum Beispiel eine verringerte Aktivität von Komplex III der respiratorischen Kette, die für eine verminderte Energieversorgung mitverantwortlich ist [Jarreta et al., 2000]. Es findet ein Isoformen-Wechsel des Adenin Nukleotid Translokator (ANT) statt, der zu den stark verringerten ATP-Mengen in der linken Kammer bei der DCM beitragen kann [Dörner und Schultheiss, 2000]. Der ANT ist der einzige mitochondriale ATP und ADP Transporter. Von den drei Isoformen ist ANT2 der effektivste. In der DCM wird ANT1 vermehrt und ANT2 vermindert gebildet. Dieser Isoformenwechsel führt also zu einer reduzierten ANT-Funktion.

Im Rahmen der Energieversorgung des Herzens findet ein Wechsel vom normalen adulten Fettoxidationsmetabolismus zum fetalen Glukosemetabolismus statt. Dies wird zum Beispiel

durch die verminderte Expression fettoxidierender Enzyme in der DCM deutlich [Barger und Kelly, 1999; Sack et al., 1996] und ist vermutlich ein adaptiver Prozess, um den Sauerstoffverbrauch im Herzen zu senken [Dávila-Román et al., 2002]. Langfristig entsteht jedoch ein Energiedefizit, und es kommt zu einer Anreicherung nichtoxidiertes Fettsäuren in der Herzmuskelzelle, die zu einer Lipointoxikation und Herzversagen führen können [Dávila-Román et al., 2002].

2.3.5 Gestörte Kalziumhomöostase

Eine wichtige Rolle in der Pathogenese der DCM spielt der gestörte intrazelluläre Kalzium-Umschlag [Flesch et al., 1996], der für systolische wie diastolische Fehlfunktionen verantwortlich ist [Perreault et al., 1990]. Kalzium ist notwendig für die kardiale Kontraktion und Relaxation. Durch eine Änderung des Membranpotentials strömt Kalzium durch den L-Typ-Kalzium-Kanal in die Zelle ein und löst eine weitere Freisetzung von Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) durch den Ryanodin-Rezeptor (einem Kalziumkanal) aus, wodurch die Kontraktion initiiert wird. Die Relaxation wird durch die Wiederaufnahme von Kalzium in das SR durch die sarkoplasmatische Retikulum Kalzium ATPase (SERCA) vermittelt. Dieser Prozess wird durch die Aktivität von Phospholamban, einem Inhibitor der SERCA reguliert. Phospholamban ist im gesunden Herzen überwiegend phosphoryliert und somit inaktiv. Die Kalziumbalance wird über den β -adrenergen Signalweg gesteuert. Durch den β_1 -adrenergen Rezeptor (AR) wird die Proteinkinase A aktiviert, die unter anderem den L-Typ Kalziumkanal, Phospholamban und kontraktile Proteine phosphoryliert und somit die Kontraktionskraft des Herzens steigert [Nicol et al., 2000].

Schon früh wurde erkannt, dass das versagende Herz unfähig ist, in der Diastole einen niedrigen Kalzium Spiegel herbeizuführen [Gwathmey et al., 1987]. Daraus resultiert eine verlängerte Zeit zum Spannungsaufbau und zur Relaxation, die durch eine verminderte Aufnahme von Kalzium durch die SERCA bedingt ist [Beuckelmann et al., 1995; Schmidt et al., 1998]. Die reduzierte Wiederaufnahme von Kalzium hat ebenfalls eine verminderte Freisetzung von Kalzium aus dem ER zur Folge, wodurch weniger Kalzium an Troponin C binden kann. Die dadurch verursachte verminderte Aktivierung der Myofilamente führt zu einer geringeren Krafterzeugung.

Flesch et al. konnten zeigen, dass dies nicht auf eine verminderte Expression von SERCA zurückzuführen ist, da sowohl diese als auch Phospholamban zwar auf mRNA, nicht jedoch auf Proteinebene vermindert exprimiert werden [Flesch et al., 1996]. Ein Faktor, der zu der

verringerten SERCA Aktivität beiträgt, ist ein Isoformenshift. In der DCM wird vermehrt die Skelettmuskel-Isoform 1 gebildet. Im Gegensatz zur Herzmuskel-Isoform, die Kalzium gesteuert ist, wird die Isoform 1 jedoch durch Spannung induziert, so dass es zu einer fehlerhaften Regulation der SERCA kommt [Münch et al., 2001]. Eine weitere Ursache ist die Hypophosphorylierung von Phospholamban in der DCM, die zu einer Blockade der SERCA führt [Chien, 2000]. Die verringerte Phosphorylierung beruht auf einer Desensitivierung des β -adrenergen Signalweges in der DCM und anderen Kardiomyopathien [Mittmann et al., 1998]. Diese Veränderung stellt vermutlich einen der frühesten Prozesse dar, die den Übergang von der kompensatorischen Hypertrophie zum Herzversagen einleiten. Die Gabe von β -AR Antagonisten kann daher die Herzfunktion verbessern und das Herzversagen hinauszögern [Cobet et al., 1998; Nicol et al., 2000]. So wie im Fall der β -Blockade kann das Verständnis der molekularen Grundlagen der DCM neue therapeutische Wege eröffnen [Hoshijima und Kenneth, 2002].

2.3.6 Pro- und anti-apoptische Signalwege

Einen weiteren Prozess, der vermutlich für die Initiation des Herzversagens mitverantwortlich ist, stellt das Versagen von protektiven Signalwegen dar, die ab einem gewissen Zeitpunkt die zunehmende Apoptose nicht mehr aufhalten oder kompensieren können [Chien, 2000]. Expressionsanalysen mit Mikroarrays konnten zeigen, dass die Apoptose vermutlich durch eine verminderte Expression anti-apoptotischer Gene bedingt ist. Ein wichtiger Signalweg in der Apoptose ist die Aktivierung von TNF- α in der DCM [Torre-Amione et al., 1996]. TNF- α induziert jedoch nicht nur proapoptotische Signale, sondern aktiviert zugleich über den TNF- α Rezeptor 1 den anti-apoptotischen NF- κ B Signalweg. In der Endphase des Herzversagens werden dieser Rezeptor und die Gene dieses Signalweges vermindert exprimiert, so dass pro-apoptotische Signale überwiegen [Steenbergen et al., 2002]. Die besondere Bedeutung, die TNF- α in der Progression des Herzversagens spielt, zeigen auch die erfolgreichen Bemühungen, durch Medikation mit TNF- α Antagonisten die Herzfunktion bei Patienten im Anfangsstadium des Herzversagens zu verbessern [Bozkurt et al., 2001].

Abbildung 2 stellt eine Zusammenfassung der bekannten Pathomechanismen der DCM dar.

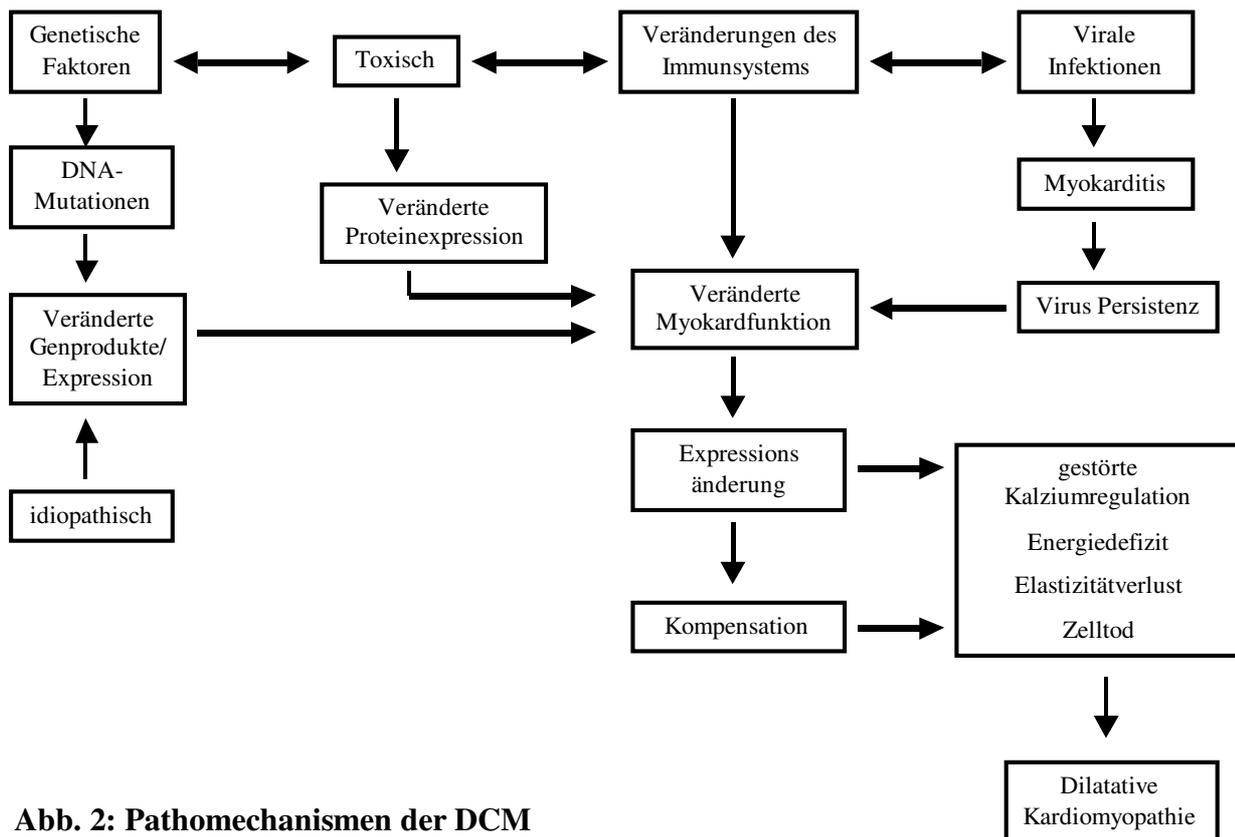


Abb. 2: Pathomechanismen der DCM

3. DCM im Tiermodell und in Zellkulturstudien

3.1 DCM im Tiermodell

Eine Möglichkeit, die molekularen Grundlagen der DCM zu untersuchen, ist die Erzeugung von Tieren, die durch mechanische oder genetische Beeinflussung des Herzkreislaufsystems das klinische Bild einer DCM zeigen und als Modell der humanen DCM fungieren. Zwei häufig verwendete Modelle zum Studium der DCM sind MLP-defiziente und TOT-Mäuse. Das Muskel LIM Protein MLP kolokalisiert mit Aktin und ist essentiell für die Organisation des Zytoskeletts. Homozygote knockout Mäuse entwickeln eine DCM mit Hypertrophie und sterben früh am Herzversagen [Arber et al., 1997]. Die TOT-Mäuse weisen eine transgene Überexpression von Tropomodulin im Herzen auf. Diese Mäuse entwickeln mit 3-4 Wochen eine DCM mit erweiterten Kammern, Wandverdünnung und eingeschränkter systolischer Funktion. Auch zellulär und genetisch weisen die TOT-Mäuse Ähnlichkeiten mit der DCM des Menschen auf. So finden sich ein Myozytenverlust und eine vermehrte Expression von ANF [Sussman et al., 1998]. Desweiteren gibt es Tiere, wie den TO-2 Hamster, der das klinische Bild einer DCM auf Grund

einer spontanen Mutation zeigt. Nigro et al. konnten nachweisen, dass diese Mutation das δ -Sarcoglycan-Gen betrifft [Nigro et al., 1997].

An diesen Tiermodellen kann das Zusammenspiel zwischen kardialer Struktur, kontraktile Funktion und regulatorischen Signalwegen untersucht werden. So verhindert eine Verabreichung des Calcineurininhibitors Cyclosporin A eine DCM in TOT-Mäusen und MLP defizienten Mäusen und beweist somit die pathogenetische Bedeutung des überaktivierten Calcineurinsignalweges in der DCM. Neben der Klärung von Pathomechanismen, werden Tiermodelle auch zur Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten verwendet. So wurden zum Beispiel MLP-knock-out Mäuse mit Mäusen gepaart, die einen Phospholambandefekt haben. Der Ausfall von Phospholamban, einem Inhibitor der SERCA, verstärkt die Kalziumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum und verhindert die DCM in den MLP-knockout Mäusen [Minamisawa et al., 1999]. Der Kreuzungsversuch weist auf die große Bedeutung der verminderten SERCA Aktivität in der Pathogenese der DCM hin und lässt eine pharmakologische Hemmung von Phospholamban als Möglichkeit zur Verbesserung der Herzfunktion bei der DCM erscheinen [Schönberger und Seidman, 2001]. Desweiteren werden mögliche Gentherapieverfahren in DCM Modellen getestet. So zeigen TO-2 Hamster nach einer rAAV (rekombinantes adeno-assoziiertes Virus)-vermittelten somatischen Gentherapie eine deutliche Verbesserung der Herzleistung und eine höhere Überlebensrate, was die Autoren hoffen lässt, dass dieser Vektor ebenfalls für eine Gentherapie beim Menschen geeignet ist [Kawada et al., 2002].

An transgenen Tieren, meistens Mäusen, bei denen ein Gen, dem eine besondere Rolle bei der Entwicklung der DCM zugeschrieben wird, entweder ausgeschaltet, mutiert oder überexprimiert wird, kann überprüft werden, ob die Mutation oder Expressionsänderung dieses Gens alleine ausreicht, um eine DCM zu verursachen. Anhand der TO-2 Hamster, sowie an MLP- und Desmin-knock-out Mäusen, konnte nachgewiesen werden, dass zytoskeletäre Dysfunktionen eine DCM auslösen können [Arber et al., 1997; Milner et al., 1996]. Der Knockout des mitochondrialen Transkriptionsfaktor A (Tfam) führt zum Phänotyp der DCM und zeigt, dass die Funktion der Atmungskette essentiell für die normale Funktion des Herzens ist [Wang et al., 1999].

3.2 Zellkulturstudien

Studien an isolierten Herzmuskelzellen in Kultur werden durchgeführt, um den Effekt bestimmter Einflüsse, wie Dehnung der Zellen, Sauerstoffmangel oder die Zugabe von Faktoren, auf die Zellen zu klären oder um einzelne Genfunktionen zu analysieren.

So konnte an isolierten Kardiomyozyten die pathogenetische Bedeutung der Troponin T Mutationen, die dilatative und hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) verursachen, geklärt werden. Während die in der DCM gefundene Mutation die Kalziumsensitivität des kontraktilen Apparates senkte, bewirkte die HCM auslösende Mutation eine erhöhte Kalziumsensitivität [Morimoto et al., 2001].

Durch Dehnung von Herzmuskelzellen kann der Einfluss der Dilatation studiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass der Dehnungsstress die Expression bestimmter Gene, zum Beispiel N-Cadherin, induziert [Zhuang et al., 2000] oder dass die verminderte Expression von Adhäsionsproteinen, wie Plakoglobin, die Dehnungsresistenz von Kardiomyozyten reduziert [Schnittler et al., 1997]. Durch den Entzug von Sauerstoff kann der Einfluss der Hypoxie in der DCM auf die Zellen studiert werden. So wird beispielsweise die Expression von Integrin β 1 durch Sauerstoffmangel angeregt [Jiang et al., 2001].

4. Expressionsanalysen

Durch die Expressionsanalyse von erkranktem Gewebe können neue Einblicke in die Grundlagen der DCM gewonnen, neue Kandidaten für eine therapeutische Intervention und Marker für diagnostische und prognostische Zwecke identifiziert werden [Cook und Rosenzweig, 2002]. Gängige Methoden zur Untersuchung der Genexpression sind der Northern Blot, die RT-PCR, sowie RNase protection assays. Diese Methoden haben den Nachteil, dass sie jeweils nur die Analyse einzelner Gene zulassen. Dagegen ermöglichen Gen Arrays die Untersuchung einer großen Anzahl von bekannten Genen in einer einzigen Reaktion. Andere Methoden, mit denen dies möglich ist, sind Differential Display, SAGE (serial analysis of gene expression) und TOGA (total analysis of gene expression). Hierbei ist eine zeitraubende Sequenzierung der so entdeckten differentiell exprimierten Gene notwendig. Diese Methoden ermöglichen jedoch, im Gegensatz zum Array, die Entdeckung neuer, bisher unbekannter Gene [Freeman et al., 2000]. Für die hier untersuchte Fragestellung erschien es jedoch sinnvoll, bereits bekannte Gene auf ihre Funktion in der DCM zu untersuchen, da auch bei diesen ein hoher Bedarf an Aufklärung besteht.

4.1 Expressionsanalyse mit Genarrays

4.1.1 Funktionsprinzip der Array Analyse

Das Prinzip eines Arrays besteht darin, dass RNA von zwei oder mehreren zu vergleichenden Proben in cDNA umgeschrieben und dabei radioaktiv oder mit Fluoreszenz markiert wird. Diese cDNA wird als Ziel-DNA bezeichnet. Die Analyse dieser RNA erfolgt in einer Art umgekehrtem Northern Blot. Im Gegensatz zu diesem ist bei dem Array die Sonde, mit der die Expression eines Gens analysiert werden soll, fest an eine Matrix gebunden. Die komplementäre cDNA-Sequenz aus der umgeschriebenen und markierten RNA bindet in einer Hybridisierungsreaktion an diese Sonde, wobei die RNA jeder zu untersuchenden Probe auf einem eigenen Filter analysiert wird. Je stärker ein Gen exprimiert ist, desto mehr radioaktive cDNA bindet an das Gegenstück auf dem Filter und umso stärker erscheint dort später ein Signal [Strothmann und Gromoll, 1999]. Die radioaktiv markierten Signale werden durch Bestrahlung einer PhosphorImager Platte, deren Emulsion durch die radioaktive Strahlung angeregt wird, sichtbar gemacht. Durch Einscannen mit einem Laser mit geeigneter Wellenlänge wird die Energie der angeregten Elektronen freigesetzt, durch den PhosphorImager detektiert und in ein digitales Bild umgewandelt. Mit Hilfe einer speziellen Software kann das betreffende Gen über seine Lokalisation auf dem Filter identifiziert werden. Da auf einer Matrix einige hundert bis tausend Sonden gebunden werden können, ist es möglich mit diesem Prinzip eine Vielzahl von Genen in einem Arbeitsschritt zu untersuchen. Durch Vergleich der Signalstärken der Gene auf den Filtern können differentiell exprimierte Gene identifiziert werden [Clontech, 2000]. Dabei werden relative (nicht absolute) Veränderungen in der Genexpression detektiert. Die Array Analyse stellt ein semiquantitatives Verfahren dar, da die Effizienz der reversen Transkription sowie der Hybridisierungseffizienz zwischen den Genen stark schwankt [Freeman et al., 2000].

4.1.2 Array-Varianten

Als Matrix für die Sonden werden Nylon-Membranen oder Objektträger verwendet. Auf diese werden in unterschiedlicher Zahl und Dichte PCR-generierte cDNA-Fragmente, cDNA-Klone oder synthetische Oligonukleotide als Sonden aufgetragen [Strothmann und Gromoll, 1999]. Bei den sogenannten Makroarrays handelt es sich um Membranen, auf die einige hundert bis tausend Gensequenzen als Sonden mit Pipetierrobotern auf bestimmte Koordinaten aufgetragen und dort fixiert werden. Es können dabei alle Arten von Sonden verwendet werden. Zum Teil werden pro Gen mehrere Sonden, die zu verschiedenen Bereichen dieses Gens komplementär sind, oder

Duplikate der Sonde gespottet. Dies gibt eine zusätzliche Sicherheit, da nur diejenigen Signale ausgewertet werden, die mit allen Sonden eines Gens reagieren und somit eine unspezifische Hybridisierung ausschliessen lassen. Dies ist bei Arrays mit cDNA-Sonden nur bis zirka 1000 Sonden möglich, da die Dichte sonst zu hoch wäre. Bei der Verwendung von Oligonukleotidsonden ist ein mehrfaches Spotten erforderlich, da diese eine deutlich geringere Spezifität als cDNA-Fragmente haben. Die Detektion erfolgt bei Makroarrays durch radioaktive Markierung der zu untersuchenden RNA [Freeman et al., 2000].

Weitere Array-Verfahren sind die Mikroarrays, bei denen als Träger der Sonden Objektträger verwendet und die durch Fluoreszenzmarkierung detektiert werden. Sie zeichnen sich durch eine erheblich höhere Anzahl (einige 10.000) und Dichte an Sonden aus. In der Regel werden Oligonukleotidsonden, die in mehrfachen Replikaten gespottet werden, verwendet. High-Density-Oligonukleotid-Arrays, werden durch eine in situ Generation der Oligonukleotid-Sonden auf den Objektträgern erzeugt [Cook und Rosenzweig, 2002].

Ein weiterer Unterschied verschiedener Arrays besteht in der Erzeugung der "Ziel-cDNA" durch Umschreiben der RNA. Dies kann entweder durch ein sogenanntes "random prime labeling" erfolgen oder durch genspezifische Primer. Bei dem letzteren Verfahren werden gezielt nur die RNA Sequenzen umgeschrieben, deren komplementäre Sonde auf der Matrix gespottet ist, während beim random prime labeling die gesamte RNA in cDNA transkribiert wird. Die Verwendung von genspezifischen Primern hat den Vorteil, dass die "Ziel-cDNA" eine hohe Spezifität und Sensitivität aufweist, im Gegensatz zum random prime labeling, bei dem diese zum größten Teil aus Sequenzen besteht, deren Gegenstück sich nicht auf dem Array befindet und somit unerwünschte Kreuzhybridisierungen und einen hohen Hintergrund erzeugen können. Die Herstellung genspezifischer Zielsequenzen ist allerdings nur bei einer "geringen" Anzahl von Genen möglich und nicht bei Mikro- oder High-Density-Oligonukleotid-Arrays [Freeman et al., 2000].

4.1.3 AtlasTM cDNA Expression Arrays

Die AtlasTM cDNA Expression Arrays (Clontech, Heidelberg) sind Makroarrays, bei denen zirka 200-650 bp lange cDNA Fragmente auf eine positiv geladene Nylon Membran aufgetragen sind. Diese enthalten weder repetitive Elemente, noch homologe Regionen oder poly-A-Sequenzen, um Kreuzhybridisierungen möglichst unwahrscheinlich zu machen. Neben den zu untersuchenden Genen enthalten sie Plasmid- und Bakteriophagen-DNA als Negativkontrolle sowie

Haushaltsgene als Positivkontrolle. Jedes Kit enthält mehrere Membranen, so dass Kontrolle und Experiment parallel analysiert werden können. Die Synthese der "Ziel-cDNA" aus der RNA erfolgt mittels eines Array spezifischen Primer mixes, wobei die "Ziel-cDNA" durch den Einbau von [$\alpha^{33}\text{P}$]-dATP radioaktiv markiert wird [Clontech, 2000].

4.2 Expressionsanalyse von Proteinen

Neben der Genexpressionsanalyse ist die Untersuchung der korrespondierenden Proteine von großem Interesse, da Veränderungen auf mRNA Ebene nicht zwingend mit einer konvergierenden Änderung der Protein-Expression einhergehen [Freeman et al., 2000]. So konnten Coumans et al. eine veränderte mRNA Expression von Aktin und Myosin Heavy Chain bei gleichbleibendem Proteingehalt in der humanen DCM nachweisen [Coumans et al., 1997]. Einen reduzierten mRNA Gehalt bei stabilem Proteinspiegel, der auf eine posttranskriptionale oder posttranslationale Regulation schliessen lassen, beobachteten auch Flesch et al. bei der Untersuchung der SERCA- und Phospholamban-Expression in der DCM [Flesch et al., 1996]. In einer Studie von Zolk et al. [Zolk et al., 2000], in der die Expression des kardialen LIM Domäne Protein (LIM) untersucht wurde, fand sich ebenfalls ein Hinweis auf einen erhöhten Umbau dieses Proteins. Hier war allerdings das Protein in der DCM vermindert, während die mRNA stabil exprimiert wurde. Da der Phänotyp einer Zelle letztlich die Summe der in ihr vorhandenen Proteine widerspiegelt, wird in den nächsten Jahren der Schwerpunkt vieler Studien auf der Untersuchung der Proteine liegen [Arell et al., 2001]. Aus diesen Gründen wird empfohlen, im Anschluss an die Array Analyse die Expression der korrespondierenden Proteine mittels Western Blot Analyse zu untersuchen [Freeman et al., 2000].

5. Ziel der eigenen Untersuchungen und Versuchsaufbau

Die dilatative Kardiomyopathie kann durch verschiedene extrinsische wie intrinsische Stimuli, die eine eingeschränkte Herzfunktion verursachen, ausgelöst werden [Nicol et al., 2000]. Das Herz reagiert darauf mit einer kompensatorischen Umstrukturierung, die den Prozess der Herzinsuffizienz jedoch nur befristet verzögern kann. Wird die Balance von Faktoren, die diesen Umbau kontrollieren, gestört kommt es zum Herzversagen [Hoshijima und Kenneth, 2002]. Die Analyse der molekularen Grundlagen ist essentiell für das Verständnis der klinischen Symptome der DCM [Towbin, 1998] sowie für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien und

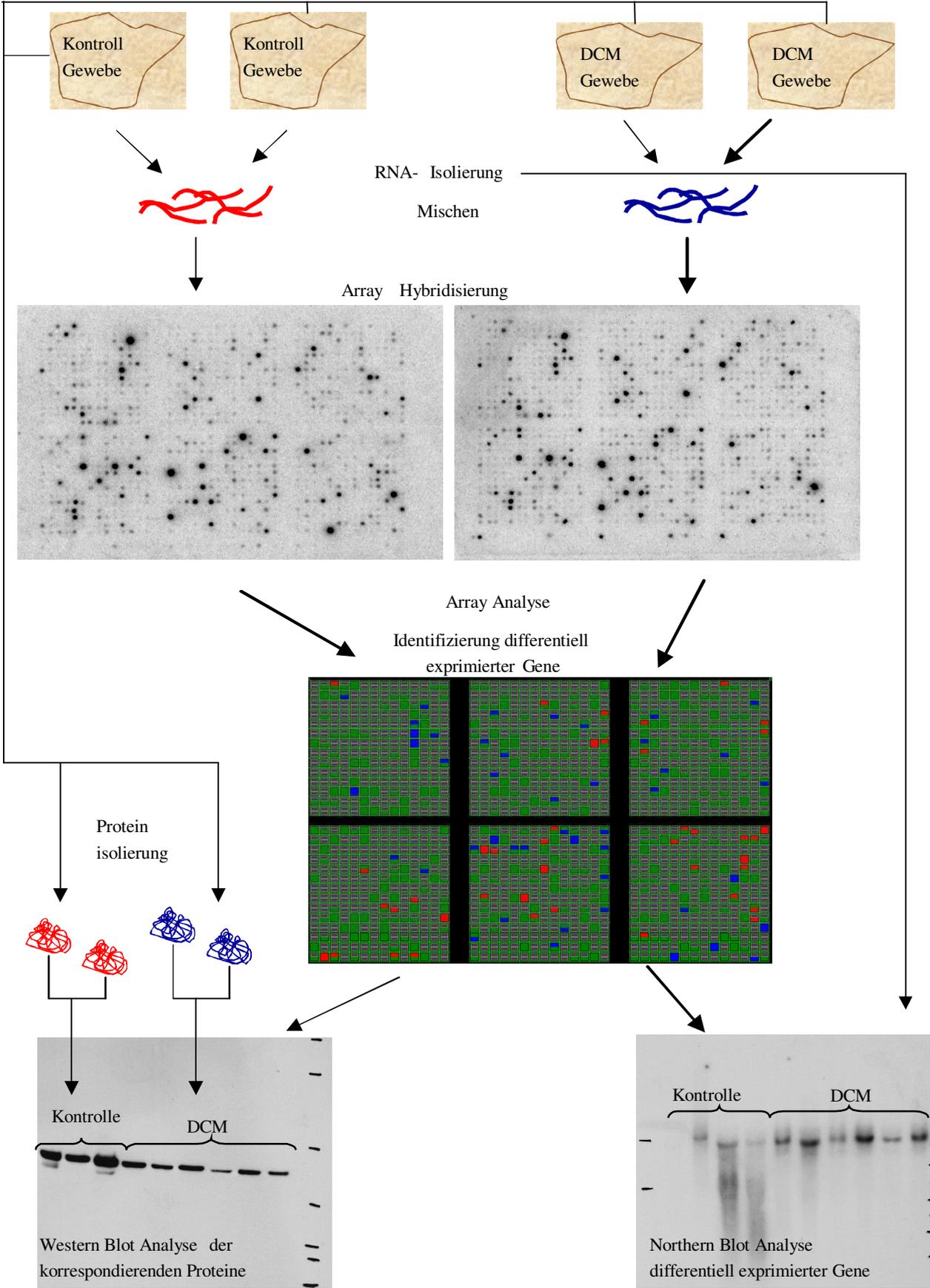
diagnostischer Marker [Hoshijima und Kenneth, 2002]. In vorangegangenen Studien konnten einige der molekularen Änderungen, die diesen Prozessen zu Grund liegen, identifiziert werden [Hoshijima und Kenneth, 2002; Schönberger und Seidman, 2001; Seidman und Seidman, 2001]. Seit kurzem erlaubt die Entwicklung der Gen Arrays die simultane Untersuchung vieler Gene [Yang et al., 2000; Barrans et al., 2001; Barrans et al., 2002]. Bisher liegen jedoch wenige Studien vor, die diese Technik nutzen, um einen breitflächigen Überblick über die Veränderungen der Genexpression in der humanen DCM im Vergleich zum gesunden Herzen zu geben [Barrans et al., 2002].

Daher sollen in dieser Arbeit humane DCM und Kontrollgewebeprobe mittels Array Analysen auf Veränderungen in der Genexpression untersucht werden. Dazu sollen zunächst die Versuchsbedingungen für die Gen Array Analyse optimiert werden, so dass eine möglichst hohe Anzahl differentiell exprimierter Gene korrekt erkannt wird. Durch einen Vergleich der so ermittelten Gene mit der Literatur kann eine erste Einschätzung bezüglich der Korrektheit der Daten gegeben werden. Es sollten zumindest einige bekanntermaßen differentiell exprimierte Gene, insbesondere sogenannte "Markergene", mit der Array-Analyse identifiziert werden.

Weiterhin sollen andere Gene, die nicht auf dem Array vertreten sind, aber auf Grund ihrer Funktion vermutlich an der Pathogenese der DCM beteiligt sind, mit Northern Blot Analysen untersucht werden. Soweit Antikörper vorhanden sind, sollen die korrespondierenden Proteine der differentiell exprimierten Gene mit Western Blot Analysen untersucht werden. Sollte die Untersuchung der mRNA Expression durch Array oder Northern Blot Analyse mit den Befunden der Proteinexpression in der Western Blot Analyse nicht übereinstimmen, sollen diese Ergebnisse mit weiteren Methoden verifiziert werden.

Dadurch sollen neue mögliche Ursachen der idiopathischen DCM identifiziert sowie neue Aspekte in den Signalwegen und Prozessen, die den Umbau steuern oder die am Übergang von der Kompensation zum Herzversagen beteiligt sind, erkannt werden. Eventuell lassen sich Gene identifizieren, denen eine mögliche therapeutische oder diagnostische Bedeutung zukommt. Abbildung 3 zeigt den Versuchsplan für diese Arbeit.

Abb. 3: Versuchsplan



III. MATERIAL UND METHODEN

1. Untersuchungsmaterial

1.1 Gewinnung der Proben

Es wurden Herzmuskel-Gewebeproben aus der freien Wand des linken Ventrikels untersucht. Die Proben von DCM Patienten wurden im Rahmen von Herztransplantationen in der Kerckhoff-Klinik gewonnen. Als Kontrolle diente ein gesundes Herz, welches auf Grund des vorzeitigen Todes des Empfängers nicht implantiert werden konnte. Nach Auskunft der behandelnden Ärzte lag die Zustimmung der Patienten vor und die Empfehlungen des Weltärztebundes zur Ethik in der Humanforschung wurden beachtet [WMA, 2000].

Alle Gewebeproben wurden unmittelbar nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Um sicher zu stellen, dass die Herzen von keiner anderen Krankheit als DCM beziehungsweise im Fall der Kontrolle von keiner Krankheit betroffen waren, wurden die Proben histologisch untersucht und die klinischen Daten der Patienten ausgewertet.

Als weitere Kontrollen wurden zusätzlich drei Gesamt-RNA Proben sowie zwei Gesamt-Protein Proben von gesunden Herzen von den Firmen Clontech und BioChain erworben.

Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die untersuchten Proben.

1.2 Auswahl der Proben

Bei der Auswahl der Proben der an DCM erkrankten Herzen wurde auf eine möglichst homogene Gruppenzusammensetzung geachtet. Individuelle Unterschiede in den Lebensgewohnheiten, der Vorgeschichte und Therapie der Erkrankung lassen sich bei menschlichen Proben nicht vermeiden. Es wurde jedoch darauf geachtet, dass alle Patienten eine DCM im fortgeschrittenen Stadium aufwiesen ($\text{EF} < 20\%$). Um alters- oder geschlechtsbedingte Unterschiede zu minimieren beziehungsweise zu vermeiden, wurden nur männliche Probanden im mittleren Lebensalter (40-61 Jahre) ausgewählt. Auf diese Weise wurde zumindest in der Gruppe der DCM-Patienten eine hohe Homogenität gewährleistet, die die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass beobachtete Varianzen in der Genexpression auf die Erkrankung zurück zu führen sind. Auf Grund des großen Mangels an gesunden Herzen musste in der Kontrollgruppe ein Kompromiss geschlossen werden, wobei auf eine einheitliche Probandenrekrutierung zu Gunsten einer größeren Gruppe verzichtet wurde. Geschlechts-, alters- und rassespezifische Schwankungen in der Genexpression wurden hier in

Kauf genommen, da diese sich im Mittel ausgleichen und keine Verwechslungsgefahr von individuellen Varianzen mit krankheitsbedingten Änderungen besteht.

Tab. 4: Patientendaten

Patient	Alter Jahre	Geschlecht	Rasse	EF %	LVEDP mm Hg	Diagnose
1	47	m	Europäer	10	30	DCM
2	40	m	Europäer	10-15	keine Daten	DCM
3	54	m	Europäer	20	67	DCM
4	46	m	Europäer	20	25	DCM
5	61	m	Europäer	15	25	DCM
6	49	m	Europäer	15	36	DCM

Kontrolle	Alter Jahre	Geschlecht	Rasse
1	27	w	Europäer
2	25	m	Asiat
3	27	m	Asiat
4	32	m	Asiat
2a	44	m	Asiat
3a	23	m	Asiat

m: männlich; w: weiblich; EF: Ejection fraction (Auswurfraction)

LVEDP: left ventricular enddiastolic pressure (linksventrikulärer enddiastolischer Druck)

Kontrolle Nr. 1: Gewebeprobe eines gesunden Herzens

Kontrolle Nr. 2: Gesamt-RNA eines gesunden Herzens, Fa. Clontech

Kontrolle Nr. 3; 4 Gesamt-RNA eines gesunden Herzens, Fa. BioChain

Kontrolle Nr. 2a Gesamt-Protein eines gesunden Herzens, Fa. Clontech

Kontrolle Nr. 3a Gesamt-Protein eines gesunden Herzens, Fa. BioChain

2. RNA-Isolierung

Es stehen verschiedene Verfahren für die RNA-Isolierung zur Verfügung. Für die Array Analysen wurde eine hochreine RNA ohne Spuren von DNA-Verunreinigungen benötigt. Diese wurde mit Hilfe des RNeasy[®] Midi Kits gewonnen. Bei diesem Verfahren wird die RNA in einer Säule an eine spezielle Matrix gebunden und dadurch von den übrigen Zellbestandteilen getrennt. Bei der Methode nach Chomczynski und Sacchi [Chomczynski und Sacchi, 1987] erfolgt die Trennung durch Zentrifugation auf Grund der unterschiedlichen Dichte der Zellbestandteile. Bei der Säulenaufreinigung ist die RNA in der Regel reiner, die Ausbeute ist bei dieser Methode allerdings geringer, so dass die RNA für die Northern Blot Analysen mit der Methode nach Chomczynski und Sacchi isoliert wurde.

2.1 RNA-Isolierung mittels RNeasy[®] Midi Kit

Von den Gewebeproben wurde für die Array Analysen Gesamt-RNA mittels des RNeasy[®] Midi Kits isoliert. Die Präparation erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Herzgewebe. Dabei wurden 100 mg gefrorenes Gewebe in 2 ml des denaturierenden Puffers RLT mit 20 µl β-Mercaptoethanolzusatz mit einem Ultra-Turrax-Homogenisator homogenisiert. Anschließend erfolgte ein Verdau der Proteine durch Zugabe von 65 µl Proteinase K für 20 min bei 55 °C. Durch Zentrifugation für 5 min bei 5000 g wurde die RNA von den restlichen Bestandteilen abgetrennt. Der Überstand wurde gewonnen, mit 1/2 Volumen Ethanol versetzt und auf eine RNA-bindende Säule aufgetragen. Eine Zentrifugation bei 5000 g für 5 min trennte die RNA von dem übrigen Puffergemisch. Nach mehreren Waschungen mit dem Waschpuffer RW1, der alle Verunreinigungen entfernt, wurde die hochreine RNA in 100 µl DEPC behandeltem Wasser eluiert. Die Konzentration, Integrität und Reinheit der RNA wurde durch Absorptionsmessung sowie durch Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung kontrolliert (siehe Abschnitt 3) und die RNA bei -80 °C aufbewahrt.

2.2 RNA-Isolierung nach Chomczynski und Sacchi

Für die Northern Blot Analyse wurde die Gesamt-RNA nach dem Protokoll von Chomczynski und Sacchi isoliert. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis ausgeführt. Es wurden ca. 200 mg gefrorenes Gewebe mit einem Ultra-Turrax-Homogenisator in 2 ml Guanidinium-Puffer homogenisiert. Nacheinander wurden 0,2 ml 2 M Natriumacetat pH 4, 2 ml Phenol und 0,4 ml Chloroform/ Isoamylalkohol (49/1) zugegeben und gemischt. Der Ansatz wurde heftig geschüttelt

und für 15 min auf Eis inkubiert. Dabei werden die Nukleinsäuren durch Natriumacetat gefällt und die Proteine durch Phenol denaturiert. Nach einer Zentrifugation bei 8000 rpm für 40 min bei 4 °C wurde der Überstand gewonnen und die RNA durch Zugabe 1 Volumens Isopropanol bei -20 °C über Nacht präzipitiert. Nach einer zweiten Zentrifugation bei 8000 rpm für 30 min bei 4 °C wurde das Pellet, welches die RNA enthält, mit 70 % eiskaltem Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation für 5 min in 300 µl Guanidiniumpuffer gelöst. Nach Überführung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde 1 Volumen Isopropanol zugegeben und erneut bei -20 °C über Nacht präzipitiert. Durch Zentrifugation bei 10.000 rpm für 30 min bei 4 °C wurde die RNA pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 % eiskaltem Ethanol dreimal gewaschen, anschließend in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet und in 50 µl DEPC behandeltem Wasser durch Inkubation bei 65 °C für 10 min gelöst. Die Reinheit, Konzentration und Integrität der RNA wurde mit den in Abschnitt 3 beschriebenen Methoden überprüft und die RNA bei -80 °C aufbewahrt.

3. Nukleinsäuren-Quantifizierung und Gelelektrophorese

3.1 Absorptionsmessung

Die Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren wurden durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm in einem Spektrophotometer bestimmt. Dabei entspricht eine Einheit bei A_{260} 40 µg/ml RNA oder 50 µg/ml DNA. Die Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$(\text{Verdünnung} \times \text{Absorption}_{260\text{nm}} \times \text{Faktor } 40 \text{ bzw. } 50) / 1000 = \text{Konzentration } \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Der Quotient Absorption [260 nm/280 nm] gibt Aufschluss über die Reinheit der Nukleinsäure. Ein Wert zwischen 1,5 und 2,0 spricht dafür, dass keine Verunreinigung durch DNA oder Proteine vorliegt.

3.2 Gelelektrophorese

3.2.1 Prinzip

Bei der Gelelektrophorese werden Nukleinsäuren in einer porenbildenden Matrix nach ihrer Größe aufgetrennt, da sie auf Grund ihrer negativen Ladung in einem elektrischen Feld zur Anode wandern. Die Strecke, die eine Nukleinsäure dabei zurücklegt, hängt von ihrer Größe und der Konzentration des Gels ab, wobei längere Fragmente eine kürzere Distanz zurücklegen. Mit Agarosegelen können Fragmente von 0,1 bis 15 kb aufgetrennt werden, wobei kleine Fragmente in Gelen mit höherer und große Fragmente in Gelen mit niedrigerer Agarosekonzentration optimal

getrennt werden. In einer Spur des Gels wird ein standardisierter Größenmarker aufgegeben, der sich in Banden von definierter Größe und Konzentration auftrennt und zum Vergleich mit der zu untersuchenden Nukleinsäure hinzugezogen wird. Die Proben werden in einem speziellen Ladungspuffer verdünnt. Dieser färbt die Lauffront, wodurch sich die Wanderung der Nukleinsäuren im Gel verfolgen lässt. Durch den Zusatz von Glycerol erhöht der Ladungspuffer die Dichte der Proben, so dass sie nicht in den Laufpuffer, der das Gel umgibt, diffundieren. In den Laufpuffer (bei RNA) oder in das Gel (bei DNA) wird Ethidiumbromid, welches in die Nukleinsäure-Stränge interkaliert, zugegeben. Dadurch können diese später durch Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden. Vor dem Auftrag wird die Nukleinsäure in Puffer durch Erhitzen in Einzelstränge gespalten. Klar abgegrenzte Banden der 18 S und 28 S rRNA im Verhältnis 1:2 zeigen, dass die Nukleinsäure intakt ist (siehe Abbildung 4).

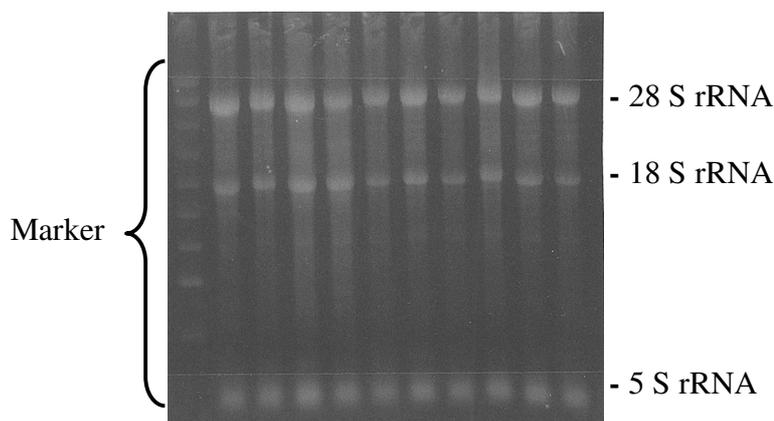


Abb. 4: Analyse der RNA-Qualität mittels Gelelektrophorese

3.2.2 RNA-Gelelektrophorese

Da RNA einen hohen Grad an Sekundärstrukturen aufweist, wird sie in denaturierenden Gelen aufgetrennt, denen Formaldehyd zugesetzt wird. Dieses zerstört die Sekundärstrukturen in der RNA. Für die Herstellung des Gels wurde 0,5 g LE-Agarose in 50 ml 1xMOPS-Puffer aufgekocht und dabei gelöst. Anschließend wurde 0,66 M Formaldehyd zugegeben und das Gel in einer Elektrophoresekammer gegossen. Die RNA wurde nach Zugabe von 10 µl denaturierendem Ladungspuffer und 1 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) für 15 min bei 65 °C erhitzt, kurz auf Eis gekühlt und auf das auspolymerisierte Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei zirka 75 V in 1x MOPS-Puffer durchgeführt. Anschließend wurde das Gel mit UV-Licht betrachtet.

3.2.3 DNA-Gelelektrophorese

Für die DNA-Gelelektrophorese wurde LE- oder GTG-Agarose durch Aufkochen in 1xTBE gelöst, 0,006 % Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben und das Gel in einer Elektrophoresekammer gegossen. Die DNA wurde mit 10 µl DNA-Ladungspuffer gemischt, durch 5-minütiges Kochen denaturiert, kurz auf Eis gekühlt und auf das auspolymerisierte Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in 1xTBE bei zirka 75 V durchgeführt und das Gel anschließend mit UV-Licht betrachtet.

4. Array Analyse

4.1 Array Hybridisierung

Gesamt-RNA, die mittels RNeasy[®] Midi Kit isoliert worden war oder von den Firmen Clontech und BioChain stammte, wurde mit Atlas[™] Human Cardiovascular Arrays und Atlas[™] Human 1.2 Arrays untersucht. Die separate Analyse jeder einzelnen RNA-Probe erwies sich als nicht zweckmäßig, da in jeder Reaktion geringfügige Schwankungen auftreten, die beim Vergleich der Filter zu Fehlern führen können und eine hohe Interassay-Varianz verursachen. Hinzu kam, dass die Filter vor einer erneuten Hybridisierung durch Kochen in 0,5 % SDS gestrippt werden müssen, wodurch die Filter augenscheinlich litten und die Gefahr bestand, dass die Filterqualität mit jedem Gebrauch abnahm. Aus diesem Grund wurde die RNA der Kontrollen sowie der DCM-Proben vor der Array Analyse gemischt. Der Vergleich gepoolter Proben bot den Vorteil, dass nur zwei Filter verglichen werden mussten, wodurch die Interassay-Schwankungen so gering wie möglich gehalten wurden. Einflüsse durch das Strippen der Filter wurden hierdurch ebenfalls umgangen und Differenzen in den einzelnen Patientenproben, wie sie zum Beispiel durch Therapie der Erkrankung entstehen können, wurden eliminiert.

Die Array Analyse wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden 4 µg der gemischten Kontroll- oder DCM-RNA und 1 µl spezifischer Primermix bei 70 °C für 2 min denaturiert und anschließend auf 50 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 2 µl Reaktionspuffer, 1 µl dNTP-Mix, 0,5 µl DTT, 3,5 µl [$\alpha^{33}\text{P}$] dATP und 1 µl MMLV Reverse Transkriptase wurde die RNA in einer RT-PCR bei 50 °C für 40 min in cDNA umgeschrieben. Durch den Einbau von [$\alpha^{33}\text{P}$] dATP wurden die entstehenden cDNA Fragmente radioaktiv markiert. Anschließend wurde die markierte cDNA mit einem Bindungspuffer gemischt und mit Säulen gereinigt. Dabei wird die cDNA an Partikel in der Säule gebunden. Durch Zentrifugation bei 14.000 rpm für 1 min wurden

ungebundene Reste der PCR-Reaktionslösung mit nicht eingebauten Nukleotiden entfernt. Nach drei Waschschriften mit Puffer NT3 wurde die markierte cDNA mit 100 μ l Puffer NE durch Zentrifugation eluiert. Anschließend wurde der radioaktive Einbau überprüft (siehe Abschnitt 5.3.3) und die Anzahl Counts pro Reaktionsgemisch ermittelt. Es wurde berechnet, wieviel μ l von jedem Ansatz verwendet werden mussten, um beide Filter mit der gleichen Anzahl Counts zu hybridisieren. Zu der markierten cDNA wurden 10 μ l Denaturierungspuffer gegeben und bei 68 °C für 20 min denaturiert. Anschließend wurden 115 μ l Neutralisierungspuffer und 5 μ l C₀t-1-DNA hinzugefügt und nochmals für 10 min bei 68 °C inkubiert. Gleichzeitig wurden die Array-Filter für 30 min in Hybridisierungsröhren mit 8 ml ExpressHyb und 120 μ l Heringssperma DNA vorhybridisiert. Die Zugabe von DNA zum cDNA-Gemisch und zum Hybridisierungspuffer reduziert unspezifische Bindungsreaktionen. Die markierte Kontroll- beziehungsweise DCM-cDNA wurde in jeweils eine Hybridisierungsröhre zu einem Filter gegeben und über Nacht bei 68 °C inkubiert. Um unspezifisch hybridisierte oder ungebundene Sonden zu entfernen, wurden die Filter bei 68 °C mit 2xSSC/0,1 % SDS und 1xSSC/0,1 % SDS mehrfach gewaschen. Dabei nutzt man das Prinzip, dass zwei DNA-Fragmente eine um so widerstandsfähigere Bindung eingehen, je spezifischer diese ist und unspezifisch gebundene DNA bei hohen Temperaturen oder geringem Salzgehalt abgewaschen wird.

4.2 Auswertung der Arrays

Nach den Waschungen wurden PhosphorImager Screens mit den Filtern exponiert. Diese wurden nach 24 h mit einem Storm 860 Scanner gescannt. Die so erhaltenen Hybridisierungsbilder waren gleichmäßig hybridisiert und frei von unspezifischem Hintergrund. Die Arrays wurden mit der AtlasTM Image Software, die die Spots lokalisiert und ihre mittlere optische Dichte ermittelt, ausgewertet. Für die Auswertung der Filter mit der AtlasTM Image Software wurden folgende Kriterien zu Grunde gelegt:

Die mittlere optische Dichte eines Gens musste mindestens das Doppelte des Hintergrundwertes betragen, um in die weitere Auswertung aufgenommen zu werden. Dadurch wurden Gene ausgeschlossen, deren Signal zu schwach für eine aussagekräftige Interpretation war.

Bei den AtlasTM Human Cardiovascular Arrays, die für jedes Gen zwei Signale aufweisen, mussten die Signalstärken der beiden Punkte eines Gens zu mindestens 80 % übereinstimmen. Durch den Vergleich zweier Spots erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass ein beobachtetes Signal auf eine spezifische Hybridisierung zurückzuführen ist.

Der Hintergrundwert eines Filters wurde von allen Signalen dieses Filters abgezogen. Abschließend wurden die korrigierten Signalwerte eines Filters auf den Median aller Signale dieses Filters normalisiert, bevor die beiden Filter (Kontrolle und DCM) miteinander verglichen wurden.

Durch diese Korrekturen wurde sichergestellt, dass Unterschiede im Hintergrund, in der Transkriptions-, Markierungs- oder Hybridisierungseffizienz keinen Einfluss auf den Vergleich von Kontrolle und DCM hatten.

Die so ermittelten relativen Signalwerte wurden verglichen und diejenigen Gene, die im Vergleich einen mindestens zweifachen Unterschied in der Expressionsstärke aufwiesen, wurden als differentiell exprimiert angesehen. In einigen Fällen war ein Signal nur in den Kontrollen oder DCM-Patienten vorhanden. Dies kann entweder auf einen großen Expressionsunterschied hinweisen oder das Gen war insgesamt schwach exprimiert und lag auf einem Filter gerade noch über, im anderen Filter unter der Nachweisgrenze. Um diesen zweiten Fall auszuschließen, wurde als weiteres Kriterium eine minimale Differenz, die zwischen den relativen Signalstärken bestehen musste, festgelegt. Diese Differenz musste mindestens den durchschnittlichen Hintergrundwert beider Filter betragen.

5. Northern Blot Analyse

Bei der Northern Blot Analyse wird die Expression eines Gens gemessen, indem RNA durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und die gesuchte mRNA mittels spezifischer, zur RNA komplementären Sonden nachgewiesen wird. Dabei nutzt man die Tatsache, dass komplementäre einzelsträngige Nukleinsäuren sich zu einem Doppelstrang zusammenlagern.

Tab. 5: Versuchsplan Northern Blot Analyse

Northern Blot Analyse
Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA, Kapitel 5.1
Kapillartransfer der RNA auf eine Membran, Kapitel 5.1
Prähybridisierung der Membran, Kapitel 5.1
Herstellung der Sonden, Kapitel 5.2
Oligonukleotidsonden (Firma MWG), Kapitel 5.2
cDNA-Sonden, Kapitel 5.2
Erzeugung und Transformation kompetenter Bakterien, Kapitel 5.2.1
Amplifikation und Plasmidpräparation, Kapitel 5.2.2
Restriktionsverdau, Kapitel 5.2.3
Insertisolierung, Kapitel 5.2.4
Radioaktive Markierung, Kapitel 5.3
Northern Hybridisierung, Kapitel 5.4
Auswertung, Kapitel 5.4

5.1 Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA und Kapillartransfer

Von jeder Probe sowie von einem Größenmarker wurden 10 µg Gesamt-RNA auf einem 1 % Agarosegel mit 66 mM Formaldehyd aufgetrennt. Die Integrität der RNA und eine gleichmäßige Ladung wurden durch eine Ethidiumbromid-Färbung bestätigt (siehe Abschnitt 3.2). Zur Entfernung des Formaldehyds wurde das Gel nacheinander in DEPC-behandeltem Wasser und 10xSSC Puffer geschwenkt. Die RNA wurde mittels Kapillarblot auf eine Nylon Membran übertragen, wobei 10xSSC als Transferpuffer diente. Dazu wurde das Gel auf eine Membran gelegt, die zuvor in DEPC-behandeltem Wasser und 10xSSC äquilibriert worden war. Unter dieser Membran befand sich ein Stapel 3MM Papier und Zellstoff, der auf einer Platte über einem Gefäß mit 10xSSC lag. Über dem Gel lag eine Brücke aus 3MM-Papier, welches in den Transferpuffer eintauchte (siehe Abbildung 5). Der Aufbau wurde mit einer Glasplatte abgedeckt und mit einem Gewicht beschwert. Der Puffer diffundiert von der 3MM-Brücke durch das Gel und die Membran in den darunterliegenden Zellstoffstapel. Die RNA wird mit dem diffundierenden Puffer bewegt und bleibt in der Nylonmembran hängen. Nach einem Transfer über Nacht wurde die Membran kurz in DEPC-Wasser geschwenkt und die Effizienz der

Übertragung mit UV-Licht, welches das Ethidiumbromid in der RNA anregt, beurteilt. Dabei wurden die Positionen der 18 S und 28 S rRNA, sowie des Größenmarkers auf der Membran markiert. Der Größenmarker wurde abgeschnitten, um Kreuzreaktionen beim Hybridisieren zu verhindern. Abschließend wurde die RNA auf der Membran mittels UV-Licht fixiert und getrocknet oder direkt in Hybridisierungspuffer prähybridisiert.

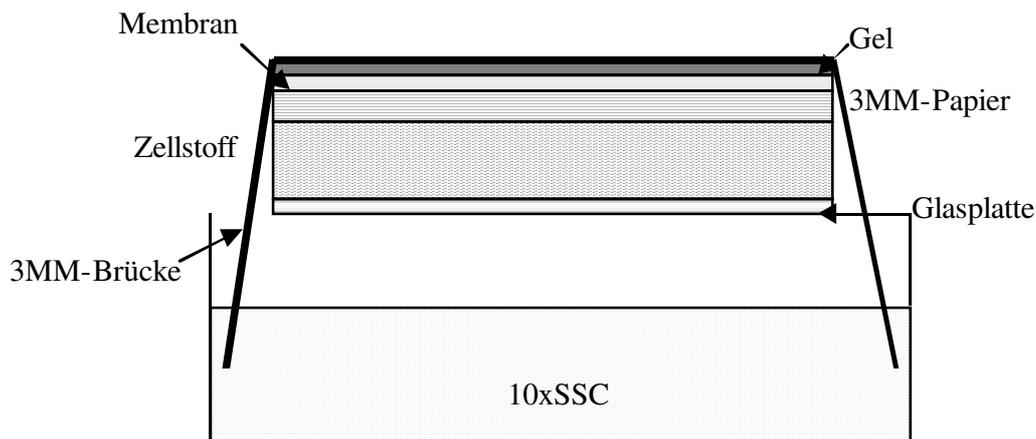


Abb. 5: Aufbau eines Kapillarblots

5.2 Herstellung der Sonden

5.2.1 Prinzip

Zum Nachweis einer speziellen RNA im Northern Blot verwendet man eine radioaktiv markierte Sonde, die komplementär zu der gesuchten RNA ist. Als Sonden dienen dabei Oligonukleotide oder cDNA-Fragmente. Oligonukleotide werden kommerziell von verschiedenen Firmen hergestellt, wodurch sie schnell zur Verfügung stehen. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgt nach dem Festphasen-Verfahren. Dabei wird das 1. Nukleotid, dessen 3' Ende blockiert ist, an eine Matrix geheftet und dann das nächste Nukleotid in das Reaktionsgefäß gegeben. Dieses Nukleotid ist am 5' Ende blockiert, so dass eine Reaktion nur zwischen der 5' Hydroxylgruppe der 1. Base mit dem 3' Phosphor der 2. Base möglich ist. Abschließend wird die Blockierung am 5'-Ende des neu gebildeten Dinukleotids abgetrennt, das nun mit dem nächsten zugegebenen Nukleotid reagieren kann. Zuletzt wird das Nukleotid von der Matrix gespalten und aufgereinigt. Dadurch, dass sie nur aus wenigen Nukleotiden bestehen, haben Oligonukleotide jedoch den Nachteil, dass sie häufig unspezifisch reagieren. In dieser Arbeit erfolgte der Nachweis der 18 S

rRNA durch Oligonukleotid-Hybridisierung. Die Spezifität dieses Oligonukleotids war zuvor getestet worden [Deindl, 2001].

cDNA-Sonden bestehen aus einigen hundert Nukleotiden und sind daher spezifischer als Oligonukleotide. Ihre Herstellung ist jedoch wesentlich aufwendiger. cDNAs werden in vitro von RNA transkribiert und sind zu dieser somit komplementär (complementary DNA). Zur Lagerung und Vervielfältigung werden diese Fragmente an definierten Restriktionsstellen in Plasmide einkloniert. Eine Übersicht über die in dieser Untersuchung verwendeten cDNAs, ihrer Plasmid-Vektoren und ihre Herkunft gibt Tabelle 6. Diese Plasmide wurden zunächst in kompetenten Bakterien amplifiziert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA wieder isoliert und das betreffende cDNA Fragment aus dem Plasmid herausgeschnitten, aufgereinigt und sequenziert. Im folgenden wird auf die einzelnen Arbeitsschritte näher eingegangen.

Tab. 6: verwendete cDNA-Klone

Name	Plasmid	Selektion/ Resistenz	flankierende Enzyme	Insert- größe	Spezies	Herkunft
GAPDH	pBlueskript	Ampicillin	<i>Pst</i> I / <i>Xba</i> I	780 bp	human	R. Wu
Desmin	pBlueskript	Ampicillin	<i>Eco</i> RI	2200 bp	human	R. Zimmermann
Zyxin	PYeS1	Ampicillin	<i>Eco</i> RI / <i>Not</i> I	1897 bp	human	S. Hehlhans
N-Cadherin	pT7T3D-Pac	Ampicillin	<i>Eco</i> RI / <i>Not</i> I	500 bp	human	RZPD, Berlin, IMAGp998C07737
CTNNA	pT7T3D-Pac	Ampicillin	<i>Eco</i> RI / <i>Not</i> I	820 bp	human	RZPD, Berlin, IMAGp998P09579
CTNNB	pT7T3D-Pac	Ampicillin	<i>Pac</i> I / <i>Eco</i> RI	1000 bp	human	RZPD, Berlin, IMAGp998I13369
Carp	pGEM-Teasy	Ampicillin	<i>Rsa</i> I / <i>Eco</i> RI	340 bp	Kaninchen	K.Böngler
Cofilin 2	pGEM-Teasy	Ampicillin	<i>Rsa</i> I / <i>Eco</i> RI	800 bp	Kaninchen	K.Böngler

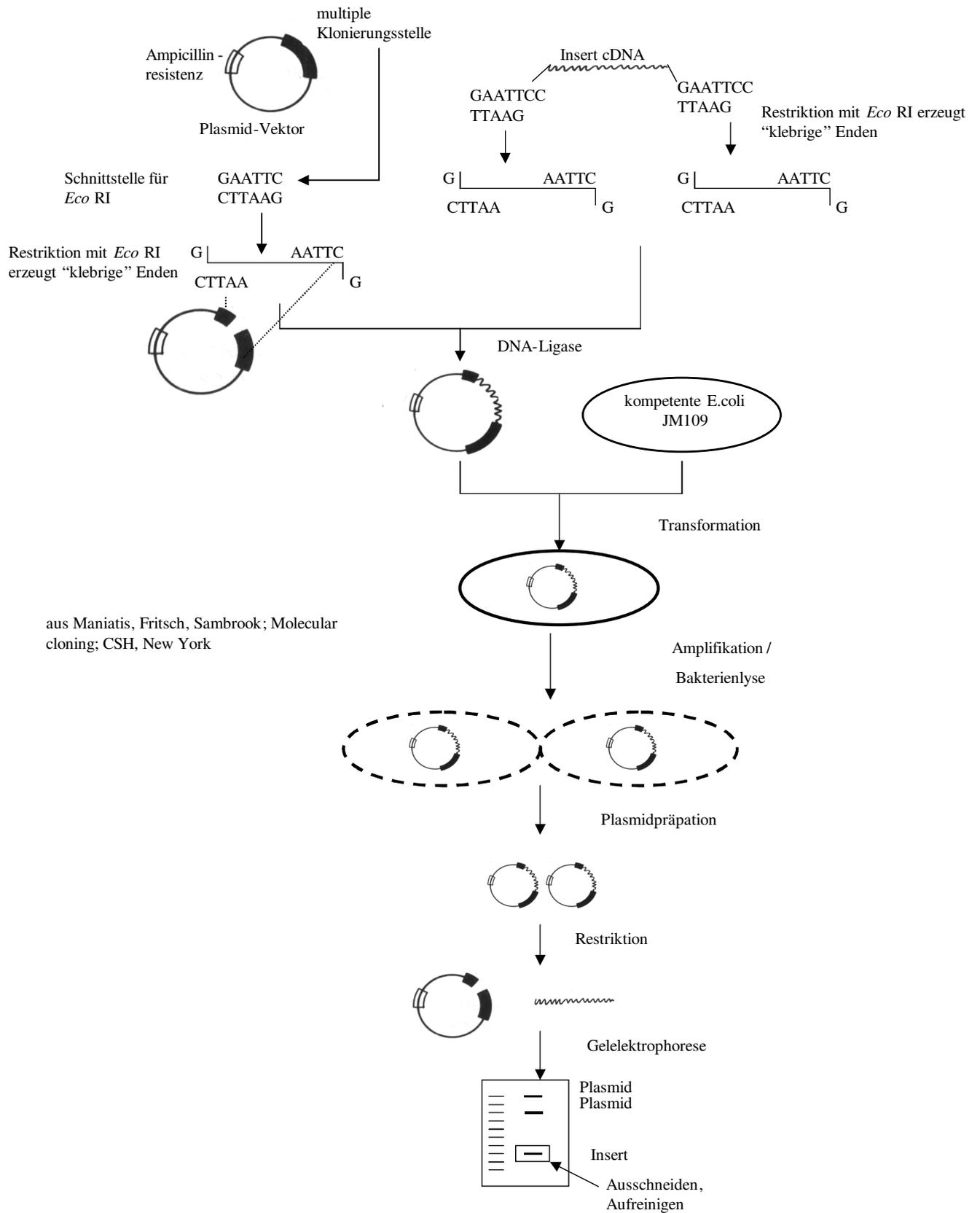


Abb. 6: Überblick über die Klonierung, Amplifikation und Aufreinigung von cDNA

5.2.2 Erzeugung und Transformation kompetenter Bakterien

Zur Vermehrung der Plasmide mussten diese zunächst in kompetente Bakterien eingeschleust werden. Unter Kompetenz versteht man dabei die Fähigkeit eines Bakteriums, fremde DNA aufzunehmen. Die Erzeugung der kompetenten Bakterien erfolgte durch die Kalziumchlorid-Methode. Dazu wurden *E. coli*, Stamm JM109, auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde eine Bakterienkolonie in LB-Medium transferiert, gefolgt von einer weiteren Inkubation über Nacht bei 37 °C und 250 rpm in einem Bakterenschüttler. Die Kultur wurde dann 1:50 in LB-Medium verdünnt und bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase wachsen gelassen. Durch Messen der optischen Dichte bei 550 nm lässt sich dieser Zeitpunkt, der bei einer OD_{550nm} von 0,4 - 0,5 liegt, ermitteln. Anschließend wurde die Kultur durch Schütteln in einem Eiswasserbad für 10 min auf 4 °C abgekühlt, bei 4 °C und 2500 g zentrifugiert und das gewonnene Bakterienpellet in 250 ml eiskalter 0,1 M Kalziumchloridlösung resuspendiert. Nach einer Inkubation auf Eis für 30 min wurde erneut zentrifugiert und 20 ml 0,1 M Kalziumchloridlösung zu dem entstandenen Pellet gegeben. Die Bakterien wurden dann mit 3 ml 86 % sterilem Glycerol gemischt, zur Steigerung der Kompetenz über Nacht bei 4 °C inkubiert und abschließend in 1 ml Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation wurden die kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut. Zu 100 µl Bakterien wurden 0,5 µl Plasmid-DNA zugegeben, heftig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeschockbehandlung im Wasserbad bei 42 °C für 45-60 sec. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Bakterien für 1 h bei 37 °C inkubiert. Um transformierte Bakterien selektieren zu können, enthalten die Plasmide eine genetische Information, die es ermöglicht transformierte Bakterien von solchen ohne Plasmid zu unterscheiden. Die hier verwendeten Plasmide vermitteln eine Resistenz gegen Ampicillin. Diese Resistenz wird während der einstündigen Inkubation ausgebildet. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert, in 100 µl LB-Medium aufgenommen, auf einer ampicillinhaltigen LB-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nur Bakterien, die ein Plasmid aufgenommen haben, sind Ampicillin resistent und können Kolonien ausbilden.

5.2.3 Amplifikation und Plasmidpräparation

Von ampicillinhaltigen Platten wurde eine transformierte Bakterienkolonie gepickt und über Nacht in 3 ml (Minikultur) oder 100 ml (Midikultur) LB-Medium mit Ampicillin bei 37 °C und 250 rpm im Bakterienrüttler amplifiziert. Alternativ konnte die Midikultur durch Animpfen von 100 ml LB-Medium mit 10 µl Minikultur und anschließender Inkubation erzeugt werden.

Ein Teil der Bakterienkultur wurde zur Präparation des Plasmids beziehungsweise Inserts verwendet, ein weiterer Teil als Vorrat bei –80 °C gelagert. Dazu wurden 850 µl Kultur mit 150 µl 86 % sterilem Glycerol gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei –80 °C aufbewahrt.

Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde mittels des Wizard[®] Plus Mini/Midi Prep Purification Systems nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden die Bakterien durch Zentrifugation für 10 min (Midi) beziehungsweise 2 min (Mini) bei 4 °C und 10.000 g pelletiert. Nacheinander wurden 3 ml beziehungsweise 200 µl Resuspensionspuffer, die gleiche Menge Lysis-Puffer und Neutralisationspuffer zugegeben und jedesmal gemischt. Dabei werden die Bakterien lysiert, und ihre Nukleinsäuren gefällt und die Proteine denaturiert. Auf Grund ihrer besonderen, mehrfach gewundenen (supercoiled) Struktur wird die Plasmid-DNA nicht zerstört und dadurch von der Bakterien DNA getrennt. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 14.000 g für 15 min (Midi) beziehungsweise 10.000 g für 5 min (Mini) wurde der plasmidhaltige Überstand mit DNA Purification Resin gemischt und auf eine Säule, die an eine Vakuum-Vorrichtung angeschlossen war, aufgetragen. Durch Anlegen des Vakuums wurde das DNA/Resin Gemisch durch die Säule gezogen, wobei die DNA in der Säule gebunden wurde. Nach einer Waschung erfolgte die Elution der DNA mit 300 µl (Midi) beziehungsweise 30 µl (Mini) 50 °C warmem sterilem Wasser durch Zentrifugation für 5 min (Midi) beziehungsweise 20 sec (Mini) bei 10.000 g.

Die mittels Miniprep isolierte DNA wurde sequenziert und einer Proberestriktion (siehe 5.2.4) unterzogen, um sicherzustellen, dass die korrekte Sequenz kloniert, amplifiziert und isoliert worden war. Die Sequenzierung erfolgte mit dem AutoRead[™] Sequencing Kit nach der Methode nach Sanger [Sanger et al., 1977] unter Verwendung eines A.L.F. DNA Sequencers. Dabei wird der zu sequenzierende Ansatz in vier Aliquots geteilt, denen jeweils DNA-Polymerase, uni und rev Primer, ein Gemisch aus den Desoxynukleosidtriphosphaten aller Basen (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), sowie in geringer Konzentration Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP) jeweils einer Base zugegeben werden. Von den Primern ausgehend, synthetisiert die Polymerase neue DNA-

Stränge aus den dNTPs. Baut sie dabei ein ddNTP ein, kommt es zum Abbruch der Reaktion, da den ddNTPs die 3'OH-Gruppe, die für die Ligation einer weiteren Base benötigt wird, fehlt. Es entsteht dadurch ein Gemisch aus DNA-Strängen, die an beliebigen Stellen der ursprünglichen Sequenz mit jeweils einer Base enden. Diese Enden werden für jede Base unterschiedlich fluoreszenzmarkiert und gelelektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Dabei wird ein Polyacrylamidgel verwendet, das selbst DNA-Stränge mit 1 Base Größenunterschied trennt. Ein Detektor identifiziert auf Grund der Markierung die jeweils letzte Base einer Kette. Da statistisch gesehen die Strangsynthese mindestens einmal an jeder Base der Sequenz endete, wird so die Basenabfolge der DNA identifiziert. Durch Vergleich mit der Datenbank NCBI wurde die Sequenz auf ihre Korrektheit überprüft.

Wenn die gesuchte Sequenz kloniert und amplifiziert worden war, wurde anschließend aus einer Midikultur cDNA als Sonde für die Northern Hybridisierung gewonnen.

5.2.4 Restriktionsverdau

Bei dem Restriktionsverdau wurde das zu isolierende cDNA-Fragment mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen aus dem Plasmid herausgeschnitten. Diese schneiden DNA an spezifischen Sequenzen 5' und 3' des zu isolierenden Inserts. Für Proberestriktionen wurden 1 µl Plasmid mit je 1 µl Enzym (siehe Tabelle 6, Abschnitt 5.2.1) und 1 µl eines enzymespezifischen Puffers in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl DNA-Ladungspuffer wurde der Ansatz durch Kochen denaturiert und auf einem 1 % Agarosegel mit 3 µl Ethdiumbromid (10 mg/ml) Zusatz aufgetrennt. Die Größe und Konzentration des Inserts wurde mit einem mitgelaufenen Größenmarker verglichen.

Für die Sondenherstellung wurden 30 µg Plasmid-DNA mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (siehe Tabelle 6, Abschnitt 5.2.1) und 15 µl eines spezifischen Puffers in einem Gesamtvolumen von 150 µl über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die eingesetzten Enzymeinheiten ergeben sich dabei aus der Relation der Schnittstellen des Enzyms in Lambda-DNA und der zu schneidenden DNA nach der Formel:

$$48,5 / (\text{Länge Klon} \times \text{Schnittstelle } \lambda) = U / \mu\text{l}.$$

Dabei ergibt sich die Klonlänge in kb aus der Summe der Plasmidgröße plus Insert. Die Häufigkeit, mit der ein Enzym in λ-Phagen-DNA schneidet, ist für jedes Enzym bekannt und wird in der Herstellerangabe genannt. Das Gemisch aus linearisiertem Plasmid und cDNA wurde dann elektrophoretisch aufgetrennt und das Insert isoliert.

5.2.5 Insertisolierung mit UltraClean™ DNA Purification Kit

Der Restriktionsansatz wurde mit 30 µl DNA-Ladepuffer gemischt, durch Kochen für 5 min denaturiert und auf ein Agarosegel aufgetragen. Zur Herstellung des Gels wurde Seakem GTG-Agarose durch Aufkochen in 1xTBE gelöst und nach Zugabe von 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) in einer Elektrophoresekammer gegossen. Die Konzentration des Gels richtete sich nach der Größe des zu eluierenden Fragments. Zum Vergleich mit der Probe wurde ein DNA-Größenmarker auf einer Spur des Gels aufgetragen (siehe Abschnitt 3.2). Die Elektrophorese erfolgte bei zirka 75 V in TBE-Puffer. Das Plasmid erzeugt dabei mehrere Banden, da es Multimere bildet und zum Teil in einer "supercoiled" Form vorliegt. Das zu isolierende Fragment konnte durch Vergleich mit dem Größenmarker auf einem UV-Transilluminator identifiziert und seine Konzentration geschätzt werden. Die betreffende Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem UltraClean™ DNA Purification Kit aufgereinigt. Dabei wurde das Gelstück zunächst in einem speziellen Puffer, der Natriumjodid und TBE-Modifizierer im Verhältnis 4,5 zu 0,5 enthält, im Wasserbad bei 55 °C geschmolzen. Anschließend wurden 7 µl einer Glasmilch-Silica-Matrix, die die DNA bindet, zugegeben und die Mischung invertiert. Nach Zentrifugation für 5 sec bei 14.000 rpm wurde das entstandene Pellet zweimal gewaschen und die DNA durch Zugabe von 20 µl Wasser bei 55° C im Wasserbad eluiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der DNA-haltige Überstand abgenommen und seine Konzentration und Reinheit mit den in Abschnitt 3 beschriebenen Methoden bestimmt.

5.3 Radioaktive Markierung

5.3.1 Radioaktive Markierung von cDNA

Die cDNA-Sonden wurden unter Verwendung des rediprime II™ RandomPrime labeling Kits radioaktiv markiert. Dabei wurden 50 ng doppelsträngige DNA in einem Volumen von 46 µl durch Kochen für 5 min denaturiert, d.h. in ihre Einzelstränge aufgespalten, kurz auf Eis gekühlt und zu dem Reaktionsgemisch des RandomPrime labeling Kits gegeben. Dieses enthält das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I, verschiedene Hexanukleotide mit zufälligen (random) Sequenzen, sowie die Deoxynukleotide dATP, dTTP und dGTP. Es wurden 4 µl [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP hinzugegeben und der Ansatz für mindestens 15 min bei 37 °C inkubiert. Dabei lagern sich die Hexanukleotide, an verschiedenen Stellen der einzelsträngigen zu markierenden cDNA an. Ausgehend von diesen Primern synthetisiert die Polymerase aus den Deoxynukleotiden einen komplementären Strang, der durch den Einbau von [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP radioaktiv markiert wird (siehe

Abbildung 7). Der radioaktive Einbau wurde mit der in 5.3.3 beschriebenen Methode überprüft. Nach einer Denaturierung durch 5 minütiges Aufkochen wurde die Sonde auf die zu hybridisierenden Filter gegeben, wobei mindestens 1 Millionen cpm pro ml Hybridisierungslösung verwendet wurden.

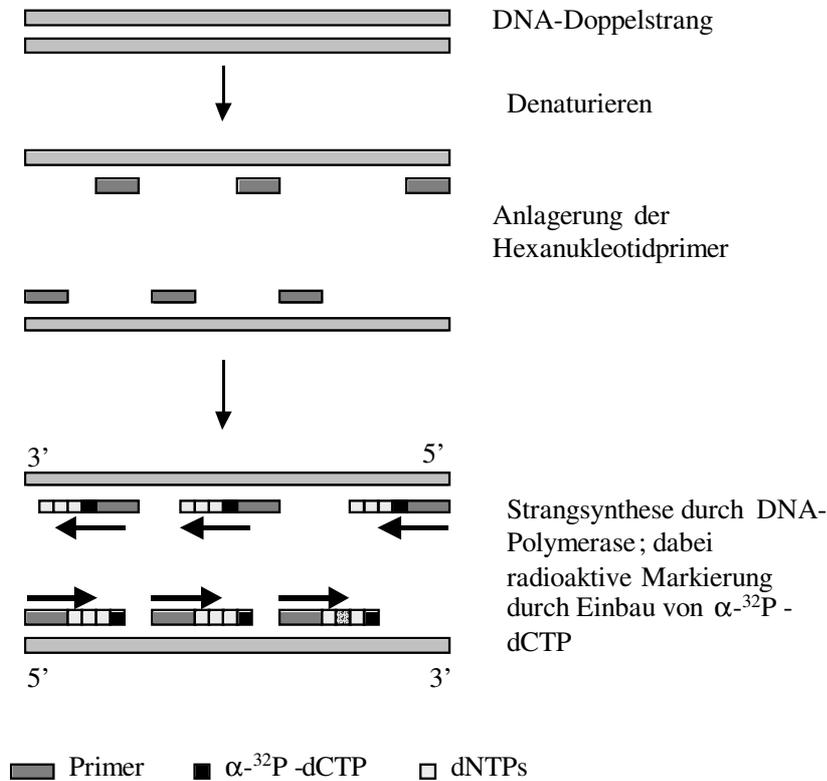


Abb. 7: Prinzip der radioaktiven Markierung mit dem random prime labeling Verfahren

5.3.2 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Für die radioaktive Markierung der Sonden wurden 10 pmol Oligonukleotid mit 18 μl sterilem Wasser gemischt und für 5 min aufgekocht. Nach einer Abkühlung auf Eis wurden 2 μl (20 Units) T4-Polynukleotidkinase (PNK), 3 μl PNK-Puffer, sowie 6 μl [γ ^{32}P] ATP zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Dabei wird durch die PNK der radioaktive Phosphor von ATP nach folgendem Schema an das 5' Ende der Oligonukleotide transferiert:



Abb. 8: Radioaktive Markierung durch die T4-Polynukleotidkinase

Anschließend wurde der radioaktive Einbau überprüft (siehe 5.3.3) und die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA oder Erhitzen auf 65 °C für 5 min gestoppt. Für die Hybridisierung mit dem 18 S rRNA-Oligonukleotid wurden mindestens 1 Millionen cpm für jeden Filter verwendet.

5.3.3 Einbaukontrolle

Zur Überprüfung des radioaktiven Einbaus wurde 1 µl markierte cDNA auf das obere Ende eines Streifens Chromatographiepapiers aufgetragen und unter einer Rotlichtlampe getrocknet. In einer Chromatographiekammer wurde der Streifen mit dem oberen Ende in eine Pufferwanne mit 0,5 M Kaliumdihydrogenphosphat gehängt. Dieses diffundiert nun durch den Streifen und transportiert dabei die cDNA, wobei die kleinen nicht eingebauten Nukleotide schneller wandern als die markierte cDNA. Der obere und untere Abschnitt des Filterstreifens werden getrennt, getrocknet und die jeweiligen Zerfälle pro Minute (counts per minute, cpm) in einem Liquid Scintillation Analyzer bestimmt. Das Verhältnis der Werte:

$$(\text{Oberer Abschnitt/unterer Abschnitt}) \cdot 100$$

ergibt die prozentuale Einbaurrate, die über 30 % liegen sollte. Der Gesamtwert multipliziert mit der Ausgangsmenge an markiertem Reaktionsgemisch zeigt, wieviel Counts insgesamt erzeugt wurden.

5.4 Northern Hybridisierung

5.4.1 Hybridisierung

Die Membranen wurden mit einem Hybridisierungspuffer bei 42 °C für 2 h vorinkubiert. Nach einer Inkubation mit der markierten cDNA-Sonde über Nacht bei 42 °C wurde die Membran mit 2xSSC/0.1 % SDS und 1xSSC/0.1 % SDS Puffer bei verschiedenen Temperaturen zwischen Raumtemperatur und 50 °C gewaschen, bis ein optimales, spezifisches Signal, ohne Hintergrund und unspezifische Hybridisierungen erzielt wurde. Das Signal wurde durch die Exponierung der Membran auf einem PhosphorImager Screen oder einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

Nach der Auswertung wurden die Membranen gestrippt, das heißt die Sonden wurden durch Waschen in 0,1 % SDS-Lösung bei 90 °C abgewaschen. Die Effizienz dieses Schritts wurde durch Exposition eines PhosphorImager Screens überprüft und die Membran entweder bei -20 °C gelagert oder erneut hybridisiert.

Abschließend wurden alle Membranen nach 30-minütiger Prähybridisierung mit einem 20mer 18S-Oligonukleotid in ExpressHyb für 2 h bei 42 °C hybridisiert. Anschließend wurden die Membranen gewaschen und mit einem Röntgenfilm inkubiert.

5.4.2 Auswertung der Northern Blots

Durch die Inkubation des Filters mit einem PhosphorImager Screen oder Röntgenfilm wurde dieser in den Bereichen, in denen radioaktive Bindungen bestehen, angeregt. Durch Einscannen an einem Storm 860 Imager konnte das Hybridisierungssignal dargestellt werden. Dieses wurde mit der ImageQuant Software, die die mittlere optische Dichte der Signale ermittelt, ausgewertet. Um Unterschiede in der Markierungs-, Hybridisierungs- und Wascheffizienz sowie der Ladung und Transfereffizienz zu egalisieren, wurden die Signalwerte um den Hintergrundwert korrigiert und mittels Division durch den Wert der 18 S rRNA normalisiert. Die ribosomale RNA (5 S, 18 S und 28 S) macht über 90 % der gesamten RNA einer Zelle aus und wird auf einem konstanten Level exprimiert, weswegen sie häufig als interne Kontrolle verwendet wird [Deindl, 2001]. Diese Werte von Kontrollen und DCM wurden verglichen und mit dem Students t-test der SigmaStat Software ausgewertet, wobei eine statistische Signifikanz bei $p < 0,05$ festgesetzt wurde. Die Daten wurden als \pm SEM graphisch dargestellt, wobei der Mittelwert der Kontrollen gleich 100 % gesetzt wurde. Alle Experimente wurden mindestens zweifach durchgeführt.

6. Western Blot Analyse

Bei der Western Blot Analyse wird die Quantität eines Proteins untersucht, indem man ein Proteingemisch nach seiner Größe gelelektrophoretisch auftrennt, die Proteine auf eine Membran überträgt und dort mittels eines spezifischen Antikörpers gegen das zu untersuchende Protein nachweist. Durch die Verwendung eines markierten Sekundärantikörpers, der an den ersten Antikörper bindet, lässt sich das Signal verstärken.

Als Primärantikörper kommen mono- oder polyklonale Antikörper (AKs) zum Einsatz. Polyklonale AKs reagieren mit mehreren Determinanten des Antigens, so dass sie eine höhere Sensitivität aufweisen als monoklonale AKs, die nur gegen ein Epitop des Antigens gerichtet sind. Dies bedingt jedoch auch, dass polyklonale AKs eine geringere Spezifität aufweisen und eventuell Kreuzreaktionen auftreten können. Es wurden nur polyklonale AKs, die keine Kreuzreaktionen zeigten, oder monoklonale AKs verwendet.

6.1 Protein-Isolierung und Konzentrationsbestimmung

Das Gesamt-Protein wurde aus den Ventrikelproben mittels Ripa-Puffer mit Proteinase-Inhibitor-Zusatz (0,57 mM PMSF) isoliert. Die gefrorenen Gewebeproben wurden in 1 ml dieses Puffers mit Hilfe eines Ultraschall-Sonikators homogenisiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C für 2 min, bei der die gelösten Proteine vom Zelldetritus abgetrennt werden, wurde der proteinhaltige Überstand abgenommen. Die Proteinkonzentration wurde mittels Biorad DC protein assay bestimmt, der analog der von Lowry beschriebenen Methode funktioniert [Lowry et al., 1951]. Es wurde je 1 µl der Probe 1:5 mit Ripa-Puffer verdünnt und mit Reagenz A des Kits gemischt. Dabei bildet das Protein in alkalischem Milieu Komplexe mit Kupfer. Nach Zugabe des Folin-haltigen Reagenz B, wird Folin durch aromatische Aminosäuren des Protein-Kupfer-Komplexes reduziert. Dabei entwickelt sich eine blaue Farbe. Parallel wurde eine BSA-Standardverdünnungsreihe, die bovines Serumalbumin in definierten Verdünnungen aufweist, angefärbt. Die Intensität der Blaufärbung wurde in einem Photometer bei 690 nm gemessen. Die Proteinkonzentration der Herzproteinproben wurde durch Vergleich mit der Absorption der BSA-Standardverdünnungsreihe ermittelt.

6.2 Western Blot

6.2.1 Prinzip der SDS-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Gelelektrophorese werden Proteine in einer porenbildenen Matrix auf Grund ihrer Größe aufgetrennt. Da die Auftrennung nativer Proteine zusätzlich durch deren Struktur und Ladung beeinflusst wird, wurden diese zuvor durch Aufkochen in einem β -Mercaptoethanol- und SDS-haltigen Laemmli-Puffer denaturiert und reduziert. Dabei bilden sie mit dem SDS einen negativ geladenen Komplex dessen Gesamtladung proportional zur Molekülmasse des Proteins ist und der die Eigenladung der Proteine überdeckt. Im elektrischen Feld wandern die Proteine dadurch zur Anode, wobei sie sich in den Gelporen linear auftrennen, da sich die kleineren Proteine schneller bewegen. Der Laemmli-Puffer enthält zusätzlich Glycerol, das eine Diffusion der Proteine in den Laufpuffer verhindert, sowie einen Farbstoff, der es ermöglicht den Lauf des Gels zu verfolgen. In einer Spur des Gels wird ein standardisierter Größenmarker aufgegeben, der sich aus Proteinen definierter Molekülgröße zusammensetzt. Durch Vergleich mit dem Marker kann später die Größe eines detektierten Proteins ermittelt werden.

6.2.2 Elektrophorese und Transfer

Von jeder Probe wurden 50 µg Gesamt-Protein nach Zugabe von Laemmli-Puffer durch 5-minütiges Kochen denaturiert und auf 4-12 % Bis-Tris NuPage[®] SDS-Gele aufgetragen. Auf einer Spur wurde ein standardisierter Größenmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in einer vertikalen Elektrophoresekammer unter Verwendung von MES-SDS-Laufpuffer, dem in der inneren Kammer 0,1 % NuPage[®] Antioxidant zugesetzt wurde. Die Auftrennung erfolgte bei 200 V für 50 min.

Anschließend wurden die Proteine per Nassblot durch elektrophoretischen Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde in einer Transferkammer eine Membran, die zuvor in Transferpuffer äquilibriert worden war, auf das Gel gelegt. Gel und Membran wurden nach beiden Seiten mit in Transferpuffer getränkten Schwämmen abgedeckt und die Transferkammer in die Elektrophoresekammer eingespannt (siehe Abbildung 9). Die Transferkammer wurde mit Transferpuffer gefüllt, die äußere Kammer mit sterilem Wasser. Der Transfer wurde durch Anlegen eines Gleichstroms für 1 h bei 30 V durchgeführt.

Anschließend wurden die Membranen für 1 min mit Ponceau S gefärbt, um den Erfolg des Tranfers und die gleichmäßige Ladung zu überprüfen. Nach Abwaschen des überschüssigen Ponceau S stellen sich die Proteine als rotgefärbte Banden auf der Membran dar (siehe Abbildung 10). Durch Waschen mit TBS-T Puffer wurde diese wieder entfärbt, nachdem sie zuvor eingescannt und die Positionen des Größenmarkers markiert worden waren.

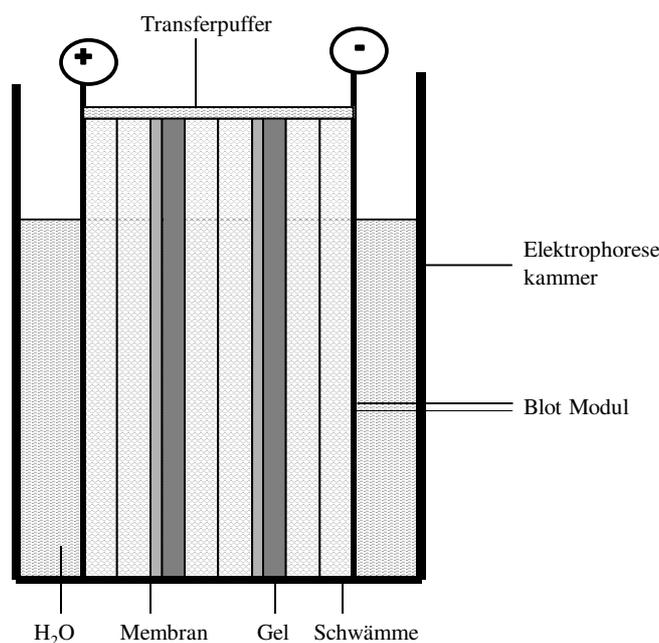


Abb. 9: Elektrophoretischer Transfer der Proteine im Nassblot

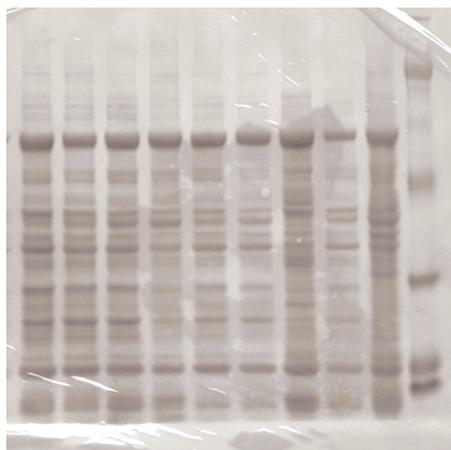


Abb. 10: Beispiel eines Ponceau S gefärbten Western Blots

6.2.3 Immunologische Detektion der Proteine

Nach einer Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur mit 5 % Milch-TBS-T Puffer, der unspezifische Bindungsstellen auf der Membran blockiert, wurde diese über Nacht bei 4 °C mit dem ersten Antikörper in 5 % Milch-TBS-T Puffer inkubiert. Die Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die verwendeten Antikörper. Die Membran wurde anschließend 10 mal für jeweils 3 min mit TBS-T Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Tabelle 8) bei Raumtemperatur. Die Membran wurde wieder 10 mal mit TBS-T Puffer gewaschen und das Signal mit einem Chemilumineszenzsystem (ECL) detektiert. Dabei wird das Substrat (Luminol) in Gegenwart von H_2O_2 durch die Peroxidase, die an den Sekundärantikörper gekoppelt ist, katalytisch oxidiert, wodurch eine Chemilumineszenz bei einer Wellenlänge von 428 nm entsteht (siehe Abbildung 11). Diese kann durch blaulicht-sensitive Röntgenfilme (ECL-Filme) sichtbar gemacht werden. Durch Vergleich mit einem Marker kann die Größe des detektierten Proteins nachgewiesen werden.

Die Membranen wurden abschließend bei 50 °C für 30 min mit Strippuffer gewaschen, wodurch die Antikörper abgewaschen wurden. Anschließend erfolgte nach erneutem Blocken eine Inkubation des Filters mit einem Antikörper gegen das Haushaltsgen GAPDH.

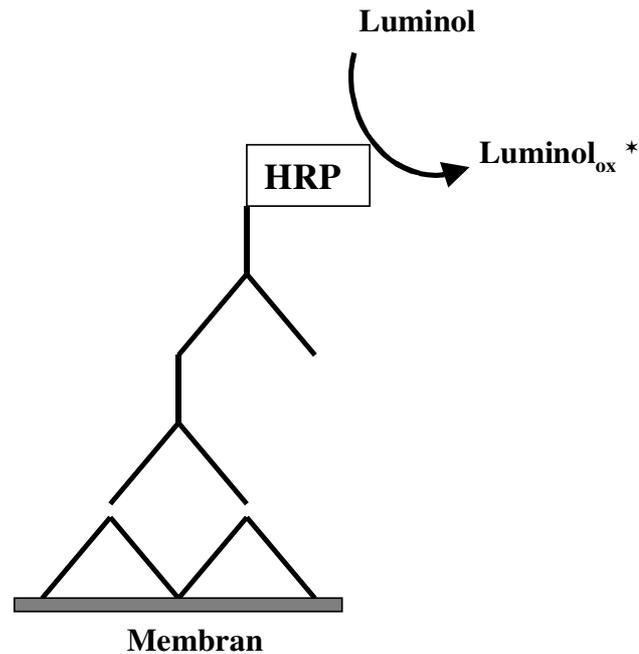


Abb. 11: Chemilumineszens-Detektion von Proteinen im Western Blot. HRP: Meerrettich-Peroxidase

Tab. 7: Primärantikörper

Immunogen	Wirt	Antikörper	Verdünnung	Firma
Kaninchen GAPDH	Maus	monoklonal	1: 3000	HyTest
humanes Integrin β 1	Maus	monoklonal	1: 2500	BD Transduction Laboratories
humanes Plakoglobin	Maus	monoklonal	1: 2000	BD Transduction Laboratories
humanes Annexin I	Maus	monoklonal	1: 5000	BD Transduction Laboratories
humanes Id3	Maus	monoklonal	1:100	BD Pharmingen
humanes N-Cadherin	Maus	monoklonal	1:2500	BD Transduction Laboratories
humanes A-CAM	Maus	monoklonal	1:500	Sigma
humanes Pan-Cadherin	Maus	monoklonal	1:1000	Sigma
humanes α -Catenin	Maus	monoklonal	1:250	BD Transduction Laboratories
humanes β -Catenin	Maus	monoklonal	1:500	BD Transduction Laboratories
humanes Cofilin 2	Maus	monoklonal	1: 500	BD Transduction Laboratories
murines Carp	Kaninchen	polyklonal	1: 500	P. Caroni, Basel

Tab. 8: Sekundärantikörper

Immunogen	Wirt	Kopplung	Verdünnung	Firma
Kaninchen IgG	Esel	Meerrettich-Peroxidase	1: 10000	Amersham
Mause IgG	Kaninchen	Meerrettich-Peroxidase	1: 10000	Dako

6.2.4 Auswertung der Western Blots

Die Signalintensität wurde durch Einscannen der ECL-Filme mit dem PhosphorImager Storm 860 und Messung der mittleren optischen Dichte mit der ImageQuant Software ermittelt. Die Werte wurden um den Hintergrundwert korrigiert und auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert. Dadurch können Unterschiede in der Ladungsmenge und der Transfereffizienz ausgeglichen werden. Die Eignung von GAPDH als interne Kontrolle war zuvor nachgewiesen worden. Anschließend wurden die Signalstärken der Kontrollen mit denen der DCM Proben verglichen. Diese Werte wurden mit dem Students t-test der SigmaStat Software ausgewertet, wobei eine statistische Signifikanz bei $p < 0,05$ festgesetzt wurde. Die Daten wurden graphisch als \pm SEM dargestellt, wobei der Mittelwert der Kontrollen gleich 100 % gesetzt wurde. Alle Experimente wurden mindestens zweifach durchgeführt.

7. Immunhistochemie und Konfokalanalyse

Bei der immunhistochemischen Untersuchung wird ein Protein durch einen spezifischen Antikörper oder einen Proteinbindungspartner nachgewiesen und in situ in einem Gewebeschnitt dargestellt. Die Detektion erfolgt dabei entweder direkt durch Markierung des ersten Reaktionspartners oder in zwei Schritten, wobei erst der sekundäre Antikörper fluoreszenzmarkiert ist. Durch die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe können mehrere Proteine in einem Schnitt dargestellt werden.

7.1 Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie wurden 12 μ m dicke, serielle Gefrierschnitte aus tiefgefrorenen mit Tissue-Tek behandelten Gewebeproben angefertigt, die auf Silikon-beschichtete Objektträger aufgezogen wurden. Die Schnitte wurden in 4 % Paraformaldehyd für 10 min fixiert, anschließend 2 mal für 3 min in 1xPBS gewaschen, für 10 min in 0,1 % BSA geblockt und in einer feuchten Kammer mit 30 μ l des verdünnten Primärantikörpers gegen N-Cadherin für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit 1xPBS wurden 30 μ l des verdünnten Cy-2 markierten Sekundärantikörpers aufgegeben, erneut für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und gewaschen.

Für die morphologische Untersuchung des Gewebes erfolgte anschließend eine Inkubation mit einem α -Aktinin-Primärantikörper und einem TRITC (Tetramethylrhodamin Isothiocyanat)

markierten Sekundärantikörper. Abschließend wurden die Kerne für 20 min mit dem Fluoreszenzfarbstoff TOTO 3, der spezifisch an die DNA der Zellkerne bindet, gefärbt.

Für die quantitative Immunokonfokalanalyse erfolgte nach der N-Cadherin Detektion eine Anfärbung von F-Aktin durch Inkubation der Schnitte mit 50 µl verdünntem TRITC-markiertem Phalloidin, welches spezifisch F-Aktin bindet.

Zur Konservierung und Untersuchung wurden die Schnitte mit Mowiol und Deckgläsern abgedeckt. Als Negativkontrolle wurden Schnitte mit PBS an Stelle des Primärantikörpers inkubiert. Alle Schnitte wurden gleichzeitig mit identischen Aliquots der verdünnten Antikörper und anderer Reagentien gefärbt, um die Variabilität zwischen den Präparaten so gering wie möglich zu halten. Die morphologische Untersuchung der Schnitte erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop.

Tab. 9: Reagentien für die Immunodetektion

Antikörper/ Reagenz	Wirt	Eigenschaft	Verdünnung	Firma
humanes N-Cadherin	Maus	monoklonal	1:200	Sigma
anti-Maus IgG	Esel	Cy-2 konjugiert; grün	1:250	Rockland
humanes α -actinin	Maus	monoklonal	1:200	Sigma
anti-Maus IgG	Ziege	TRITC konjugiert; rot	1:250	Jackson ImmunoResearch
Phalloidin-TRITC	—	rot	1:500	Sigma
TOTO 3	—	blau	1:1000	Molecular Probes

7.2 Konfokale Lasermikroskopie

Die quantitative Auswertung der Immunsignale wurde mit einem konfokalen Lasermikroskop mit Argon/Krypton und Helium/Neon Lasern durchgeführt. Dabei werden Laserstrahlen mit einem Prisma und einer Lochblende auf einen definierten Wellenbereich eingeschränkt und das Streulicht durch eine brennpunktgleiche (konfokale) Lochblende abgefangen. Bei einer 40-fachen Vergrößerung wurden serielle Schichtbilder im Abstand von 0,5 – 1 µm im Rasterverfahren aufgenommen. Die Signale der Bilder einer Serie wurden normalisiert, um die Bildqualität zu

verbessern und ein hohes Signal/Hintergrundverhältnis zu erzielen. Die Bilder wurden auf eine Silicon Graphics Indy Workstation übertragen. Dort wurden die digitalen Datensätze mit Hilfe der Imaris Software zu einem hoch aufgelösten Bild umgewandelt und mit der Leica-Software die Signalstärken quantitativ gemessen.

Zur Auswertung wurden Längsschnitte von Myozyten verwendet. Die standardisierten Parameter des Mikroskops wurden in allen Messungen konstant gehalten. Die Quantifizierung geschah folgendermaßen: Mit Hilfe der F-Aktin Färbung wurden die Zellgrenzen bestimmt und die Strahlungsintensität der gesamten Myozytenfläche mit der Leica TCNT Software gemessen. Anschließend wurde die N-Cadherin Fluoreszenzintensität jeder Zelle bestimmt, wobei ein Grenzwert von 50 Pixel als Mindestintensität definiert wurde. Die Pixel wurden in μm^2 umgerechnet und die Quantität von N-Cadherin pro Myozyte als Prozentsatz der N-Cadherin positiven Fläche an der gesamt Myozytenfläche berechnet. Von jeder Probe wurden $41,8 \pm 5,8$ Myozyten des linken Ventrikels untersucht.

Die Werte von Patienten und Kontrollen wurden mit dem Students t-test der SigmaStat Software verglichen, wobei eine statistische Signifikanz bei $p < 0,05$ festgesetzt wurde. Die Daten wurden graphisch als \pm SEM dargestellt, wobei der Mittelwert der Kontrollen gleich 100 % gesetzt wurde.

VI. ERGEBNISSE

1. Qualität der RNA

Die Qualität der RNA ist einer der wichtigsten Faktoren für die Genauigkeit der Array Analyse, da eine schlechte RNA-Qualität zu hohem Hintergrund oder unspezifischen Hybridisierungen führt. Weiterhin bedingen Qualitätsunterschiede (vor allem eine teilweise Degradation der RNA) unterschiedliche Effizienzen in der Markierung und reversen Transkription der RNA, die den Eindruck einer differentiellen Expression erwecken kann. Da in dieser Untersuchung sowohl kommerziell erworbene als auch aus Geweben isolierte RNA verwendet wurde, wurde diese zuvor mittels Gelelektrophorese überprüft. Alle RNA-Proben wiesen als Zeichen einer gleichmäßig hohen Qualität klar abgegrenzte Banden der 18S und 28S rRNA im Verhältnis von 1:1,5-2 (Tabelle 10), sowie eine Bande der 5 S ribosomalen RNA auf. Anzeichen für eine Degradation waren nicht sichtbar (Abbildung 12).

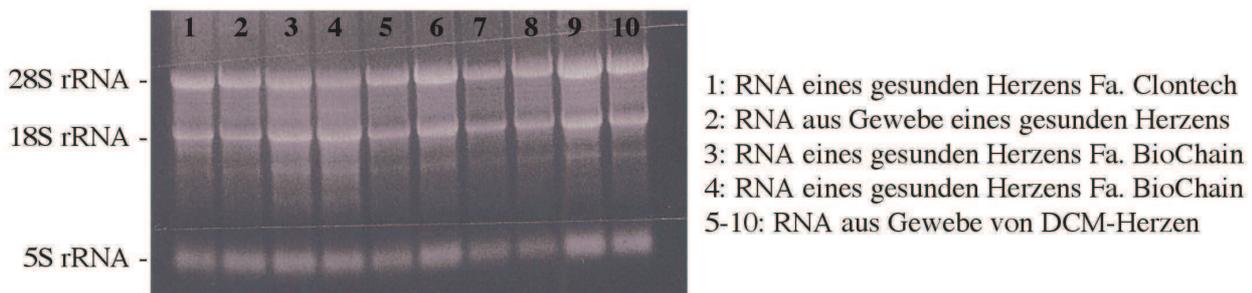


Abb. 12: Agarosegelelektrophorese zur Qualitätskontrolle der RNA. 1 μ g RNA wurde auf einem 1 % denaturierenden Agarosegel aufgetrennt.

Tab. 10: Vergleich der 18S und 28S rRNA Signalintensität

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1:1,9	1:2	1:1,9	1:1,9	1:1,8	1:1,8	1:1,8	1:1,8	1:1,9	1:2

2. Normalisierung

Um Unterschiede in der Ladung oder Transfereffizienz auszugleichen, musste für die Analyse der Northern und Western Blots ein geeignetes Normalisierungsverfahren gewählt werden.

2.1 Northern Blot Analyse

Die Northern Blots wurden auf die 18S rRNA Expression, die mit einem geeigneten Oligonukleotid detektiert wurde, normalisiert. Um sicherzustellen, dass keine Degradation dieser RNA bestand, wurden die in Abschnitt 1 beschriebenen Kontrollen durchgeführt. Durch den Vergleich des 18 S Hybridisierungssignals mit der 18S Ethidiumbromidfärbung wurde zusätzlich sichergestellt, dass ein gleichmäßiger Transfer dieser RNA stattgefunden hatte (Abbildung 13). Anzeichen für eine Degradation bestanden auch hier nicht.

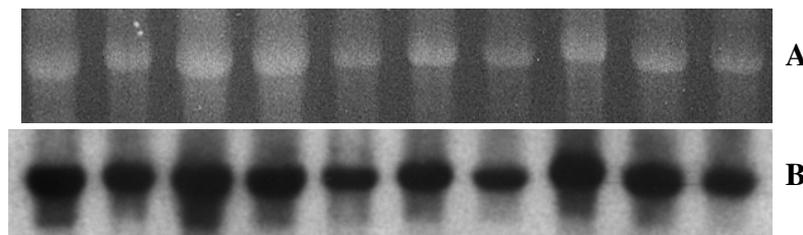


Abb. 13: Beurteilung der Transfereffizienz des Northern Blots durch Vergleich der Ethidiumbromidfärbung mit dem radioaktiven 18S Signal

A: Ethidiumbromidfärbung der 18S rRNA im Northern Gel

B: Detektion der 18S rRNA im Northern Blot mittels eines spezifischen Oligonukleotids.

2.2 Western Blot Analyse

Die Western Blots wurden auf das Haushaltsgen GAPDH, welches für gewöhnlich konstitutiv exprimiert wird, normalisiert. Da es jedoch bekannt ist, dass bei verschiedenen Erkrankungen und Experimenten eine differentielle Expression dieses Gens/Proteins auftritt [Suzuki et al., 2000], [Zhong und Simons, 1999], wurde die Eignung von GAPDH als interner Standard zuvor überprüft. Der Vergleich der GAPDH mRNA mit der 18 S rRNA Expression zeigte eine konstante Expression dieses Gens in der DCM (Abbildungen 14; 15).

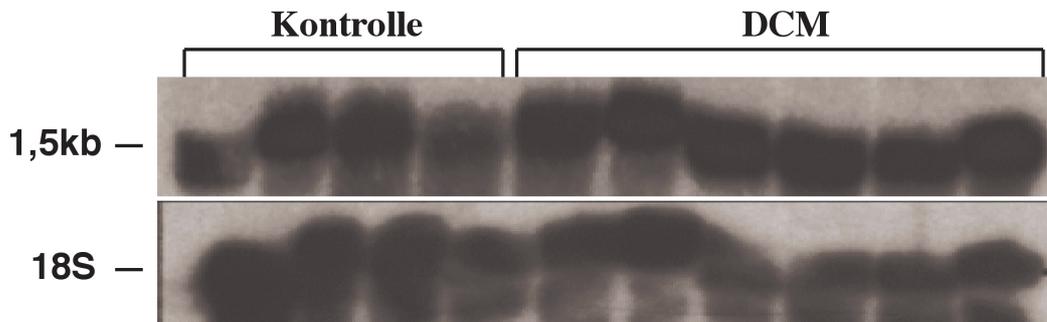


Abb.14: Northern Blot Analyse der GAPDH (1,5 kb) mRNA Expression im Vergleich zur 18 S rRNA Expression. 10 μ g Gesamt-RNA aus Kontroll- und DCM-Herzen wurden mit einer cDNA Sonde gegen GAPDH und einem 18 S Oligonukleotid hybridisiert.

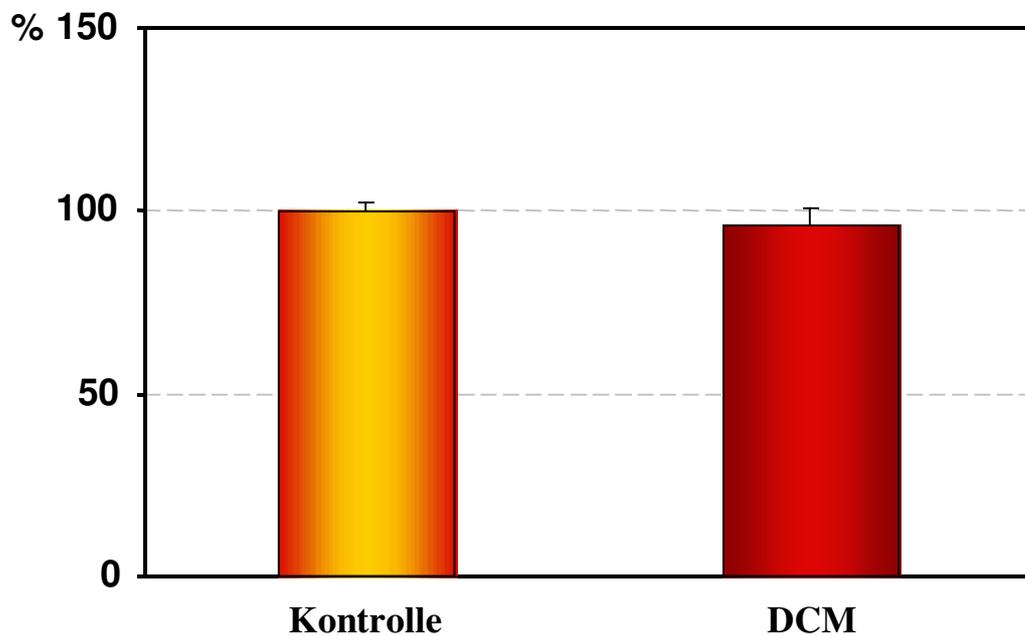


Abb. 15: Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der GAPDH mRNA Expression normalisiert auf 18 S. Der Vergleich der normalisierten Mittelwerte zeigt die gleichmäßige GAPDH mRNA Expression im Herzen.

Ein stabiler GAPDH Proteingehalt wurde durch Vergleich der GAPDH Signalintensität eines Western Blots mit der Ponceau S-Färbung der Proteine der entsprechenden Western Membran nachgewiesen (Abbildungen 16; 17).

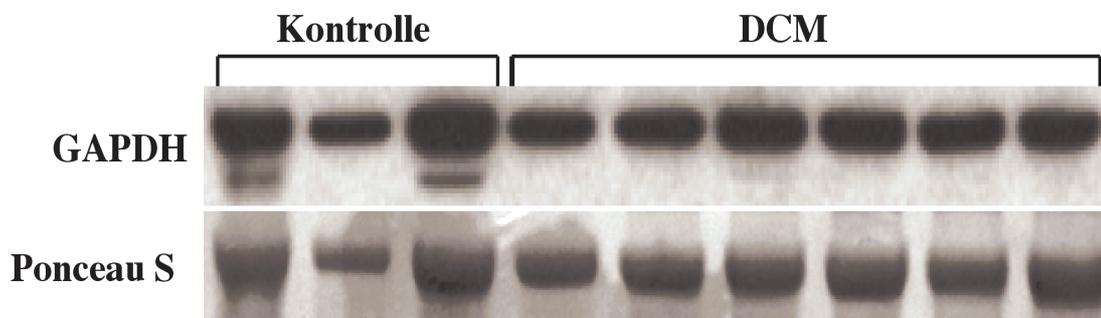


Abb. 16: Darstellung von GAPDH mittels eines monoklonalen Antikörpers im Western Blot im Vergleich zur Darstellung einer Proteinbande mittels Ponceau S auf einer Nylonmembran. 50 μ g Gesamt-Protein wurden auf einem 4-12 % Bis-Tris Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Zur Darstellung der Proteinbanden wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt. Für den Western Blot wurde die Membran mit einem monoklonalen Antikörper (mAK) gegen GAPDH inkubiert und das Signal durch einen HRP-konjugierten Sekundärantikörper sowie ECL sichtbar gemacht.

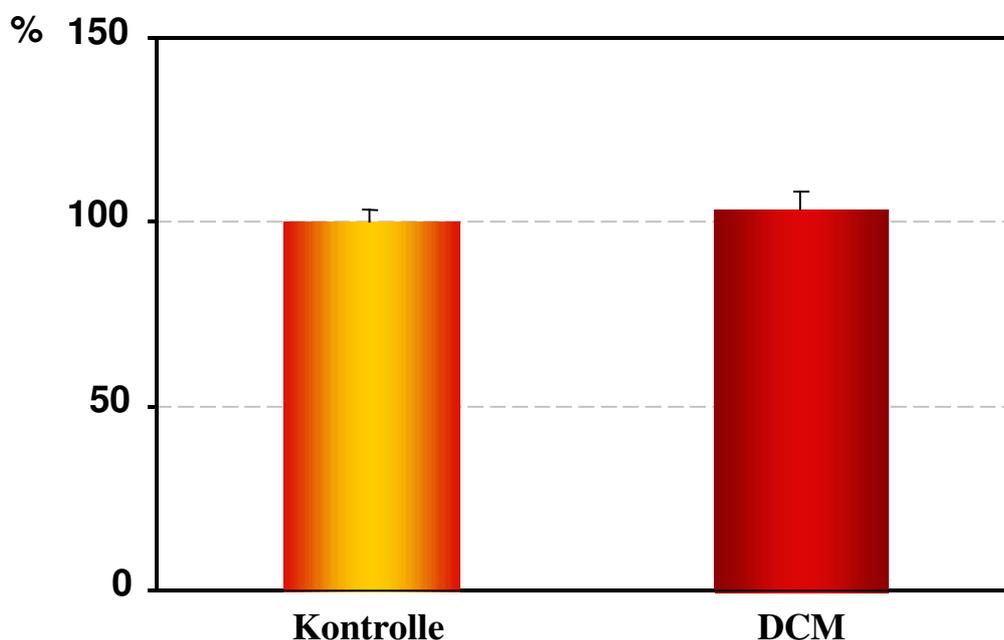


Abb. 17: Die graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der GAPDH Protein Expression normalisiert auf die Ponceau S Proteinfärbung. Die GAPDH Signale wurden auf Ponceau S normalisiert und Kontrollen und DCM statistisch miteinander verglichen. Es zeigte sich eine stabile GAPDH Protein Expression im Herzen.

3. Ergebnisse der Array Analyse

Zur breitflächigen Analyse der Genexpression in Herzen mit DCM im Vergleich zu gesunden Herzen wurde die Gesamt-RNA aus Kontroll- und DCM- Herzen jeweils gemischt, radioaktiv markiert und paarweise mit AtlasTM Human Cardiovascular Array oder 1.2 Array Filtern hybridisiert. Die Filter wurden anschließend bei 68 °C mehrfach mit 2xSSC/0,1 % SDS und 1xSSC/0,1 % SDS gewaschen und mit der AtlasTMImage Software ausgewertet. Als differentiell galten Gene, deren Wert das Doppelte des Hintergrundwertes betrug und die nach Korrektur um den Hintergrundwert und Normalisierung auf den Median aller Genwerte einen mindestens zweifachen Unterschied im Quotient sowie eine definierte Differenz zwischen Kontrolle und DCM aufwiesen. Für die AtlasTM Human Cardiovascular Arrays, die alle Gene als Duplikate aufweisen, galt als weitere Bedingung, dass die beiden Werte eines Genes eine mindestens 80 % Homologie aufweisen mussten.

3.1 AtlasTM Human Cardiovascular Array

Die Arrays wiesen ein gleichmäßiges Hybridisierungsmuster auf. Die Negativkontrollen (Plasmid- und Phagen-DNA) zeigten kein Signal, während die Positivkontrollen (Haushaltsgene) ein deutliches Signal ergaben. Abbildung 18 zeigt zwei Filter eines Cardiovascular Arrays, die mit gemischter Kontroll- beziehungsweise DCM-RNA hybridisiert wurden. Negativ- und Positivkontrollen sowie exemplarisch zwei differentielle Signale sind markiert. Ein Gen ist jeweils durch zwei Signale repräsentiert.

Bei der Auswertung mit der AtlasTM Image Software musste keines der Gene auf Grund mangelnder Homologie zwischen den Duplikaten ausgeschlossen werden. Dies spricht für eine hohe Spezifität der beobachteten Signale. Von den 588 Genen, die mit diesem Array untersucht wurden, ergaben zirka 42 % ein Signal, das über dem Hintergrundwert lag. Für die Analyse wurde bei jedem Filter der Mittelwert der beiden Signale eines Genes berechnet. Nach Hintergrundkorrektur und Normalisierung wurde dieser Wert mit dem Mittelwert des korrespondierenden Signals der anderen Membran verglichen.

Die Software ermittelt sowohl den Quotienten der Werte [Kontrolle/DCM] als auch die Differenz der Werte [Kontrolle – DCM] und stellt diese graphisch dar. Dabei wird jedes Gen in seiner Position auf dem Filter abgebildet. Eine Farbkodierung zeigt, wenn das Signal eines Gens nicht nachweisbar war (grau). War auf mindestens einem Filter das Signal detektierbar, zeigt die Farbe, ob die Expression dieses Gens stabil (grün), vermehrt (rot) oder vermindert (blau) ist. Das Symbol

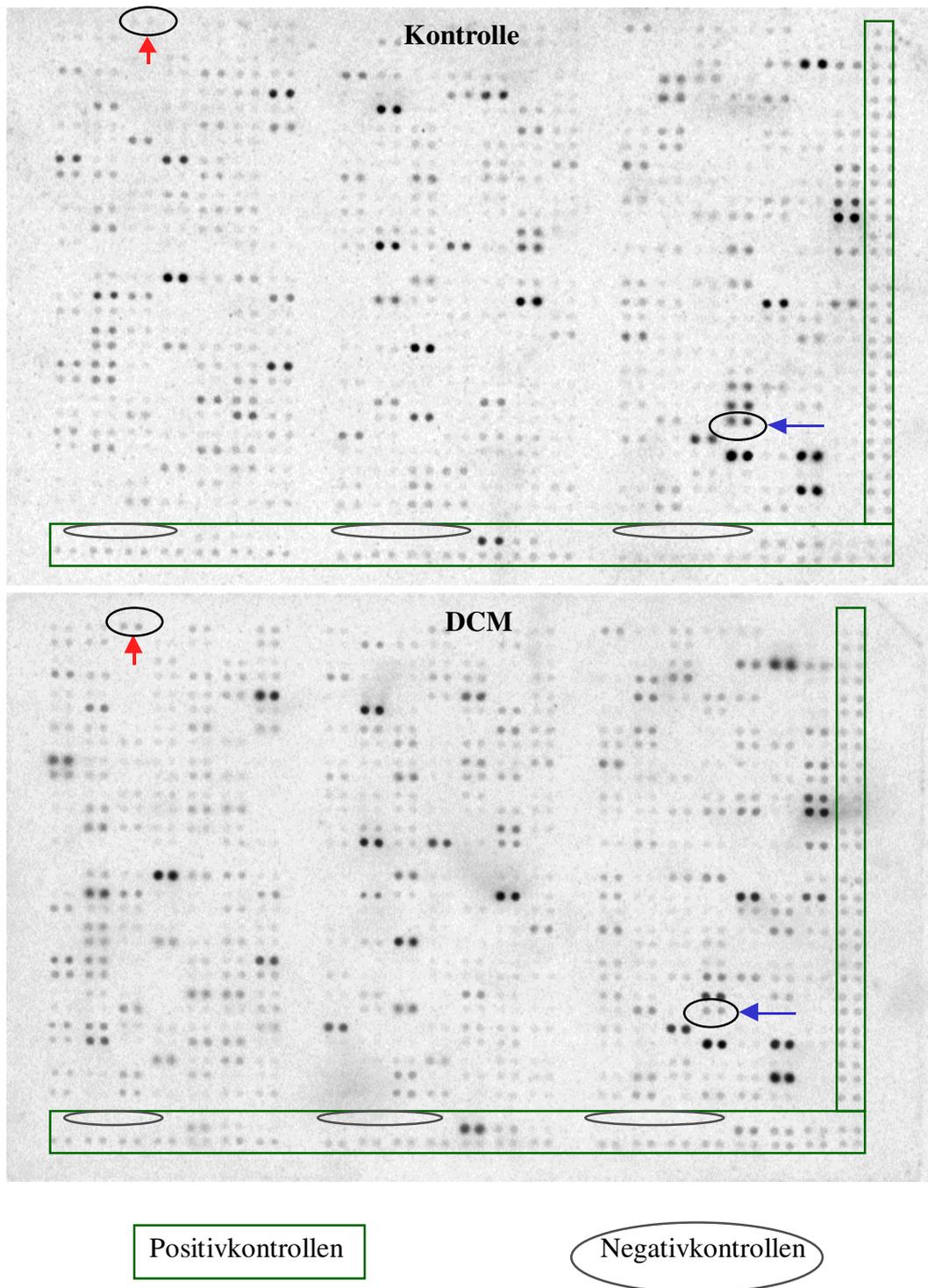
für ein Gen ist zweigeteilt, wobei die obere Hälfte anzeigt, ob ein mindestens zweifacher Unterschied im Quotient [Kontrolle/DCM], die untere Hälfte, ob ein definierter Unterschied in der Differenz [Kontrolle – DCM], besteht. Für Gene, die nur auf einem der Filter ein Signal ergeben, kann kein Quotient ermittelt werden. Diese werden nur als vermehrt oder vermindert exprimiert gekennzeichnet. Abbildung 19 gibt ein solches Bild wieder. Es wurden 12 Gene identifiziert, die eine differentielle Expression aufwiesen. Diese sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tab. 11: Ergebnis der AtlasTM Human Cardiovascular Array Analyse

Gen/Protein	Quotient
atrialer natriuretischer Faktor (ANF)	nur DCM
Fettsäure-bindendes Protein 4 (FABP4)	nur DCM
Fibronektin	290 %
Annexin I	260 %
Kollagen 1 α 1	250 %
N-Acetylglucosamin-6-sulfatase	200 %
Annexin VI	50 %
Herzmuskel-Myosin regulierende leichte Einheit (MLC2)	50 %
Kallistatin	30 %
Phospholipase A2 Rezeptor (PLA 2R)	24 %
Leukozyten Adhäsionsglykoprotein LFA-1 α	nur Kontrolle
T-Zell spezifisches Rantes Protein	nur Kontrolle

Quotient: Verhältnis Signalstärke (DCM / Kontrolle)*100

nur DCM oder Kontrolle: nur auf dem mit DCM- oder Kontroll-RNA hybridisierten Filter war ein Signal über dem Hintergrund nachweisbar



↑ Beispiel für ein vermehrt exprimiertes Gen (ANF)

← Beispiel für ein vermindert exprimiertes Gen (Annexin VI)

Abb. 18: Atlas™ Human Cardiovascular Array. Die Filter wurden mit gemischter Kontroll- oder DCM-mRNA hybridisiert und die Signale durch Exposition eines PhosphorImager Screens dargestellt.

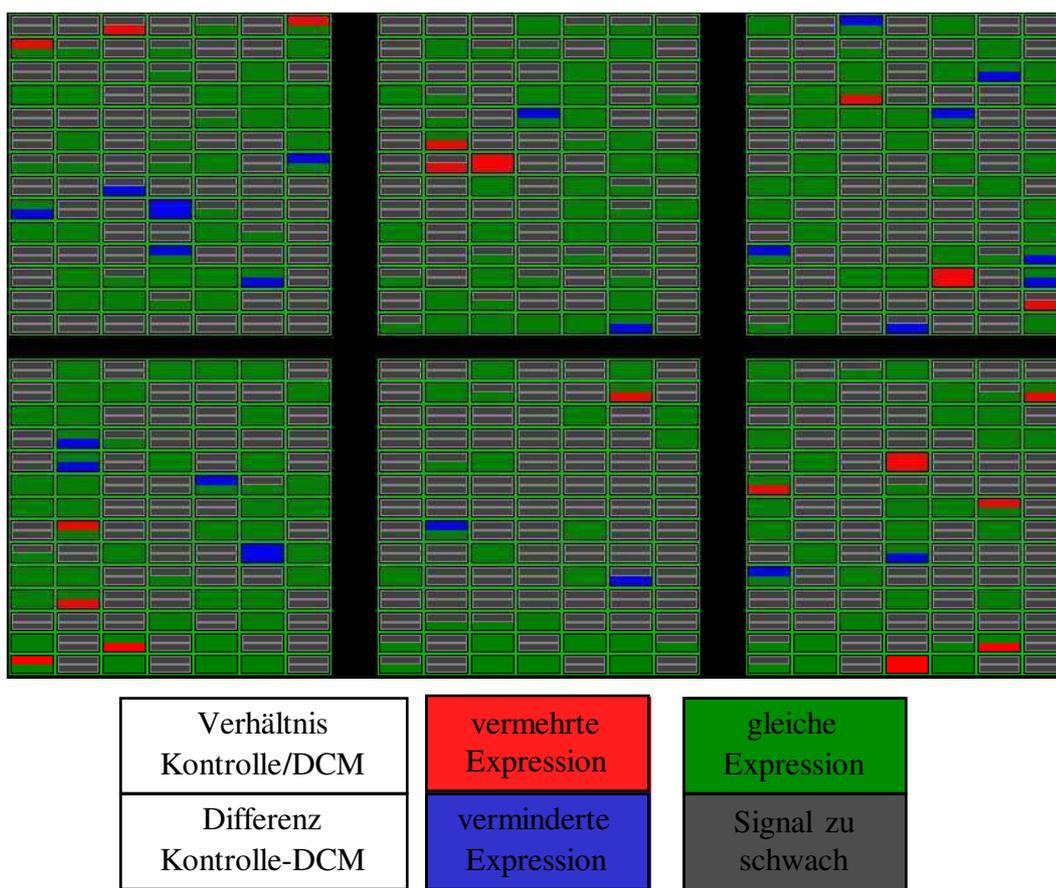


Abb. 19: Vergleich der Atlas™ Human Cardiovascular Arrays mit der Atlas™ Image Software

3.2 Atlas™ Human 1.2 Array

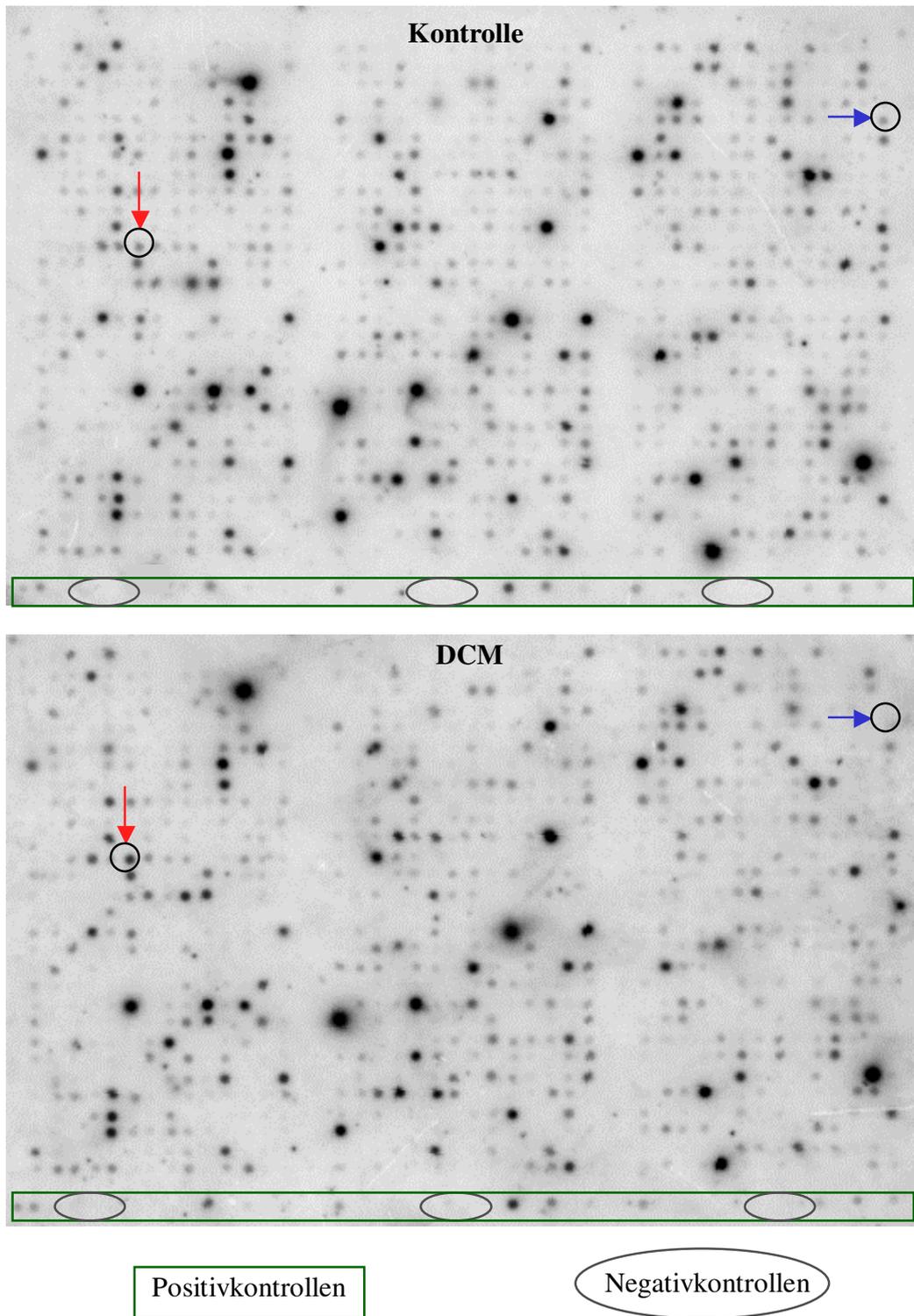
Auch diese Arrays wiesen ein gleichmäßiges Hybridisierungsmuster auf, mit deutlichen Signalen an den Positiv- und keinen Signalen an den Negativkontrollen. Abbildung 20 zeigt zwei Filter eines 1.2 Arrays, die mit gemischter Kontroll- beziehungsweise DCM-RNA hybridisiert wurden. Auch hier sind exemplarisch zwei differentielle Signale, Negativ- und Positivkontrollen markiert. Von den 1176 untersuchten Genen ergaben zirka 25 % ein Signal über dem Hintergrundwert. Nach der Ermittlung der Signalwerte und deren Korrektur wurden die Filter miteinander verglichen. Abbildung 21 zeigt ein von der Software erstelltes Bild der verglichenen Filter, in dem für jedes Gen farblich dargestellt wird, ob es ein Signal über dem Hintergrund ergab und ob dieses im Verhältnis Kontrolle/DCM und/oder in der Differenz der adjustierten Signalwerte differentiell ist. Es wurden 11 Gene identifiziert, die eine differentielle Expression aufwiesen. Diese sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tab. 12: Ergebnis der Atlas™ Human 1.2 Array Analyse

Gen/Protein	Quotient
N-Cadherin	340 %
Integrin β 1	330 %
Thymosin β 4	310 %
Helix-loop-helix-protein Id3	224 %
Tyrosinkinase 1	36 %
T-Zell spezifisches Rantes Protein	33 %
Transkriptionsfaktor NF-ATc	32 %
S100 Kalzium bindendes Protein A1	29 %
Plakoglobin	16 %
Neuronaler Acetylcholinrezeptor	nur Kontrolle
Telomerase reverse Transkriptase (TERT)	nur Kontrolle

Quotient: Verhältnis Signalstärke (DCM / Kontrolle)*100

nur Kontrolle: nur auf dem mit Kontroll-RNA hybridisierten Filter war ein Signal über dem Hintergrund nachweisbar



↓ Beispiel für ein vermehrt exprimiertes Gen (Id3)
← Beispiel für ein vermindert exprimiertes Gen (Plakoglobin)

Abb. 20: Atlas™ Human 1.2 Array. Die Filter wurden mit gemischter Kontroll- oder DCM-mRNA hybridisiert und die Signale durch Exposition eines PhosphorImager Screens dargestellt.

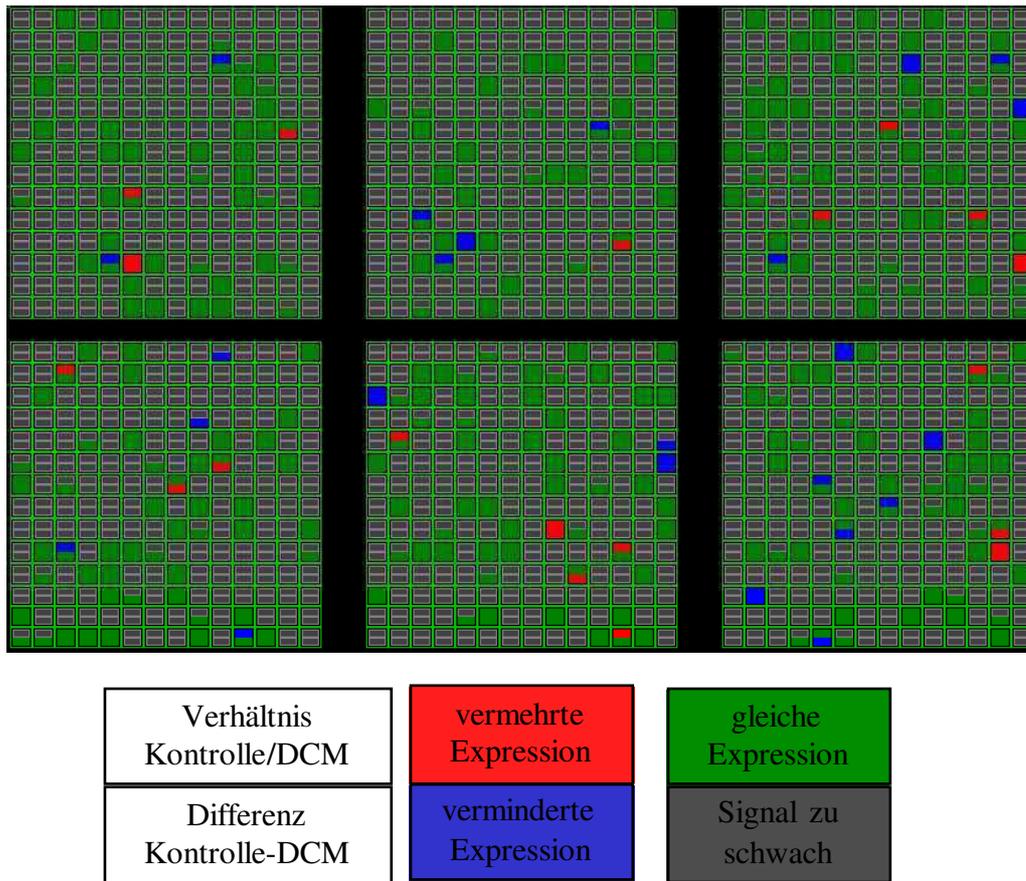


Abb. 21: Vergleich der Atlas™ Human 1.2 Arrays mit der Atlas™ Image Software

3.3 Identifikation von Markergenen

Die Identifikation von Markergenen spricht für die Korrektheit der mit einer Array Analyse ermittelten Ergebnisse. Hier konnte die vermehrte Expression von ANF [Saito et al., 1987], Fibronektin [Heling et al., 2000] und Kollagen I [Bishop et al., 1990], deren differentielle Expression charakteristisch für die DCM ist, beobachtet werden.

3.4 Vergleich der Nachweissensitivität von Array und Northern Blot Analyse

In der Array Analyse konnten einige der gespotteten Gene nicht untersucht werden, da sie entweder nicht detektierbar waren oder die stringenten Auswertungskriterien nicht erfüllten. Zur Bestätigung der Expression bekannter kardialer Gene in den untersuchten Proben wurden exemplarisch Northern Blot Analysen mit spezifischen cDNA Sonden für Zyxin und Desmin durchgeführt.

3.4.1 Northern Blot Analyse der Zyxin mRNA Expression

Im Northern Blot zeigte sich eine stabile Expression des Adhäsionsproteins Zyxin, welches in der Array Analyse nicht nachweisbar war (Abbildungen 22; 23).

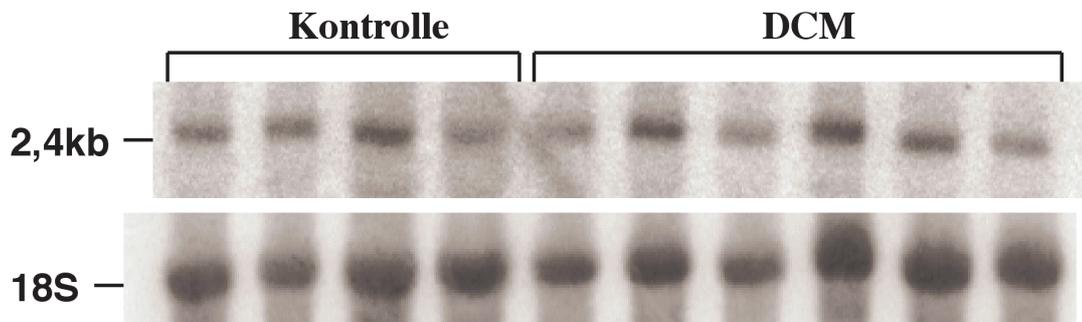


Abb. 22: Northern Blot Analyse der Zyxin mRNA Expression. 10 μ g Gesamt-RNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Es wurde mit einer radioaktiv markierten cDNA Sonde gegen humanes Zyxin, das durch die 2,4 kB Bande repräsentiert wird, und mit einem Oligonukleotid gegen 18S hybridisiert. Der Northern Blot zeigte eine konstitutive Expression der Zyxin mRNA.

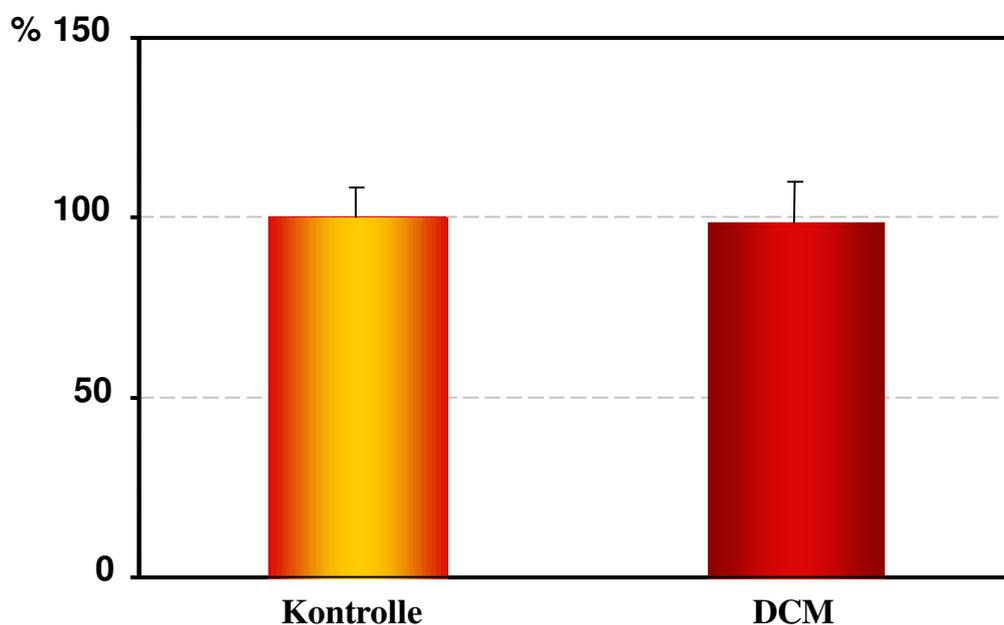


Abb. 23: Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der Zyxin mRNA Expression. Die Signalintensitäten wurden um den Hintergrund korrigiert, die Zyxinwerte auf 18 S normalisiert und Kontrollen und DCM statistisch miteinander verglichen, wobei $p < 0,05$ als signifikant definiert wurde.

3.4.2 Northern Blot Analyse der Desmin mRNA Expression

Das zytoskeletäre Protein Desmin, das in der Array Analyse von der Auswertung ausgeschlossen wurde, da es die Grenzwertkriterien nicht erfüllte, zeigte die bekannte [Heling et al., 2000] statistisch signifikante vermehrte Expression in der DCM (Abbildungen 24; 25).

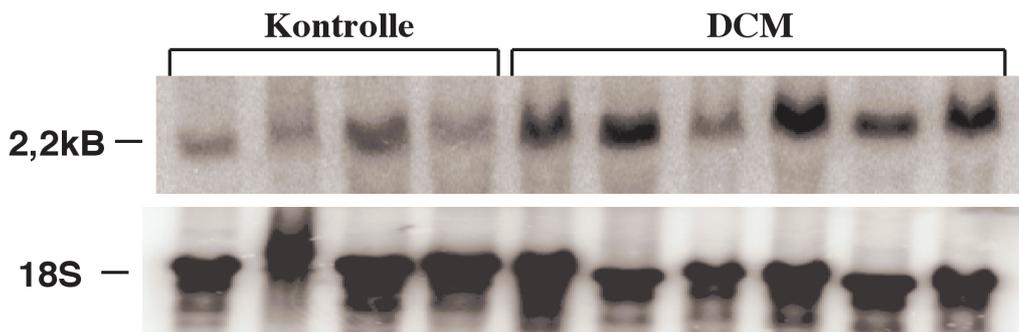


Abb. 24: Northern Blot Analyse der Desmin mRNA Expression im Herzen. Es wurde mit einer cDNA Sonde gegen Desmin und einem 18 S Oligonukleotid hybridisiert. Das Desmin Transkript hat eine Größe von 2,2 kB.

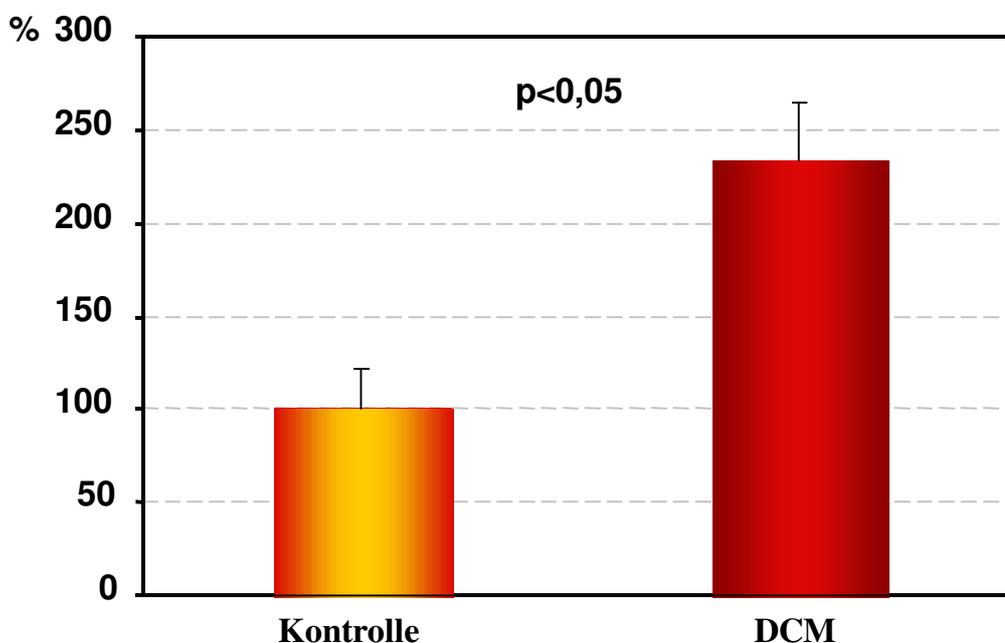


Abb. 25: Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der Desmin mRNA Expression. Nach der Hintergrundsubtraktion wurden die Werte auf 18 S normalisiert und statistisch analysiert. Als signifikant wurde $p < 0,05$ definiert. Es zeigt sich ein signifikanter 2,4-facher Anstieg der Desmin mRNA Expression in der DCM.

4. Annexin I

Annexin I hemmt die Migration von Leukozyten und die Freisetzung von Arachidonsäure, dem Vorläufer verschiedener inflammatorischer Proteine. Die Annexin I mRNA war in der Array Analyse um das 2,6-fache erhöht. Die Expression des korrespondierenden Proteins zeigte ebenfalls einen statistisch signifikanten Anstieg in Herzen mit DCM, der das Ergebnis der Array Analyse bestätigt (Abb. 26; 27).

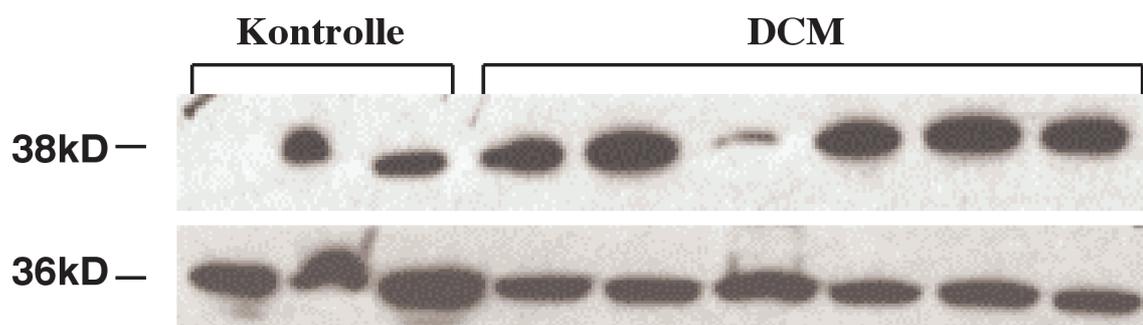


Abb. 26: Darstellung der Annexin I Protein Expression im Western Blot. Die Membranen wurden nacheinander mit mAKs gegen Annexin I und GAPDH inkubiert. Die Darstellung der Signale erfolgte mittels eines HRP-konjugierten Sekundärantikörpers und ECL. Die 38 kD Bande repräsentiert Annexin I, die 36 kD Bande GAPDH.

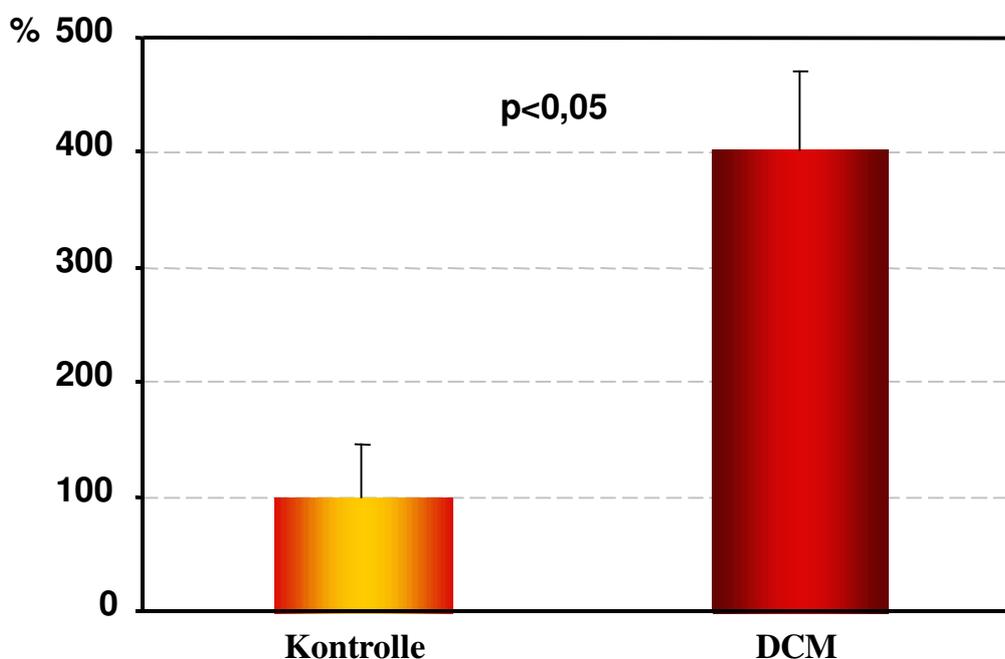


Abb. 27: Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der Annexin I Proteinexpression. Nach der Detektion wurden die Signale um den Hintergrund korrigiert und Annexin I auf GAPDH normalisiert. Kontrollen und DCM wurden statistisch miteinander verglichen. Es zeigte sich ein signifikanter ($p < 0,05$) 4-facher Anstieg in der DCM.

5. Integrin $\beta 1$

Integrine sind Membranrezeptoren, die die Zell-Zell- oder Zell-Matrixadhäsion vermitteln. In der Array Analyse wies die Integrin $\beta 1$ mRNA einen 3,3-fachen Anstieg in der DCM auf. Das Protein zeigte in der DCM einen 2-fachen, statistisch signifikanten Anstieg (Abbildungen 28; 29).

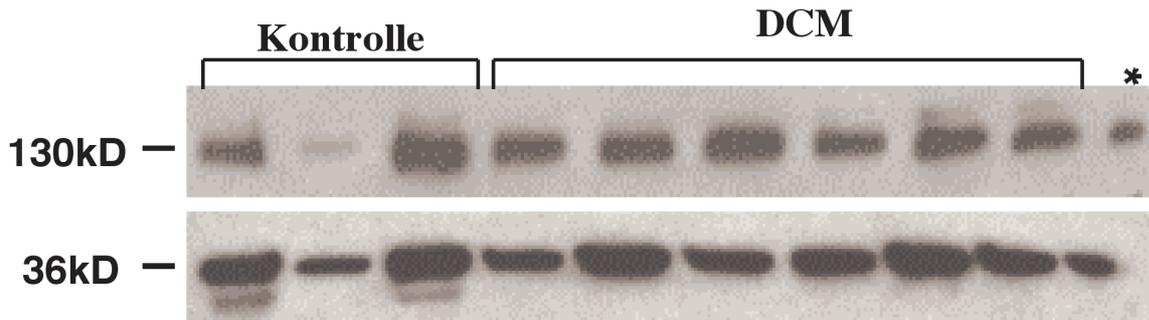


Abb. 28: Darstellung der Integrin $\beta 1$ Protein Expression im Western Blot. Der Nachweis erfolgte mit einem mAK gegen Integrin $\beta 1$ und GAPDH. Die 130 kD Bande repräsentiert Integrin $\beta 1$, die 36 kD Bande GAPDH. Auf der mit * markierten Spur wurde eine Positivkontrolle für den Integrin $\beta 1$ Antikörper aufgetragen.

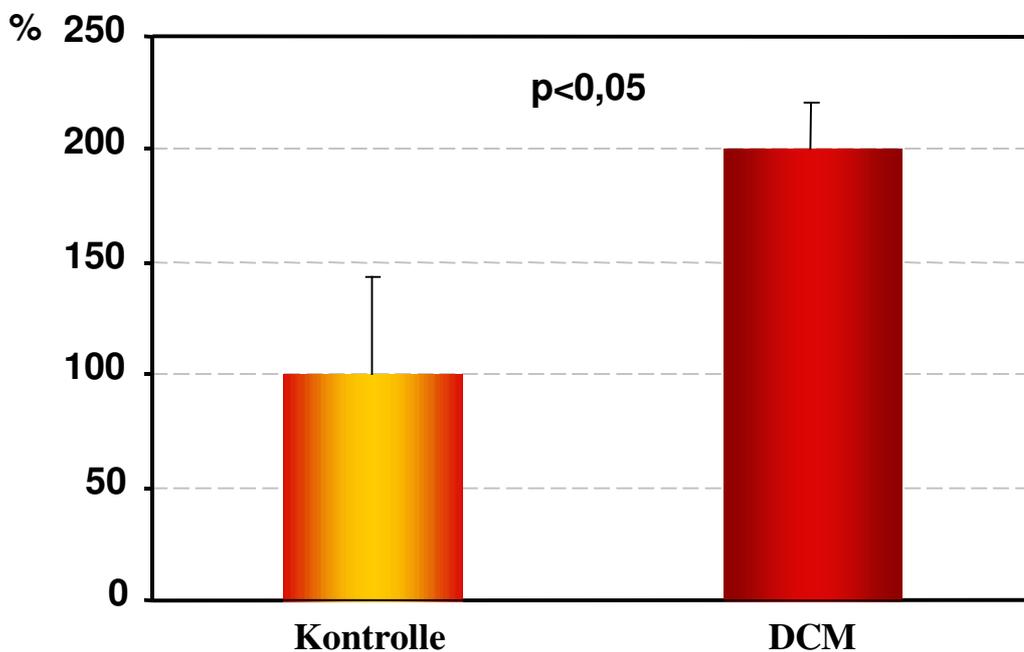


Abb. 29: Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der Integrin $\beta 1$ Proteinexpression im Säulendiagramm. Die um den Hintergrund korrigierten und auf GAPDH normalisierten Werte von Kontrollen und DCM wurden statistisch miteinander verglichen, wobei sich ein signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg in der DCM zeigte.

6. Helix-loop-helix Protein Id3

Id3 gehört zu einer Familie negativer Transkriptionsregulatoren und wirkt pro-apoptotisch. Id3 zeigte einen 2,2-fachen Anstieg in der Array-Analyse. Im Western Blot konnte ein statistisch signifikanter Anstieg des Proteins um das 1,6-fache demonstriert werden (Abbildungen 30; 31).

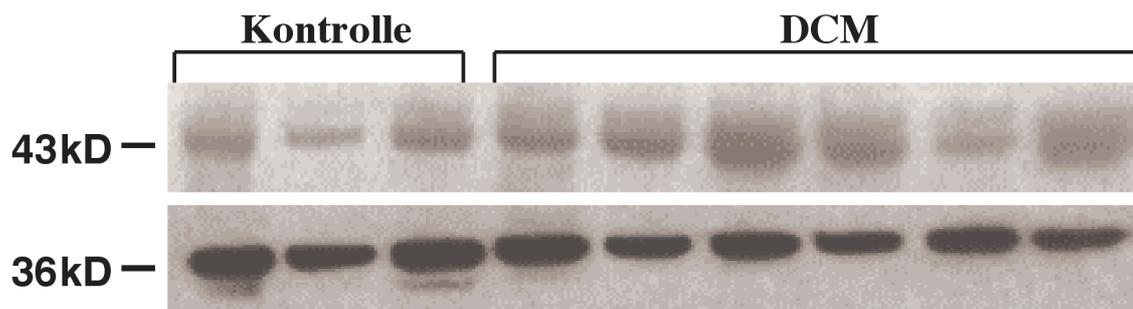


Abb. 30: Darstellung der Id3 Protein Expression im Western Blot. Es wurden 50 µg Gesamt-Protein elektrophoretisch auf einem 4-12 % Bis-Tris-Gel aufgetrennt und mit mAKs gegen Id3 und GAPDH, sowie einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Die 43 kD Bande repräsentiert Id3, die 36 kD Bande GAPDH.

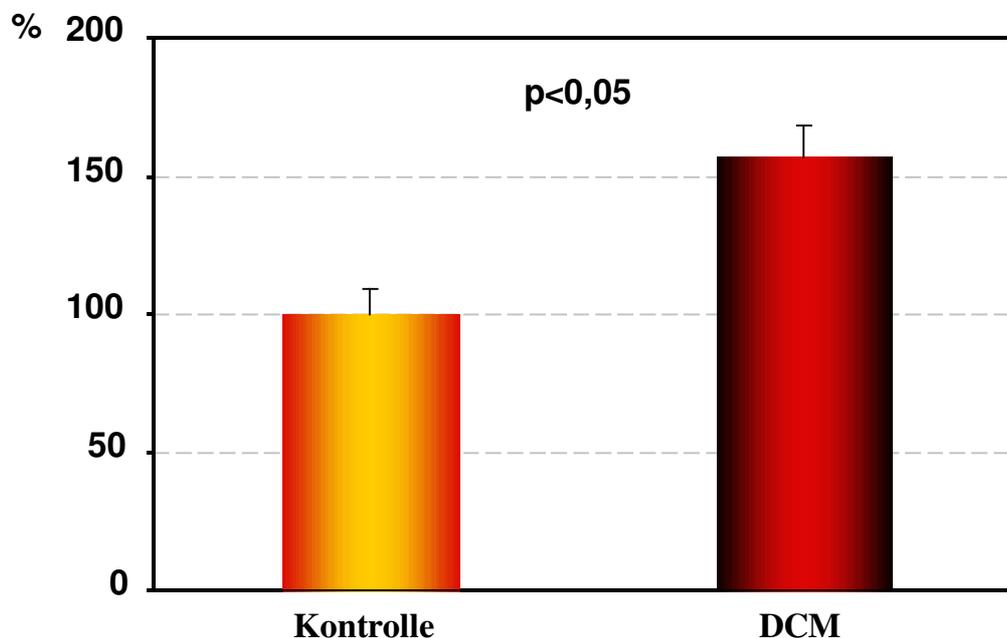


Abb. 31: Säulendiagramm der Mittelwerte \pm SEM der Id3 Proteinexpression. Von den Signalen wurde der Hintergrund subtrahiert. Die Id3 Werte wurden auf GAPDH normalisiert und Kontrollen und DCM statistisch miteinander verglichen, wobei ein signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg von Id3 in den DCM-Ventrikelpflanzen gezeigt wurde.

7. Plakoglobin

Plakoglobin, auch als γ -Catenin bezeichnet, ist ein Bestandteil der Desmosomen und der Adhäsionsverbindungen an den Glanzstreifen. Auf mRNA Ebene zeigte die Array-Untersuchung eine 6-fache Reduktion von Plakoglobin. Der Vergleich der Protein Produktion zeigte einen statistisch signifikanten Rückgang auf die Hälfte in der DCM (Abbildungen 32; 33).

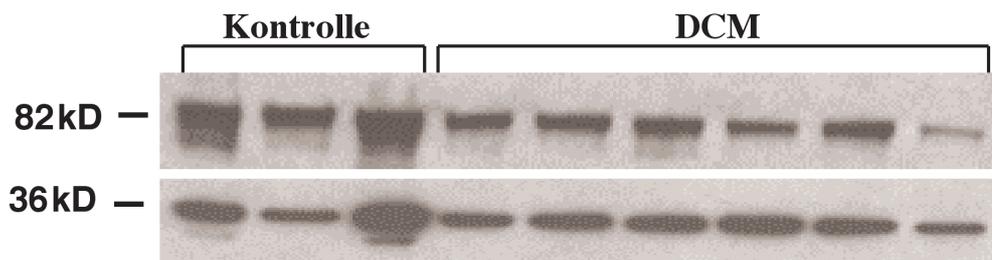


Abb. 32: Immunologische Detektion von Plakoglobin im Western Blot. Der Nachweis erfolgte durch mAKs gegen Plakoglobin und GAPDH. Die 82 kD Bande repräsentiert Plakoglobin, die 36 kD Bande GAPDH.

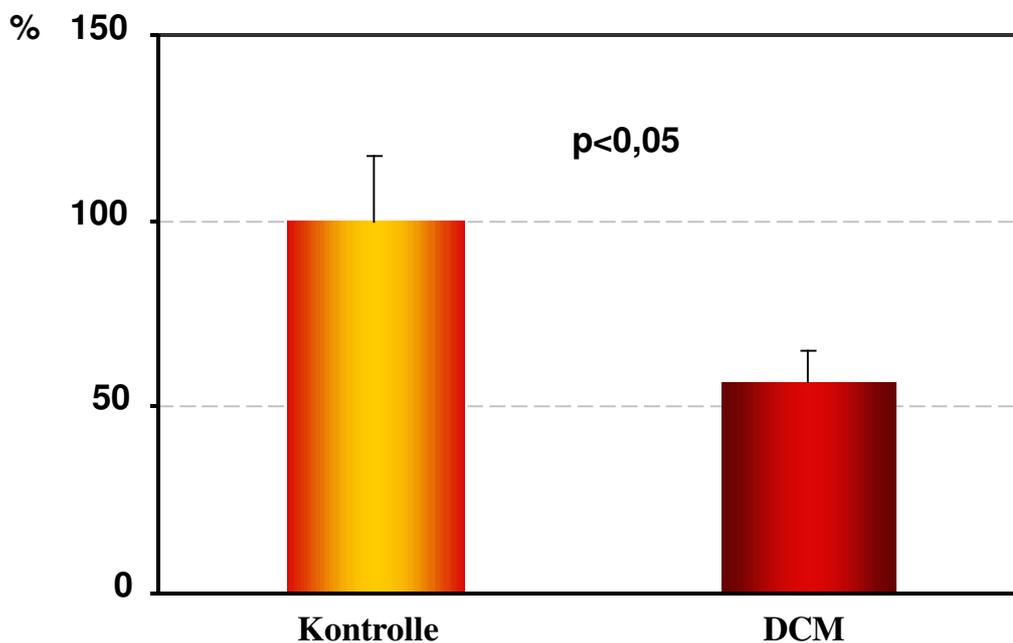


Abb. 33: Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der Plakoglobin Proteinexpression. Die Daten wurden nach Subtraktion des Hintergrundes und Normalisierung auf GAPDH statistisch miteinander verglichen (Signifikanz: $p < 0,05$). Es besteht eine signifikante Reduktion von Plakoglobin im linken Ventrikel bei der DCM.

8. N-Cadherin

N-Cadherin ist ein transmembranäres Glykoprotein, das an den Adhäsionsverbindungen der Glanzstreifen im Herzen über die Catenine das Aktinzytoskelett benachbarter Zellen verbindet. In der Array-Analyse zeigte sich eine 3,4-fache Erhöhung der N-Cadherin mRNA.

8.1 Northern Blot Analyse der N-Cadherin mRNA Expression

Im Northern Blot zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg der N-Cadherin mRNA Expression auf 230 % in den DCM-Proben (Abbildungen 34; 35), der das Ergebnis der Array Analyse bestätigte.

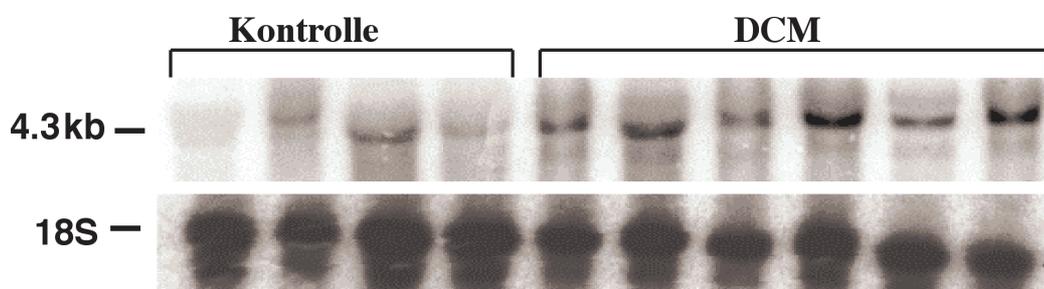


Abb. 34: Nachweis der N-Cadherin (4,3 kb) mRNA Expression im Northern Blot. 10 µg Gesamt-RNA aus dem linken Ventrikel wurde mit einer cDNA-Sonde gegen N-Cadherin und einem Oligonukleotid gegen 18 S hybridisiert.

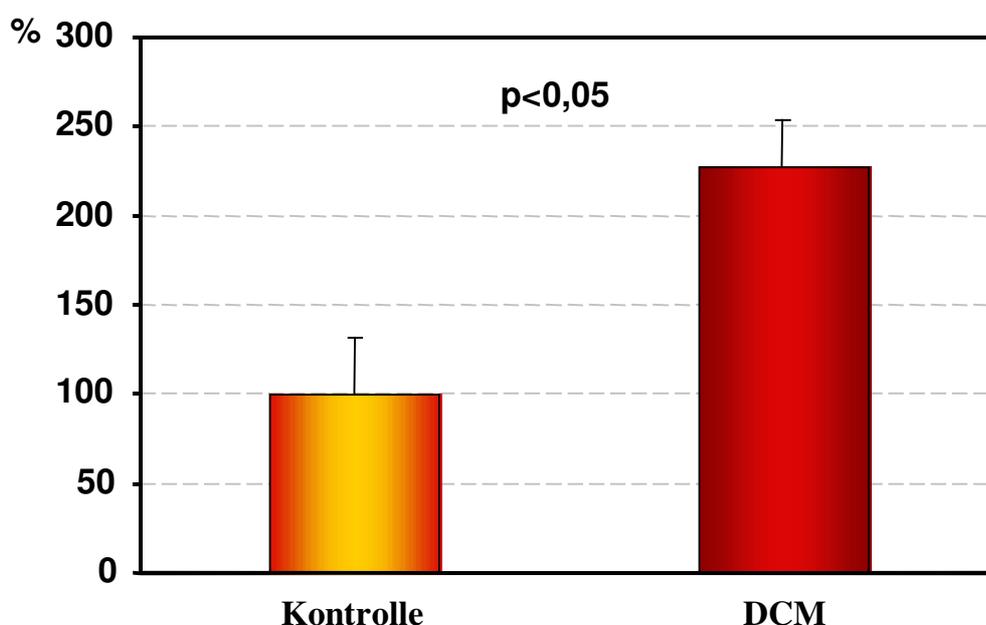


Abb. 35: Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der N-Cadherin mRNA Expression. Kontrollen und DCM wurden auf 18S normalisiert und statistisch miteinander verglichen, wobei sich ein signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg in der DCM zeigte.

8.2 Western Blot Analyse der N-Cadherin Protein Expression

Da die Expression des korrespondierenden Proteins in der Western Blot Analyse nicht mit der mRNA Expression korrelierte, wurde der Western Blot mit drei verschiedenen Antikörpern wiederholt. Der Vergleich der auf GAPDH normalisierten Werte von Kontrollen und DCM zeigte mit allen Antikörpern, dass keine statistisch signifikante Änderung des N-Cadherin-Proteingehaltes vorliegt (Abbildungen 36; 37).

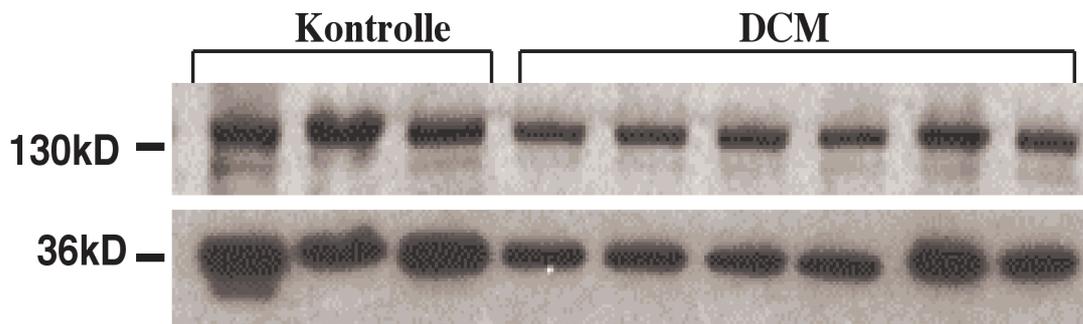


Abb. 36: Darstellung der N-Cadherin Protein Expression im Western Blot. Die Detektion von N-Cadherin und GAPDH erfolgte mittels mAKs, HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper und ECL. Für dieses Beispiel wurde der anti-N-Cadherin AK der Fa. BD verwendet. Die 130 kD Bande repräsentiert N-Cadherin, die 36 kD Bande GAPDH.

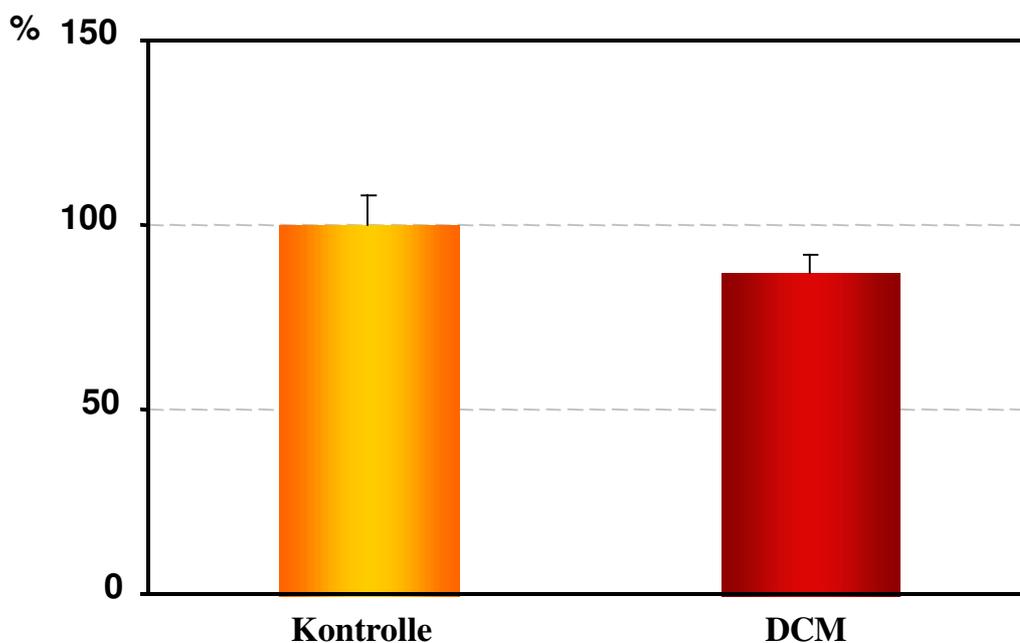


Abb. 37: Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der N-Cadherin Proteinexpression. Die Signale wurden um den Hintergrund korrigiert, auf GAPDH normalisiert und statistisch analysiert. Es besteht ein stabiler N-Cadherin Proteingehalt in der DCM.

8.3 Quantitative Immunokonfokalanalyse der N-Cadherin Protein Expression

Der N-Cadherin Protein Gehalt pro Myozyte wurde zusätzlich mittels quantitativer Immunokonfokalanalyse untersucht (Abbildung 38). Wie im Western Blot zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und DCM (Abbildung 39).

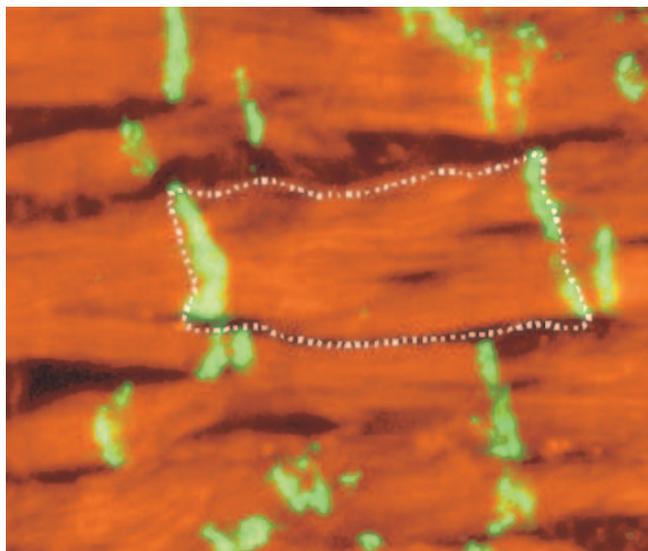


Abb. 38: Immunohistochemische Färbung eines Kontrollgewebeschnitts. Es wurden 12 μm Kryogewebeschnitte von Kontroll- und DCM-Proben mit einem mAK gegen N-Cadherin inkubiert und das Protein mit einem Cy-2 gekoppelten Sekundärantikörper (grün) nachgewiesen. Durch eine Anfärbung von F-Aktin mit TRITC gekoppeltem Phalloidin (rot) konnten die Zellgrenzen (gepunktete Linie) determiniert werden.

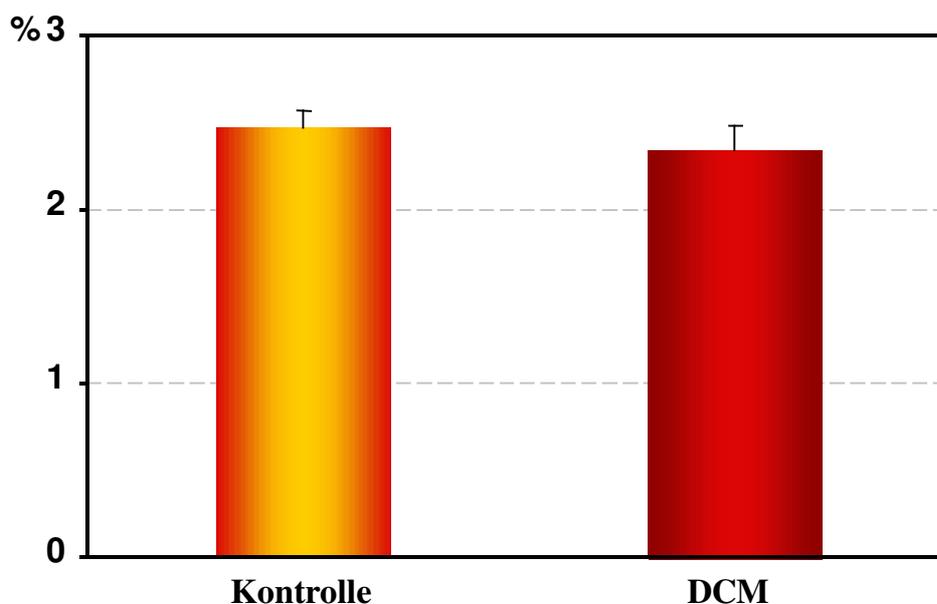


Abb. 39: Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM des relativen Anteils der N-Cadherin positiven Fläche an der Gesamtfläche der Myozyten. Der prozentuale Anteil der N-Cadherin positiven Region pro Myozyte wurde mit der Leica TCNT Software bestimmt. Der statistische Vergleich von Kontrollen und DCM zeigte keinen signifikanten Unterschied.

8.4 Immunohistochemische Analyse der N-Cadherin Protein Verteilung

Die Gewebeschnitte wurden ebenfalls auf die Verteilung des Proteins hin untersucht. In den Kontrollen ist N-Cadherin hauptsächlich an den Glanzstreifen lokalisiert und es finden sich nur wenige Färbungen lateral am Sarkolemma (Abbildung 40). In den DCM-Gewebeschnitten wurde dahingegen eine starke Disorganisation von N-Cadherin beobachtet. Die Färbung an den Glanzstreifen war schwach ausgeprägt. Statt dessen zeigte sich eine longitudinale Anhäufung von N-Cadherin am lateralen Sarkolemma (Abbildung 41).

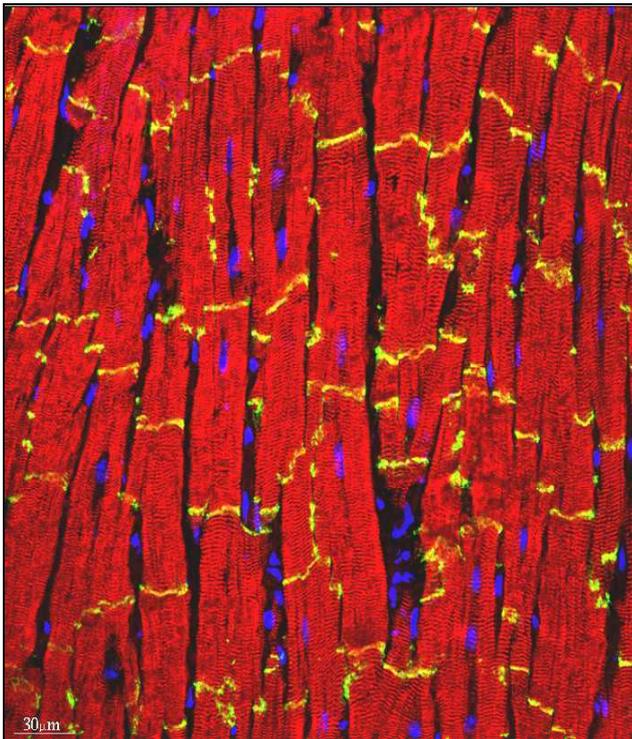


Abb. 40: Immunohistochemische Färbung eines Kontrollgewebeschnittes.

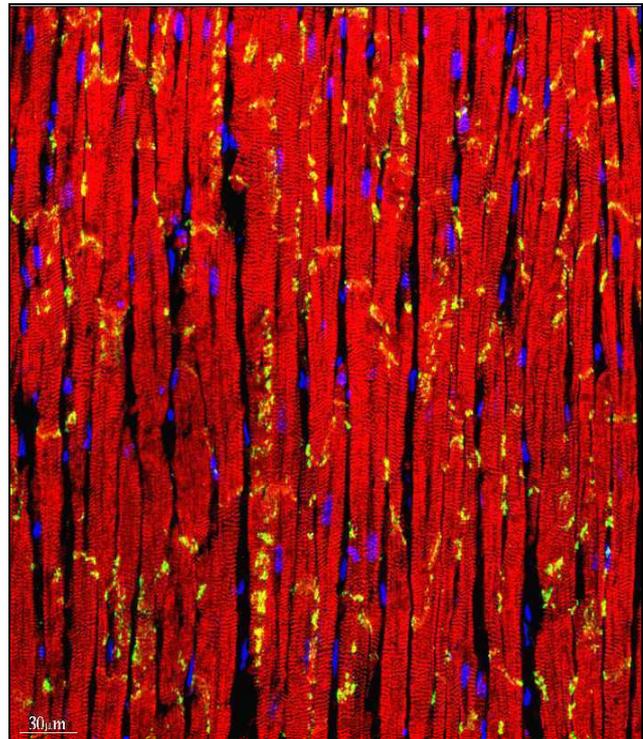


Abb. 41: Immunohistochemische Färbung eines DCM Gewebeschnittes.

Abb. 40/41: Es wurden 12 µm Kryogewebeschnitte angefärbt. N-Cadherin (grün) wurde mittels eines monoklonalen Primärantikörpers und eines Cy-2 gekoppelten Sekundärantikörpers dargestellt, α-Aktinin (rot) mittels eines monoklonalen Primärantikörpers und eines TRITC-gekoppelten Sekundärantikörpers. Die Zellkerne (blau) wurden mit TOTO3 angefärbt.

9. α - und β -Catenin

α - und β -Catenin wurden untersucht, da sie neben N-Cadherin weitere Bestandteile der Adhäsionsverbindungen sind. Darüber hinaus kann β -Catenin partiell Plakoglobin ersetzen.

9.1 Northern und Western Blot Analyse der α - Catenin Expression

Der Vergleich der mRNA (Abbildungen 42; 43) und Protein (Abbildungen 44; 45) Expression von α -Catenin zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Kontrollen und DCM.

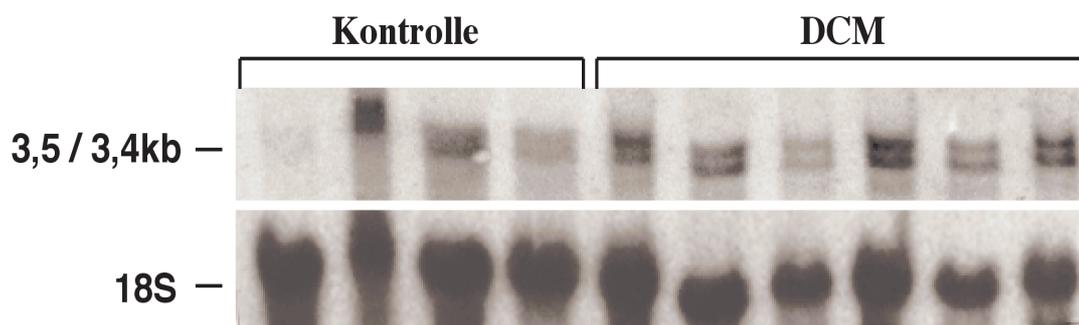


Abb. 42: Darstellung der α -Catenin mRNA (3,4/3,5 kb) Expression im Northern Blot. Der Nachweis erfolgte mit einer cDNA Sonde gegen α -Catenin und einem 18 S Oligonukleotid, welches als interner Standard fungierte.

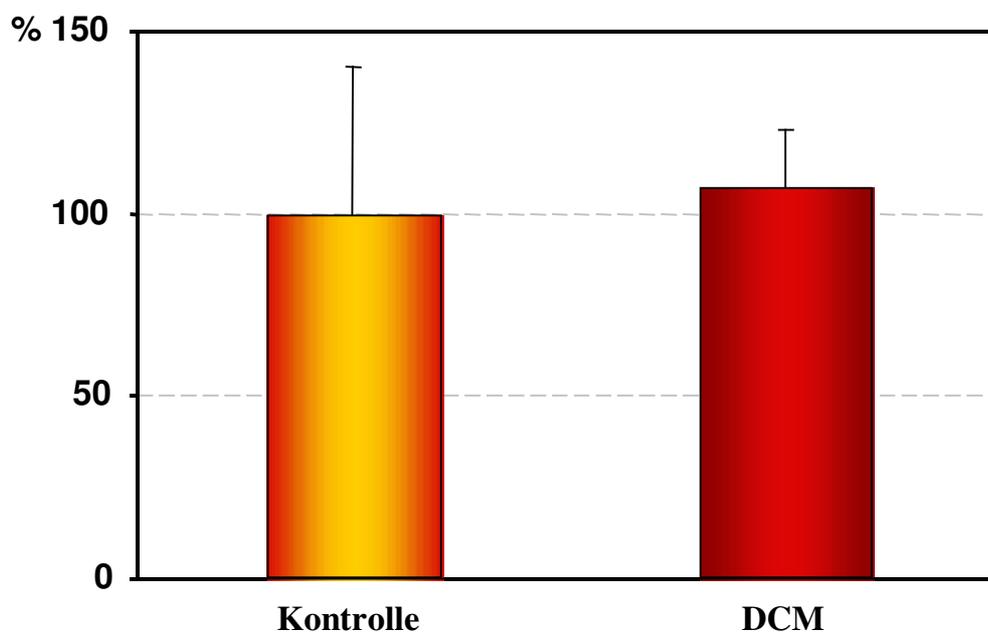


Abb. 43: Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der α -Catenin mRNA Expression. Es wurden die Mittelwerte der Signalintensitäten beider Banden (3,4+3,5 kb) ermittelt. Der statistische Vergleich der auf 18S normalisierten Werte zeigte, dass kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und DCM besteht.

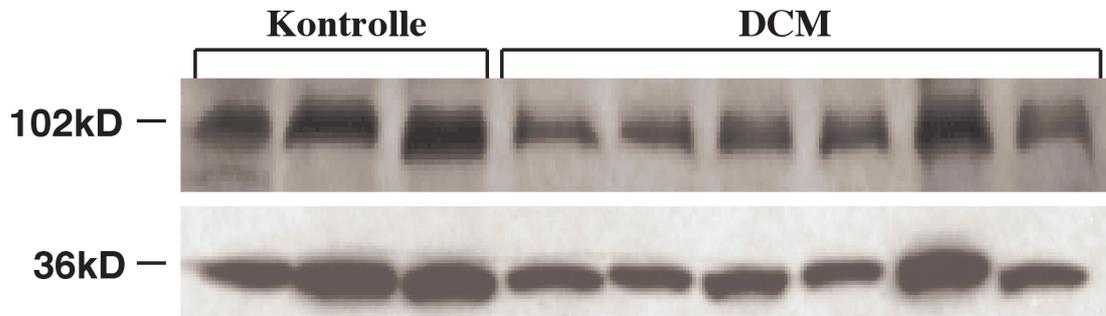


Abb. 44: Darstellung der α -Catenin Protein Expression im Western Blot. 50 μ g Gesamt-Protein aus linken Ventrikeln von Kontroll und DCM Herzen wurden untersucht. α -Catenin und GAPDH wurden durch mAKs, HRP-gekoppelte Sekundärantikörper und ECL nachgewiesen. Die 102 kD Bande repräsentiert α -Catenin, die 36 kD Bande GAPDH.

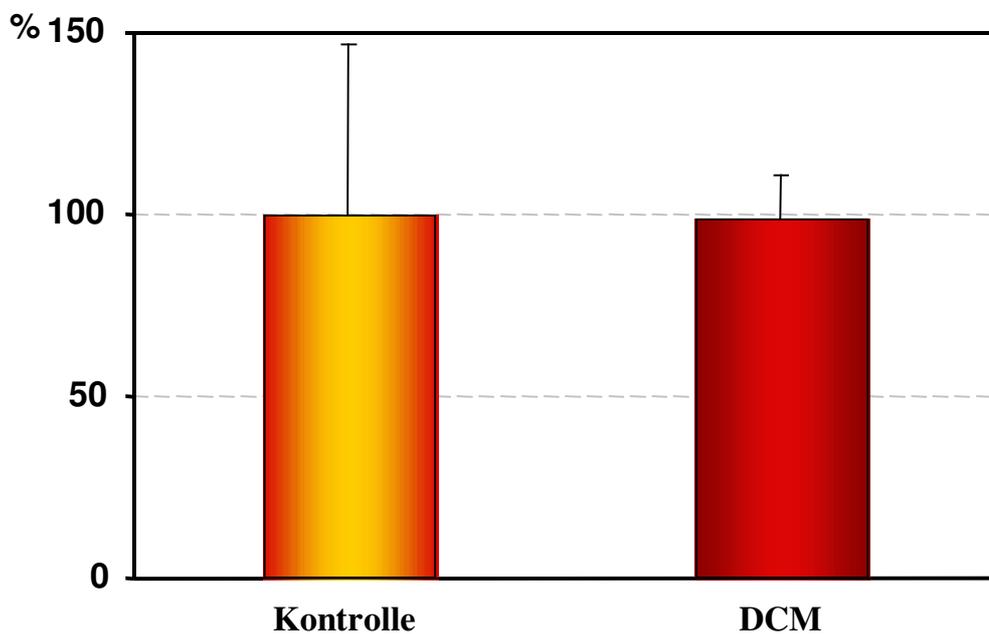


Abb. 45: Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der α -Catenin Protein Expression. Nach Subtraktion des Hintergrundes wurden die α -Catenin Signalwerte auf GAPDH normalisiert und Kontrollen und DCM statistisch miteinander verglichen. Es bestand kein signifikanter Unterschied. Für die Darstellung im Säulendiagramm wurde der Mittelwert der Kontrollen gleich 100 % gesetzt.

9.2 Northern und Western Blot Analyse der β -Catenin Expression

Der Vergleich der mRNA (Abbildungen 46; 47) und Protein (Abbildungen 48; 49) Expression von β -Catenin zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Kontrollen und DCM.

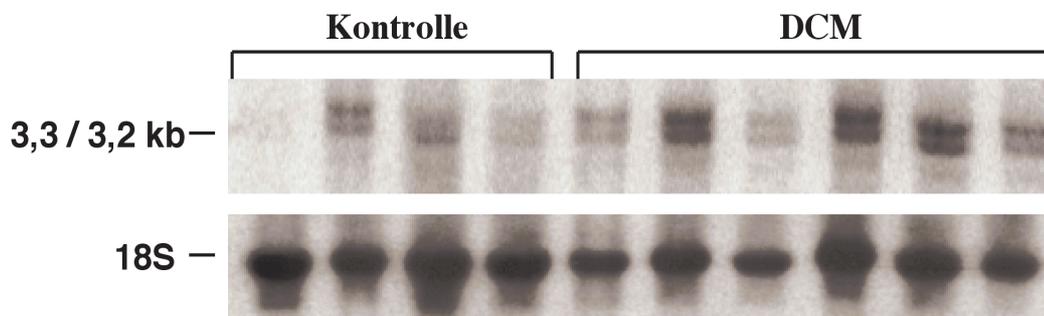


Abb. 46: Darstellung der β -Catenin mRNA Expression im Northern Blot im Vergleich zur 18 S rRNA Expression. β -Catenin wurde mit einer spezifischen cDNA Sonde nachgewiesen und zeigt ein Signal bei 3,2 kb und 3,3 kb.

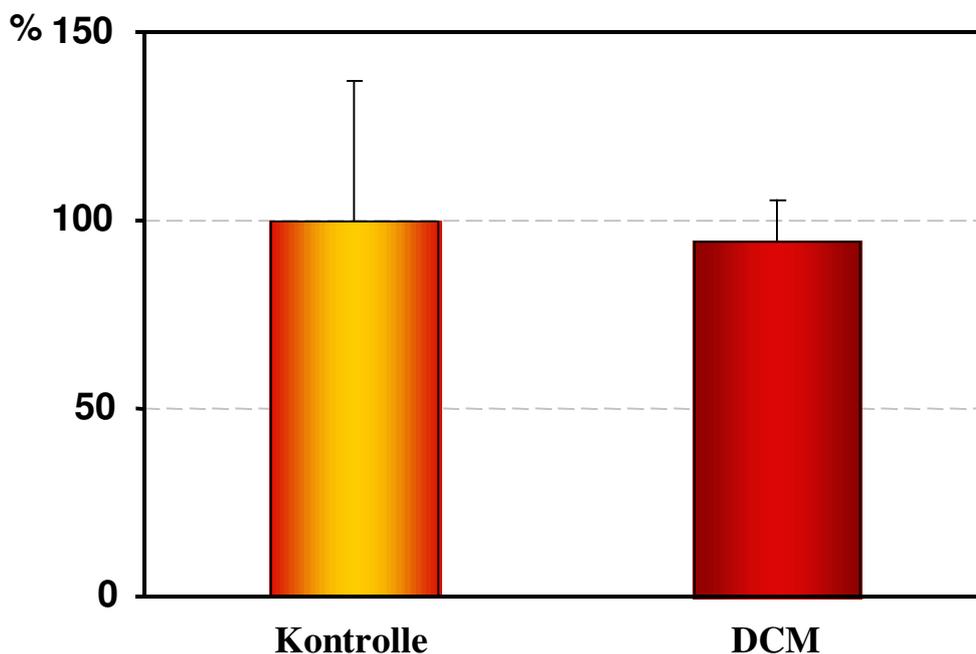


Abb. 47: Säulendiagramm der Mittelwerte \pm SEM der β -Catenin mRNA Expression. Nach Hintergrundsubtraktion und Normalisierung auf 18 S wurden die Mittelwerte der beiden Banden (3,2+3,3 kb) gebildet. Anschließend wurden Kontrollen und DCM verglichen und statistisch analysiert, wobei eine konstitutive Expression gezeigt wurde.

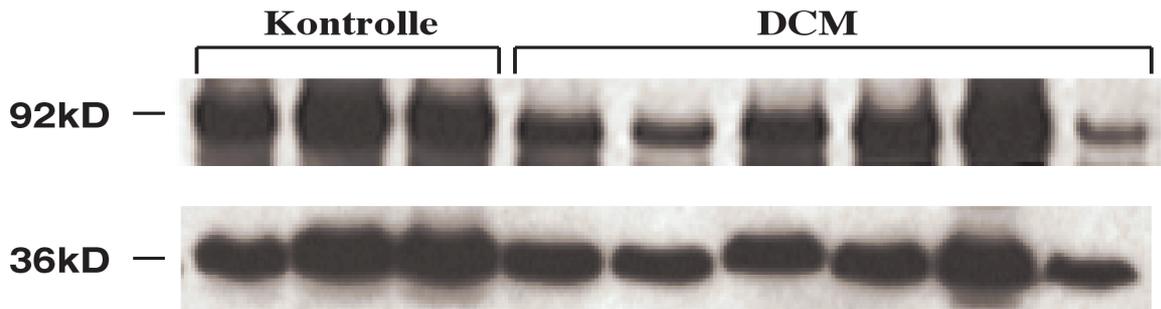


Abb. 48: Darstellung der β -Catenin Protein Expression im Western Blot. β -Catenin und GAPDH wurden durch mAKs, HRP-gekoppelte Sekundärantikörper und ECL nachgewiesen. Die 92 kD Bande repräsentiert β -Catenin, die 36 kD Bande GAPDH.

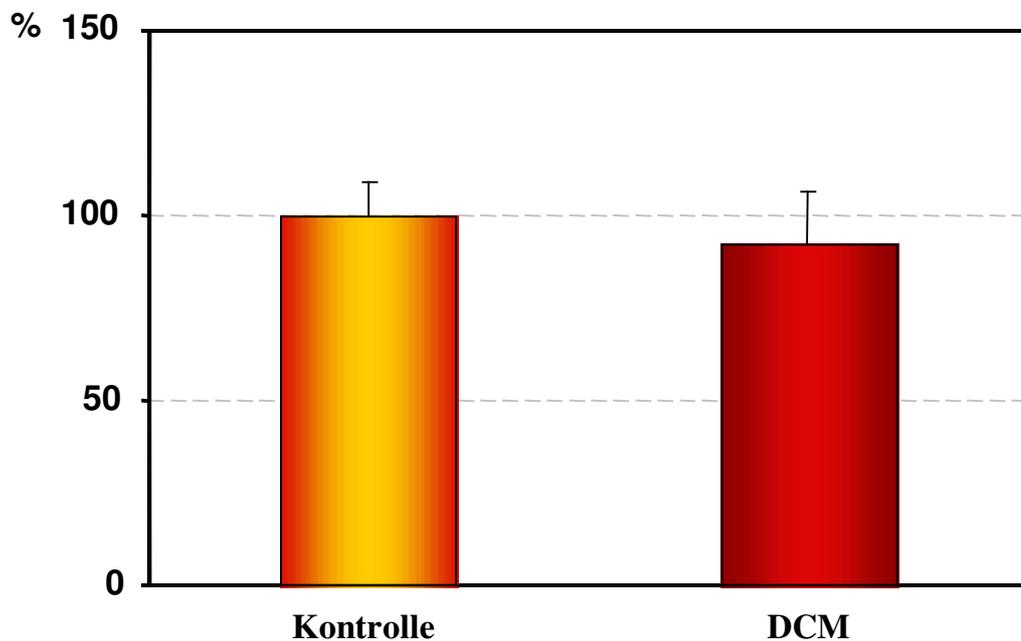


Abb. 49: Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der β -Catenin Protein Expression. Nach Subtraktion des Hintergrundes wurden die β -Catenin Signalwerte auf GAPDH normalisiert und Kontrollen und DCM statistisch miteinander verglichen. Es bestand kein signifikanter Unterschied.

10. Carp

Carp ist ein nukleärer Transkriptionsregulator, der in der HCM vermehrt exprimiert wird. Da Herzmuskelzellen im Laufe der DCM eine hypertrophe Phase durchlaufen, erschien es interessant, die Expression dieses Gens und Proteins in der DCM zu untersuchen.

10.1 Northern Blot Analyse der Carp mRNA Expression

Die Analyse der Carp mRNA Expression im Northern Blot zeigte einen statistisch signifikanten Anstieg auf 180 % in den DCM-Proben (Abbildungen 50; 51).

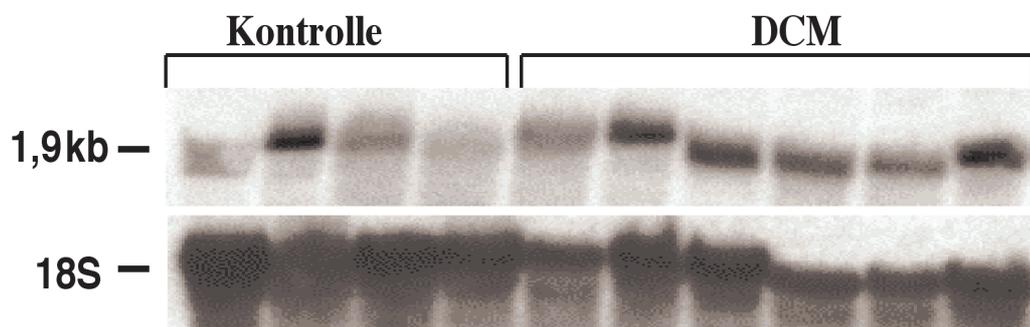


Abb. 50: Northern Blot Analyse der Carp (1,9 kb) mRNA Expression. Es wurde Gesamt-RNA aus linken Ventrikeln von Kontroll und DCM Herzen untersucht. Der Nachweis von Carp erfolgte mit einer cDNA Sonde. Als interne Kontrolle wurde mit einer 18 S Oligonukleotidsonde hybridisiert.

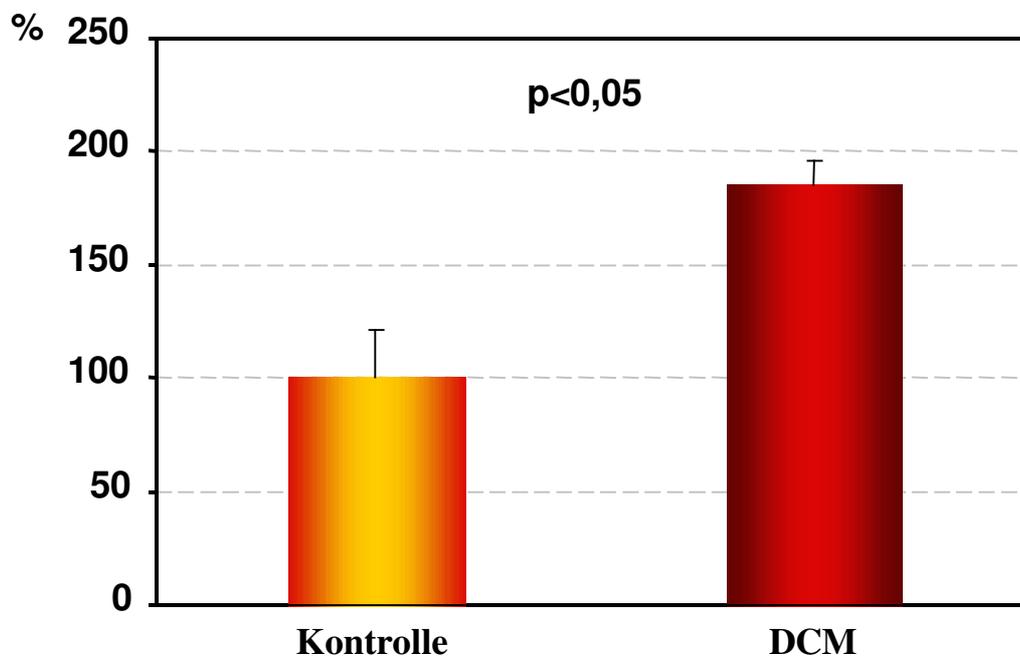


Abb. 51: Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der Carp mRNA Expression. Der statistische Vergleich der auf 18 S normalisierten Signalwerte von Kontrollen und DCM zeigte einen signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg in der DCM.

10.2 Western Blot Analyse der Carp Protein Expression

Die Analyse des korrespondierenden Proteins zeigte in der DCM einen statistisch signifikanten Anstieg auf das 2,6-fache des Kontrollwertes (Abbildungen 52; 53).

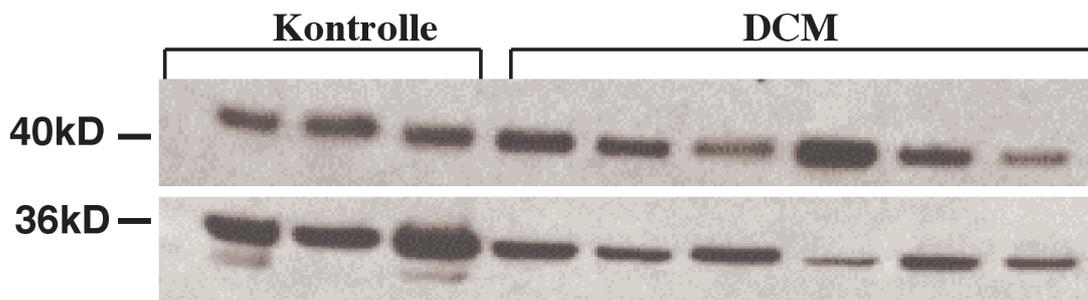


Abb. 52: Darstellung der Carp (40 kD) und GAPDH (36 kD) Protein Expression im Western Blot. Es wurde Gesamt-Protein Extrakt aus linken Ventrikelpfen von DCM- und Kontroll-Herzen untersucht. Carp wurde mittels eines polyklonalen AK, GAPDH mittels eines mAK detektiert. Durch einen HRP-konjugierten Sekundärantikörper und ECL wurde das Signal sichtbar gemacht.

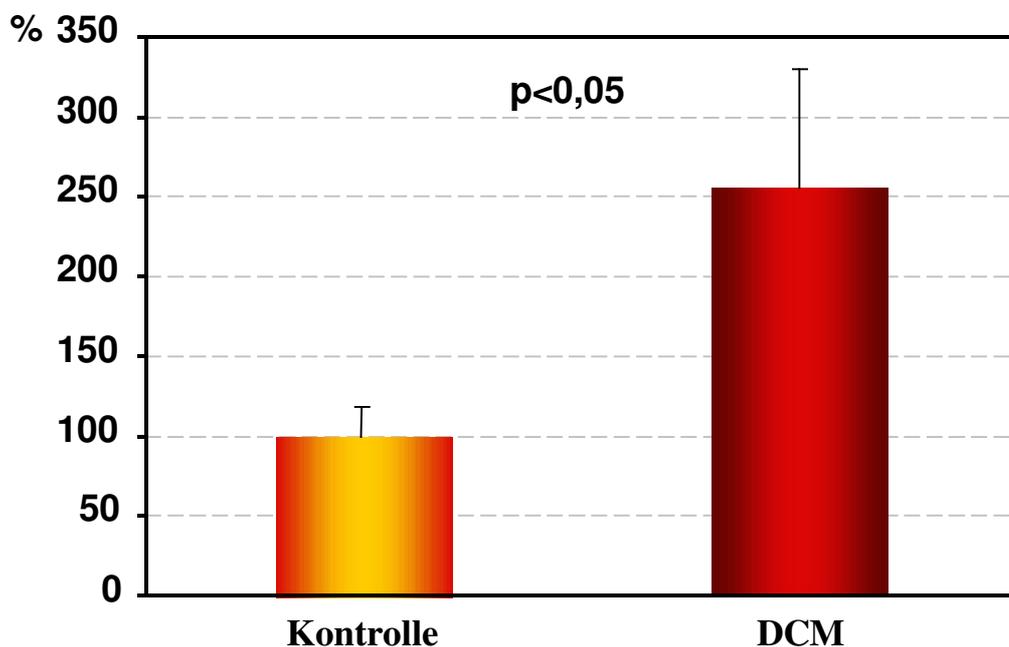


Abb. 53: Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der Carp Proteinexpression. Die Signalwerte des Carp Western Blots wurden nach Hintergrundkorrektur und Normalisierung auf GAPDH statistisch analysiert, wobei eine signifikante ($p < 0,05$) Zunahme des Proteins gezeigt wurde.

11. Cofilin 2

Cofilin 2 ist ein Aktin-depolymerisierendes Protein. Da eine Umstrukturierung der kontraktilen Proteine in der DCM stattfindet, wurde die Expression von Cofilin 2 untersucht.

11.1 Northern Blot Analyse der Cofilin 2 mRNA Expression

Die Expression der Cofilin 2 mRNA mittels Northern Blot Analyse zeigte einen statistisch signifikanten Anstieg der mRNA Produktion um das 1,7-fache in der DCM (Abbildungen 54; 55).

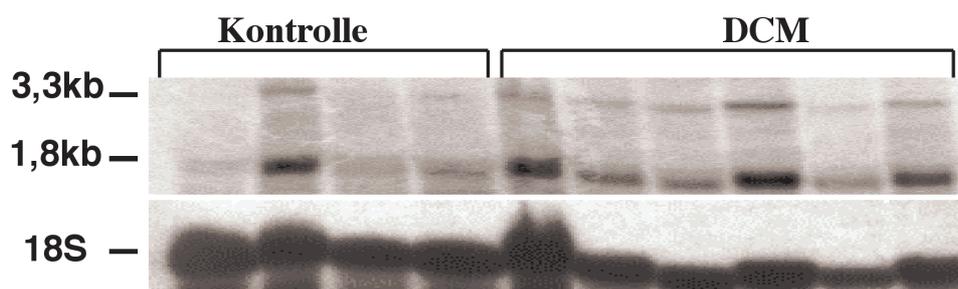


Abb. 54: Nachweis der Cofilin 2 mRNA Expression im Northern Blot. Es wurde mit einer cDNA Sonde gegen Cofilin 2 und einem 18 S Oligonukleotid hybridisiert. Cofilin 2 weist zwei Spleißvarianten bei 3,3 kb und 1,8 kb auf.

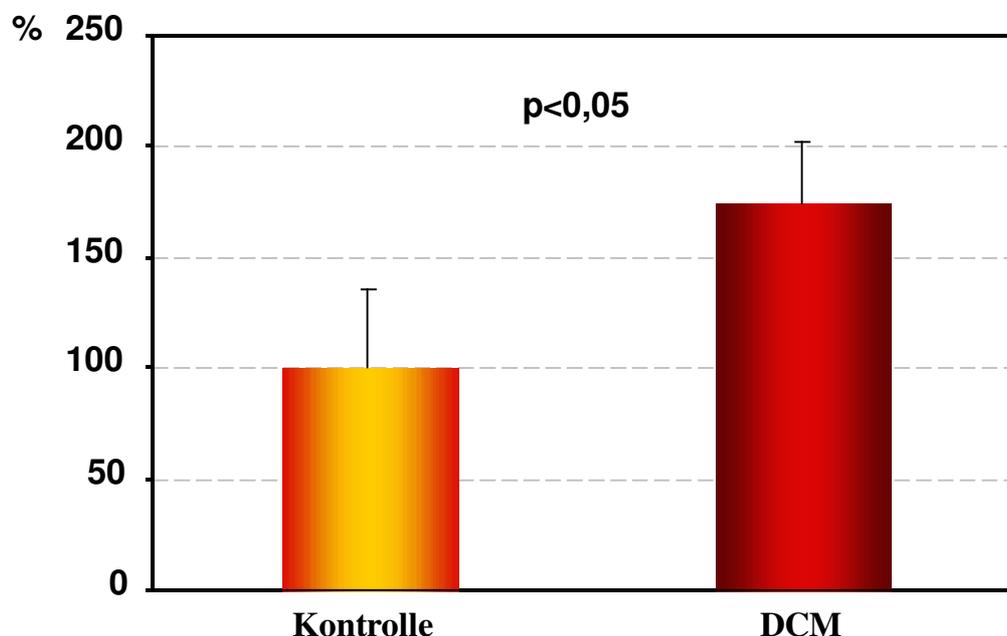


Abb. 55: Graphischen Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der relativen Cofilin 2 mRNA Expression. Es wurde jeweils der Mittelwert der Signalstärken beider Spleißvarianten untersucht. Die statistische Analyse der auf 18 S normalisierten Werte zeigte eine signifikante ($p < 0,05$) Induktion von Cofilin 2 in der DCM.

11.2 Western Blot Analyse der Cofilin 2 Protein Expression

Die Untersuchung des korrespondierenden Proteins mittels Western Blot Analyse (Abbildung 56) zeigt, dass auch das Protein in der DCM statistisch signifikant, 1,8-fach vermehrt vorliegt (Abbildung 57).

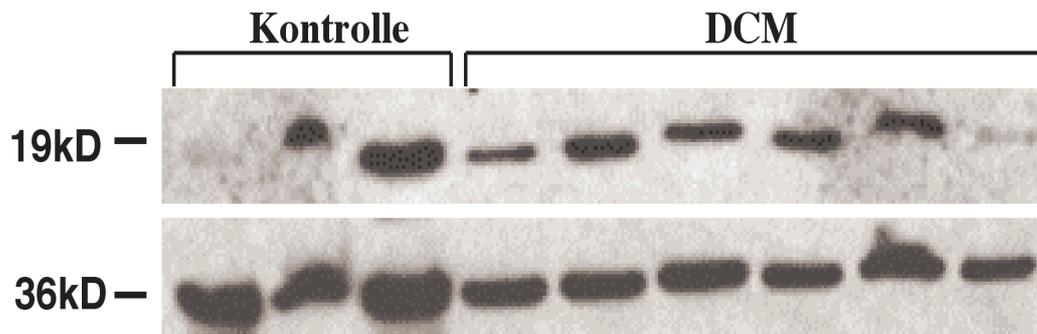


Abb. 56: Darstellung der Cofilin 2 (19 kD) und GAPDH (36 kD) Protein Expression im Western Blot. Cofilin 2 und GAPDH wurden mittels mAKs detektiert. Durch einen HRP-konjugierten Sekundärantikörper und ECL wurde das Signal sichtbar gemacht.

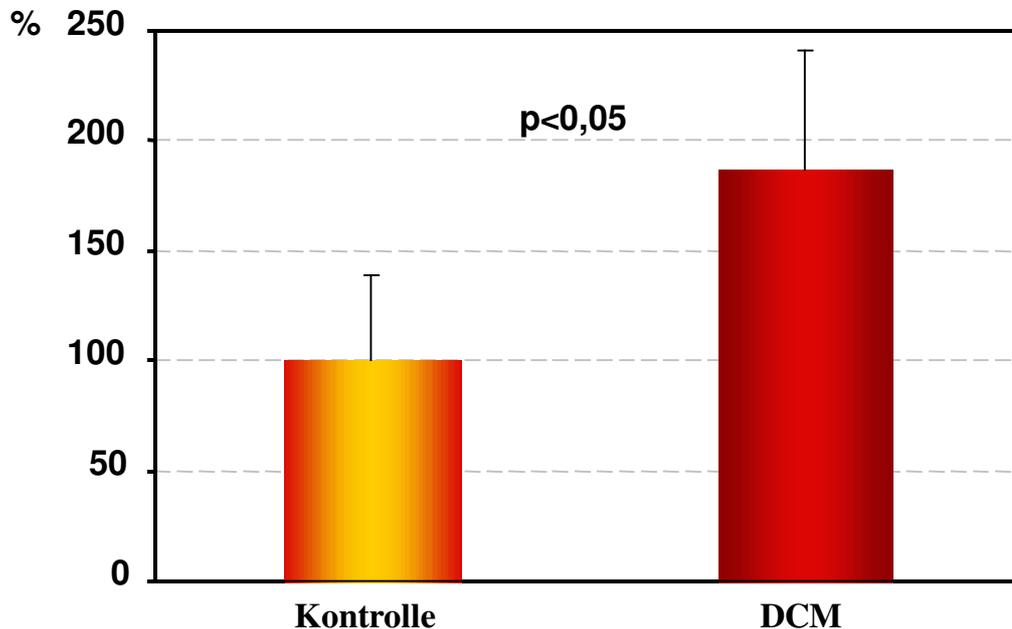


Abb. 57: Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der Cofilin 2 Proteinexpression. Die Signalwerte des Western Blots wurden nach Hintergrundkorrektur und Normalisierung auf GAPDH statistisch analysiert, wobei ein signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg gezeigt wurde.

12. Zusammenfassung der Ergebnisse

Insgesamt konnten durch die Array Analyse 22 Gene identifiziert werden, die in der DCM eine differentielle Expression aufweisen. Zur Bestätigung der Ergebnisse einer Array Analyse wird die Untersuchung der korrespondierenden Proteine empfohlen [Freeman et al., 2000]. Die Veränderung von 4 Genen (ANF, Fibronectin, Kollagen I, Annexin VI) wurde bereits in früheren Studien beschrieben, so dass hier auf eine weitere Untersuchung verzichtet wurde. Für 5 Proteine standen Antikörper zur Verfügung. Integrin β , Annexin I, Id3 und Plakoglobin wiesen eine übereinstimmende Expressionsänderung von mRNA und Protein auf. N-Cadherin zeigte dahingegen eine erhöhte mRNA Expression bei stabilem Proteingehalt, weshalb die Ergebnisse der Array und Western Blot Analyse durch Northern Blot und Immunokonfokalanalyse bestätigt wurden.

Weiterhin wurde die Expression von α - und β -Catenin untersucht, da so weitere Erkenntnisse über die Umstrukturierung der Glanzstreifen gewonnen werden konnten. Auf Grund ihrer Funktion und Regulation wurde Carp und Cofilin 2 eine mögliche Bedeutung in der DCM zugesprochen. Der Nachweis der differentiellen Expression dieser Gene und ihrer Proteine in Northern und Western Blot Analyse bestätigte diese Vermutung. Mit der Detektion der Expression von Zyxin in den untersuchten Proben im Northern Blot wurde die unterschiedliche Nachweissensitivität von Array und Northern Blot Analyse belegt. Der Nachweis der differentiellen Expression von Desmin im Northern Blot zeigt, dass einige positive Gene bei der Array Analyse ausgeschlossen wurden und lässt vermuten, dass keine falsch positiven Ergebnisse erzielt wurden.

Tab. 13: Übersicht der Ergebnisse

Gen/Protein	Array Analyse	Northern Blot	Western Blot
atrialer natriuretischer Faktor (ANF)	nur DCM	[Saito et al., 1987]	[Saito et al., 1987]
FABP4	nur DCM	—	*
N-Cadherin	340 %	230 %	nicht differentiell, bestätigt in QIA
Integrin β 1	330 %	—	200 %
Thymosin β 4	310 %	—	*
Fibronektin	290 %	[Heling et al., 2000]	[Heling et al., 2000]
Annexin I	260 %	—	400 %
Kollagen I	250 %	[Bishop et al., 1990]	[Bishop et al., 1990]
Desmin	Ausschluss	240 %	[Heling et al., 2000]
Helix-loop-helix-protein Id3	224 %	—	160 %
N-Acetylglucosamine-6-sulfatase	200 %	—	*
Carp	—	180 %	255 %
Cofilin	—	170 %	180 %
Zyxin	nicht detektiert	nicht differentiell	*
a-Catenin	—	nicht differentiell	nicht differentiell
b-Catenin	—	nicht differentiell	nicht differentiell
GAPDH	—	nicht differentiell	nicht differentiell
Annexin VI	50 %	[Song et al., 1998]	[Song et al., 1998]
MLC2	50 %	—	*
Tyrosinekinase 1	36 %	—	*
T-Zell spezifisches Rantes Protein	33 %	—	*
NF-ATc	32 %	—	*
Kallistatin	30 %	—	*
S100 Kalzium bindendes Protein A1	29 %	—	*
PLA2R	24 %	—	*
Plakoglobin	16 %	—	56 %
Neuronaler Acetylcholinrezeptor	nur Kontrolle	—	*
TERT	nur Kontrolle	—	*
LFA-1 α	nur Kontrolle	—	*

QIA: Quantitative Immunokonfokalanalyse; * kein Antikörper; - nicht untersucht (siehe 12.);
[]: Literaturangabe

V. DISKUSSION

1. Diskussion der Methoden

1.1 Wahl des Untersuchungsmaterials

In dieser Arbeit wurden Proben aus der freien linken Ventrikelwand menschlicher Herzen untersucht. Alternativ zu humanen Proben werden die Grundlagen der DCM an Tiermodellen dieser Krankheit untersucht. Diese Tiere zeigen durch eine natürliche Mutation [Nigro et al., 1997] oder gezielte Manipulation [Arber et al., 1997; Wang und Gerdes, 1999] Symptome, die denen der humanen DCM gleichen.

Der große Vorteil solcher Untersuchungen im Vergleich zu Studien an menschlichen Proben ist die hohe Homogenität des Untersuchungsmaterials. Studien an Tiermodellen sind essentiell für Funktionsanalysen einzelner Gene, für das Studium von Signalwegen und für die Suche nach neuen Therapien [Nicol et al., 2000; Schönberger und Seidman, 2001]. Die Verwendung von Tiermodellen gibt jedoch nur begrenzt Aufschluss über die Verhältnisse in der humanen DCM. So entwickeln Mäuse mit einem δ -Sarcoglycan-Defekt einen Spasmus in der Koronararterie, in dessen Folge Ischämie und DCM auftreten [Coral-Vazquez et al., 1999]. Diese Mäuse zeigen durch Behandlung mit dem Kalzium-Kanal-Antagonisten Verapamil eine Verbesserung der Herzfunktion [Cohn et al., 2001]. Die humane δ -Sarcoglycan-Mutation verursacht jedoch eine DCM ohne Beteiligung der Koronararterie und ohne Ischämie, so dass von unterschiedlichen Pathomechanismen ausgegangen werden muss [Tsubata et al., 2000]. Die bei Mäusen erfolgreiche Therapie hätte beim Menschen vermutlich keinen Effekt.

Ein weiterer Nachteil dieser Modelle ist der Einfluss der Manipulation. So konnte gezeigt werden, dass die transgene Expression des grün fluoreszierenden Proteins GFP, welches als Proteinmarker verwendet wird und inert sein sollte, eine DCM auslösen kann [Huang et al., 2000].

Zellkulturuntersuchungen an Herzmuskelzellen können zum einen zur Analyse einzelner Genfunktionen, aber auch zum Studium der Wirkung bestimmter Einflüsse, wie zum Beispiel Dehnung der Zellen [Zhuang et al., 2000] oder Sauerstoffmangel [Jiang et al., 2001], dienen. Auch hier besteht der Vorteil mit sehr homogenem Untersuchungsmaterial unter kontrollierten und klar definierten Bedingungen arbeiten zu können. Eine komplexe Analyse der genetischen Veränderung in der DCM ist mit dieser Methode nicht möglich.

Ein Nachteil von Untersuchungen an humanen Proben im Vergleich zu Zellkulturstudien und Tiermodellen ist die limitierte Anzahl und Menge des verfügbaren Probenmaterials. Dies gilt

insbesondere für gesunde Herzen zur Kontrolle. Ein weiterer Nachteil ist die mangelnde Homogenität des Untersuchungsmaterials [Barrans et al., 2002]. Dennoch ist die Analyse von humanen Proben unabdingbar für die Erforschung der DCM, da sie die authentischsten Bedingungen bietet.

Innerhalb der DCM-Gruppe gelang es eine Auswahl zu treffen, die nur Männer zwischen 40 und 61 Jahren enthielt, so dass hier keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Genexpression vorliegen und der Einfluss des Alters gering ist. Ein Einfluss der unterschiedlichen Präparationen bei den Kontrollen, die aus erworbener und selbst isolierter RNA bestand, kann ausgeschlossen werden, da die erworbenen Proben hinsichtlich ihrer Reinheit und Integrität mit den eigenen Isolaten verglichen wurden, ohne dass ein Unterschied sichtbar wurde. Dennoch bestehen bei nicht verwandten Individuen grundsätzlich hohe individuelle Varianzen in der Genexpression, die durch unterschiedliche Lebensgewohnheiten, Krankheitsverläufe und Prämedikationen noch verstärkt werden [Barrans et al., 2002].

In der Kontrollgruppe wurde auf Grund mangelnder Proben eine gemischtgeschlechtliche Konstellation verschiedener Nationalitäten und ein Altersunterschied zur DCM-Gruppe in Kauf genommen. Bei den Kontrollen besteht jedoch keine Gefahr, individuelle Varianzen mit krankheitsbedingten Veränderungen zu verwechseln.

Durch das Mischen der Proben für die Array Analyse wurden diese Schwankungen ausgeglichen. In den Northern und Western Blot Analysen der einzelnen Proben wurde durch eine statistische Überprüfung sichergestellt, dass Unterschiede signifikant auf der Erkrankung und nicht auf individuellen Varianzen beruhen. Die Tatsache, dass einige Gene trotz individueller Einflüsse eine homogene Änderung zeigen, wird dahingehend interpretiert, dass diese Veränderungen von fundamentaler Bedeutung für die Entwicklung und Progression der DCM sind [Yang et al., 2000].

1.2 Array Analyse

Die (idiopathische) DCM stellt auf molekularer Ebene der Endpunkt vieler Prozesse dar, die das Wachstum, das Überleben und den Tod von Herzmuskelzellen steuern [Hoshijima und Kenneth, 2002]. Die Expressionsanalyse ist daher essentiell für die Aufschlüsselung dieser Prozesse [Towbin, 1998] sowie für die Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Ansätze [Osterziel et al., 2001]. Mit Methoden wie Northern Blot, RNase protection assay und RT-PCR konnten lange Zeit nur einzelne Gene untersucht werden [Freeman et al., 2000]. Dabei konzentrierten sich die Studien auf Gene, denen eine besondere Rolle in der Aufrechterhaltung

der Herzfunktion zugesprochen wurde, beispielsweise die Proteine des kontraktilen Apparates [Coumans et al., 1997] oder des Zytoskeletts und der EM [Heling et al., 2000]. Mit Northern und Western Blot Analysen wurden in dieser Arbeit ebenfalls die Expressionen einiger Gene (Zyxin, Carp, Cofilin 2), die auf Grund anderer Forschungsergebnisse als möglicherweise von Bedeutung für die DCM erschienen, untersucht.

Mit der Entwicklung der Gen Arrays wurde es möglich, ein molekulares Porträt des versagenden Herzens zu erstellen, und somit auch komplexe Veränderungen von Gengruppen zu erkennen [Cook und Rosenzweig, 2002]. Weiterhin können mit dieser Technik auch Gene detektiert werden, denen nach dem bisherigen Kenntnisstand keine Bedeutung in der Funktion des Herzens zukommt [Barrans et al., 2002]. So konnten in dieser Arbeit simultan Veränderungen in Genen, die zum Beispiel am Remodeling, der Kalziumhomöostase oder der Inflammation beteiligt sind, erkannt werden. Weiterhin wurden differentiell exprimierte Gene, wie das Helix-loop-helix-protein Id3 oder TERT identifiziert, denen man bis dato keine Bedeutung in der DCM zugesprochen hatte.

Alternativ zu den hier eingesetzten Makroarrays, die zirka 1000 Gene analysieren, können mit Mikroarrays zehntausende Gene untersucht und mit Techniken wie Differential Display, SAGE oder TOGA unbekannte Gene und ESTs (expressed gene tags) detektiert werden. Diese Techniken eigneten sich auf Grund des hohen Kosten- und Zeitaufwands nicht für diese Arbeit [Freeman et al., 2000].

1.3 Durchführung und Auswertung der Array Analyse

Die Array Analyse wurde mit gepoolter Gesamt RNA der Kontrollen beziehungsweise der Patienten durchgeführt. Die gemischten Proben wurden markiert und mit jeweils einem Filter hybridisiert. Dadurch mussten nur zwei Filter verglichen werden, wodurch die Interassay-Varianzen so gering wie möglich gehalten und individuelle Expressionsschwankungen eliminiert wurden.

Bei der Analyse der Arrays zeigte sich eine gleichmäßige Hybridisierung der Filter, was dafür spricht, dass die Versuchsbedingungen sehr homogen waren. Die Reinheit der verwendeten RNA wurde durch die Abwesenheit von Signalen an den Negativkontrollen und deutlichen Signalen an den Positivkontrollen belegt. Bei den Cardiovascular Arrays, die pro Gen zwei Signale aufweisen, bestand in allen Fällen eine mindestens 80 % Homologie der Signalstärken, so dass kein Gen auf Grund dieses Kriteriums von der Auswertung ausgeschlossen werden musste. Dies ist ein Zeichen

für die hohe Spezifität der Hybridisierung, die auf die Verwendung genspezifischer Primer bei der reversen Transkription der RNA zurückzuführen ist.

Um Unterschiede in der Transkriptions-, Markierungs- oder Hybridisierungseffizienz auszugleichen, ist es notwendig, die Expression der untersuchten Gene zu normalisieren. Eine Möglichkeit dazu ist der Vergleich mit einem sogenannten Haushaltsgen, welches normalerweise in allen Zellen gleichmäßig exprimiert wird. Da die Expression einiger "klassischer" Haushaltsgene, wie Ubiquitin und β -Aktin in der DCM geändert ist [Yang et al., 2000], wurden die Gene in der Array Analyse auf den Median aller Signale eines Filters normalisiert. Diese Normalisierung wird bei der Array Analyse empfohlen, da in der Regel nur ein geringer Prozentsatz der Gene differentiell exprimiert wird und bei einer großen Anzahl Gene im Mittel eine gleichmäßige Expression zu erwarten ist [Hoheisel et al., 2001].

Bei der Auswertung von Arrays gibt es verschiedene Ansätze: Man kann versuchen eine maximale Anzahl der gespotteten Gene auszuwerten, um auch gering exprimierte Gene, die nur schwache Signale ergeben oder Gene, die eine schwach differentielle Expression aufweisen, zu erfassen. Bei diesem Verfahren werden jedoch auf Grund der limitierten Sensitivität des Arrays auch falsch positive Resultate erzielt [Freeman et al., 2000]. Alternativ kann man stringente Auswertungskriterien angelegen, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Dieser Ansatz wurde bei der vorliegenden Arbeit gewählt. Der Grenzwert, ab dem ein Gen als differentiell exprimiert galt, wurde bei einem zweifachen Unterschied zwischen Kontrolle und DCM gesetzt. Die Sensitivität mit der radioaktiv markierte Arrays zuverlässig eine Änderung in der Genexpression detektieren können, liegt im Durchschnitt bei einer 1,5-fachen Varianz [Hoheisel et al., 2001]. Mit dem hier gewählten Grenzwert besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, nur korrekt positive Gene zu identifizieren. Auch bei den weiteren Kriterien (Verhältnis Signalintensität Hintergrund/Gen, Homologie der Duplikate, Differenz Kontrolle-DCM) wurden hohe Grenzwerte definiert.

Stringente Kriterien bedingen, dass einige differentiell exprimierte Gene von der Auswertung ausgeschlossen werden [Yang et al., 2000]. Dies wurde in dieser Arbeit am Beispiel Desmin gezeigt. Desmin wird in der DCM bekanntermaßen vermehrt exprimiert [Heling et al., 2000]. In der Array Analyse musste es von der Auswertung ausgeschlossen werden, da die Signale die Grenzwertkriterien nicht erfüllten. Eine Überprüfung dieses Gens im Northern Blot zeigte dahingegen die zu erwartende differentielle Expression. Das zeigt, dass von den im Array

untersuchten Genen nicht alle differentiell exprimierten identifiziert wurden. Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, wurde dies jedoch bewusst in Kauf genommen.

1.4 Ergebnisse der Array Analyse

Insgesamt konnte die differentielle Expression von 22 Genen im Array nachgewiesen werden, von denen die meisten bisher noch nicht im Zusammenhang mit der DCM analysiert worden waren. Es konnten neue Aspekte in der Pathophysiologie dieser Krankheit erkannt werden. So wurden zuvor Mutationen [Olson et al., 1998; Kamisago et al., 2000] sowie eine Reduktion kontraktiler Elemente in der DCM beschrieben [Hein et al., 2000]. Der Nachweis einer erhöhten Expression Aktin-depolymerisierender Gene/Proteine (Thymosin β 4 und Cofilin 2) zeigt einen bisher unbekanntem Weg, der zu einer Schwächung der kontraktilen Funktion in der DCM führen könnte.

Die Detektion bekannter „Markergene“ sowie die Übereinstimmung der Arraydaten mit den durchgeführten Northern und Western Blot Analysen und der Vergleich der hier gefundenen Ergebnisse mit der Literatur sprechen dafür, dass die so ermittelten Ergebnisse aussagekräftig sind.

1.5 Detektionssensitivität der Array Analyse

Es konnten 42 % der Gene des AtlasTM Human Cardiovascular Arrays und 25 % der Gene des 1.2 Array detektiert werden. Diese Diskrepanz erklärt sich mit der Auswahl der gespotteten Gene. Der Cardiovascular Array enthält ausschließlich Gene, deren Vorkommen im kardiovaskulären System, das zirka 2/3 aller menschlichen Gene exprimiert [Dempsey et al., 2001], nachgewiesen ist. Der 1.2 Array beinhaltet eine breite Mischung an Genen. Die Tatsache, dass 2 % der mittels AtlasTM Human Cardiovascular Array untersuchten Gene eine differentielle Expression aufwies, jedoch nur 1% der Gene des AtlasTM Human 1.2 Arrays, lässt sich ebenfalls mit der Auswahl der auf den Filtern gespotteten Gene erklären. Die durchschnittliche Rate differentiell exprimierter Gene von 1,5 % deckt sich mit anderen Studienergebnissen [Hoheisel et al., 2001; Friddle et al., 2000].

Die fehlende Detektion eines Gens im Array erlaubt keine Aussage über dessen Expression im Herzen, da die Array Analyse ein semiquantitatives Verfahren darstellt. Sie detektiert relative, nicht absolute, Veränderungen in der Genexpression, da die Effizienz der reversen Transkription sowie der Hybridisierung zwischen den Genen stark schwankt [Freeman et al., 2000]. Dies erklärt

die unterschiedliche Sensitivität von Northern Blot Analyse, bei der die RNA im Nativzustand untersucht wird, und Array Analyse, bei der sie zuvor in cDNA umgeschrieben wird. In dieser Arbeit konnte dieser Unterschied am Beispiel Zyxin gezeigt werden. Zyxin ist ein Adhäsionsprotein, welches im Herzen exprimiert wird, im Array jedoch nicht nachweisbar war. Die Northern Blot Analyse dieses Gens zeigte dahingegen eine stabile Expression in allen Proben. Eine unterschiedliche Sensitivität dieser Techniken beobachteten auch Yang et al. [Yang et al., 2000], die in einer Mikroarraystudie die mRNA des L-Typ-Kalzium-Kanals sowie des Natrium/Kalziumaustauschers nicht nachweisen konnten. Beide mRNAs waren jedoch in Northern Blot Analysen der gleichen RNA-Proben detektierbar.

1.6 Weiterführende Untersuchungen

Da eine statistische Analyse eines binären Experiments nicht möglich ist, ist es notwendig, die Ergebnisse einer Array Analyse durch andere Methoden zu verifizieren. Dazu wird die Analyse der Proteinexpression empfohlen, da die Proteine für die Pathogenese einer Krankheit meistens eine größere Rolle spielen als die RNA und Veränderungen im Transkriptionsniveau nicht immer auf die Translationsebene übertragen werden [Freeman et al., 2000].

Es konnte nur ein Teil der korrespondierenden Proteine der mittels Array Analyse identifizierten Gene untersucht werden, da nicht für alle Proteine geeignete Antikörper zur Verfügung standen. Auf eine weitergehende Untersuchung einiger Gene wurde verzichtet, da ihre differentielle Expression bereits in der Literatur beschrieben ist.

Soweit die Ergebnisse der Array Analyse mit der Western Blot Untersuchung übereinstimmten, wurde auf eine Bestätigung der differentiellen mRNA Expression im Northern Blot verzichtet. Im Fall von N-Cadherin ergaben sich jedoch widersprüchliche Resultate, so dass mRNA und Protein Expression mit weiteren Methoden (Northern Blot und quantitative Immunokonfokalanalyse) untersucht wurden.

Die Funktion eines Proteins wird nicht nur von seiner Menge sondern auch durch seine subzelluläre Lokalisation und posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung, beeinflusst. Nachfolgende Untersuchungen können durch immunhistochemische sowie durch „gain-or-loss-of function“-Studien in transgenen Mäusen oder in der Zellkultur weitere Erkenntnisse über die Bedeutung der hier identifizierten differentiell exprimierten Gene und Proteine in der DCM geben. Zum Teil konnte bei der Interpretation der Befunde auf die

Ergebnisse anderer Studien, die solche Analysen an den hier identifizierten Genen beschreiben, zurückgegriffen werden.

1.7 Normalisierung der Northern und Western Blot Analysen

Um den Einfluss geringfügiger Schwankungen in den Versuchsbedingungen auszugleichen, ist es auch bei Northern und Western Blot Analysen notwendig, die Signalwerte zu normalisieren.

In den Northern Blot Analysen wurde auf die 18S rRNA normalisiert, da die ribosomale RNA auf einem konstanten Level exprimiert wird [Deindl, 2001]. Ein Vergleich der Ethidiumbromidfärbung von 18S im Agarosegel mit dem 18S Hybridisierungssignal stellte sicher, dass ein gleichmäßiger Transfer dieser RNA stattgefunden hatte.

Western Blots werden häufig auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert. Bei verschiedenen Erkrankungen wird GAPDH jedoch differentiell exprimiert [Zhong und Simons, 1999; Suzuki et al., 2000]. Eine Analyse der GAPDH mRNA Expression im Northern Blot und der Proteinexpression im Western Blot, der auf Ponceau S normalisiert wurde, zeigte, dass GAPDH in der DCM stabil exprimiert wird und dass es somit als interner Standard in der DCM geeignet ist.

2. Differentiell exprimierte Gene

Die in dieser Arbeit mittels Array, Northern, Western und Immunokonfokalanalyse untersuchten Gene/Proteine gehören verschiedenen funktionellen Gruppen an. In Abbildung 58 sind einige der in dieser Arbeit analysierten Gene dargestellt. Die mögliche Bedeutung der jeweiligen Expressionsänderungen für die (patho)physiologischen Prozesse in der DCM wird im Folgenden besprochen werden.

3. Remodeling

Ein wesentlicher Prozess in der Progression der DCM ist das sogenannte Remodeling. Dieser Begriff beschreibt alle Umbauprozesse des Myokards, die zu der veränderten Herzform, -größe und -funktion führen. Die Umstrukturierung der strukturellen Proteine wird durch biomechanischen Stress, zytoskeletäre oder kontraktile Defizite ausgelöst [Cohn et al., 2000]. Das Remodeling der extrazellulären Matrix ist vermutlich auf den Verlust von Kardiomyozyten zurückzuführen [Hein und Schaper, 1996b]. In dieser Untersuchung konnten viele Gene/Proteine detektiert werden, deren differentielle Expressionen zum Teil neue Aspekte dieser

Umbauprozesse darstellen und die damit zur eingeschränkten Herzfunktion und der Progression des Herzversagens beitragen können.

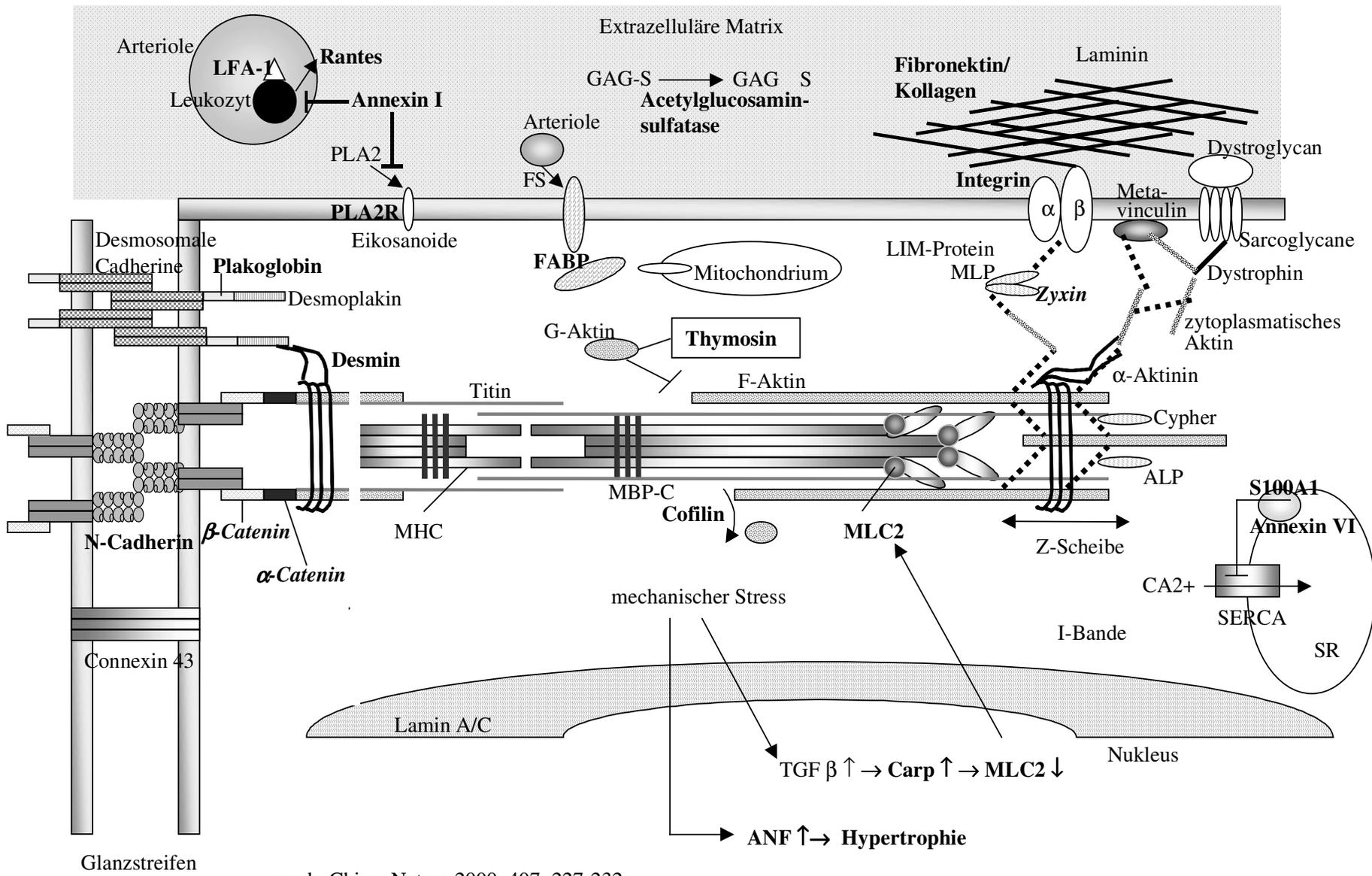
3.1 Remodeling der extrazellulären Matrix

Die Moleküle der extrazellulären Matrix (EM) werden von Fibroblasten sekretiert und sind in zwei Klassen eingeteilt: Die Glycosaminoglycane, die eine stark hydrierte gelartige Substanz bilden, und die fibrösen Proteine, die in diese Substanz eingebettet sind. Die fibrösen Proteine bilden zwei funktionelle Gruppen: Die strukturellen Proteine wie Kollagen und Elastin verstärken die Matrix, wohingegen die Proteine mit vorwiegend adhäsiver Funktion wie Fibronectin und Laminin die EM an der Basallamina verankern. Alle fibrösen Proteine binden an jeweils spezifische Integrinrezeptoren [Alberts et al., 1994] (siehe Abbildung 58 und Kapitel II, 2.1;2.2).

3.1.1 Vermehrte Expression von N-Acetylglucosamine-6-sulfatase mRNA

Sulfatiertes Acetylglucosamin oder Acetylgalactosamin sind, neben Uronsäure, Bausteine der Glycosaminglycane (GAGs), die meist an Proteine gekoppelt sind und dann als Proteoglycane bezeichnet werden. Die Sulfatierung bedingt eine stark negative Ladung der GAGs und Proteoglycane, die zu einer Hydratanlagerung führt. Dadurch wird ein Turgor aufgebaut, der für die Elastizität der EM verantwortlich ist und die kompressiven Kräfte abpuffert [Alberts et al., 1994]. Die N-Acetylglucosamine-sulfatase, die die Abspaltung der Sulfatgruppe katalysiert, wurde bisher vor allem im Zusammenhang mit dem Sanfilippo-Syndrom D (Mukopolysaccharid-Speicherkrankheit Typ III D) beschrieben. Dabei liegt ein Defekt der Sulfatase vor, der dazu führt, dass Heparansulfat (ein Proteoglycan) nicht desulfatiert und dadurch nicht abgebaut werden kann. Durch die Anhäufung dieses Moleküls kommt es vor allem zu neuronalen Ausfällen [Kress et al., 1980].

In der DCM wird die N-Acetylglucosamine-6-sulfatase mRNA 2-fach vermehrt gebildet. Eine erhöhte Desulfatierung von GAGs und der damit verbundene Verlust negativer Ladungen könnte zu einem Turgorverlust der Kardiomyozyten und somit zu einer verminderten Druckresistenz der Zellen führen. Interessanterweise wird die 6-Sulfatase des zweiten GAG-Zuckers N-Acetylgalactosamin in der DCM vermindert exprimiert [Barrans et al., 2002]. Über die Funktion der beiden Enzyme in der EM des Herzens liegen jedoch zu wenig Erkenntnisse vor, um über mögliche Wechselwirkungen dieser Expressionsänderungen zu spekulieren.



nach Chien, Nature 2000, 407; 227-232

Abb. 58: Darstellung der Kardiomyozyte. fett: in dieser Arbeit untersuchte Gene/ Proteine; fett, kursiv: nicht differentiell

3.1.2 Vermehrte Expression von Kollagen und Fibronectin

Ein charakteristisches Merkmal des Remodelings ist die Fibrotisierung der EM durch eine Überexpression und Disorganisation fibröser Proteine [Heling et al., 2000]. Die vermehrte Expression von zwei dieser Proteine konnte in der Array Analyse detektiert werden.

3.1.2.1 Erhöhte Expression von Kollagen mRNA

Kollagene sind strukturelle Proteine, die nach ihrer Sekretion durch Fibroblasten zu Strängen polymerisieren. Sie bilden eine Matrix, die die Zelle widerstandsfähig gegen Zugkräfte macht und zum Erhalt der Kammergeometrie sowie dem Zusammenhalt der Kardiomyozyten beiträgt. Die Zelle organisiert die Anordnung und Struktur dieser Matrix je nach ihrer Belastung [Alberts et al., 1994]. In der DCM treten Veränderungen in der Zusammensetzung und der Struktur der Kollagene auf, die auf die Aktivierung von Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) zurückzuführen ist [Spinale et al., 2000]. Wahrscheinlich wird Kollagen durch MMPs vermehrt abgebaut, wodurch eine reaktive Überproduktion von schlecht vernetztem Kollagen induziert wird. Dies führt zu einer Schwächung und Dilatation der Ventrikelwand [Gunja-Smith et al., 1996] und trägt zur erhöhten Steifigkeit, die die Herzfunktion einschränkt, bei [Bishop et al., 1990]. In den Array Analysen zeigte sich eine 2,5-fache Erhöhung der Kollagen I Produktion, die sich mit anderen Studien deckt [Bishop et al., 1990; Barrans et al., 2002].

3.1.2.2 Erhöhte Fibronectin mRNA Expression

Fibronectin ist ein adhäsives Protein der EM. Es wird ebenso wie die anderen Komponenten der EM in der DCM vermehrt exprimiert und trägt zum Elastizitätsverlust bei [Heling et al., 2000; Barrans et al., 2002]. Die im Array nachgewiesene 2,9-fach erhöhte Expression in den DCM Proben korreliert mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen [Heling et al., 2000; Barrans et al., 2002]. Sie steht vermutlich in engem Zusammenhang mit der erhöhten Integrin β Expression, die in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte (siehe 3.2). Yamada et al. konnten zeigen, dass die in der DCM vermehrt exprimierten MMPs über den Integrin β Rezeptor die Expression von Fibronectin induzieren können [Yamada und Miyamoto, 1995; Spinale et al., 2000].

3.2 Vermehrte Expression von Integrin β 1 mRNA und Protein

Integrine sind eine große Familie transmembranärer Rezeptoren. Sie bilden Heterodimere aus jeweils einer α und einer β Untereinheit. Während die β 2 Integrine vor allem Zell-Zellverbindungen vermitteln, stellen die β 1 Integrine überwiegend Zell-Matrix-Verbindungen her,

die von ihrem jeweiligen α -Partner abhängen. $\alpha 5\beta 1$ ist der Fibronectin Rezeptor, $\alpha 7\beta 1$ der Lamininrezeptor und $\alpha 1\beta 1$ sowie $\alpha 2\beta 1$ der Kollagenrezeptor [Alberts et al., 1994]. Durch Verknüpfung von Integrinen mit zytoskeletären Proteinen wie Talin, Vinkulin und α -Aktinin entstehen Komplexe, die eine stabile Verknüpfung mit der EM ermöglichen (Abbildung 58). Desweiteren regulieren sie die zytoskeletäre Organisation [Yamada und Miyamoto, 1995] und vermitteln Signale über die Zellmembran durch Aktivierung von beispielsweise ERK1/2 und p38 [Blaschke et al., 2002]. Dadurch fungieren sie als Transmitter von mechanischem Stress zwischen dem Zytoskelett und der EM.

In dieser Arbeit konnte eine 2,6- beziehungsweise 2-fach vermehrte Produktion von Integrin $\beta 1$ mRNA und Protein nachgewiesen werden. Über den Integrinrezeptor β kann mechanischer Stress eine erhöhte Steifigkeit des Zytoskeletts bewirken [Wang et al., 1993]. Mechanischer Stress aktiviert MMPs, die wiederum TGF- β induzieren [Mann, 2002]. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Integrin $\beta 1$ durch TGF- $\beta 1$ reguliert wird [Azuma et al., 1996]. Weiterhin führen MMPs über Integrin β und TGF- β zu einer erhöhten Fibronectin Produktion [Yamada und Miyamoto, 1995], die wiederum die Integrin β Expression induziert [Laser et al., 2000]. Ein weiterer Aktivator der Integrin $\beta 1$ Produktion ist Hypoxie, wie Zellkulturstudien zeigten [Jiang et al., 2001]. In der DCM besteht eine Hypoxie des Gewebes [Figulla et al., 1987] und es konnte eine erhöhte Expression von TGF- β [Pauschinger et al., 1999], MMPs [Spinale, 2002] und Fibronectin [Heling et al., 2000; Barrans et al., 2002] gezeigt werden.

Die Induktion von Integrin β in der DCM wird also über die Hypoxie ausgelöst und verläuft vermutlich über TGF- β , MMPs und Fibronectin. Aus den erhöhten Integrin β und Fibronectin Mengen resultieren eine vermehrte Anzahl fokaler Adhäsionen. Diese bewirken über verschiedene Signale (p38, Erk1/2) den Umbau der zytoskeletären Proteine, die in der DCM erhöht sind [Heling et al., 2000], und führen somit zu einer erhöhten Steifigkeit der Zelle [Wang et al., 1993]. Weiterhin scheint Integrin β auch die Expression von Laminin zu steuern [Aumailley et al., 2000], welches in der DCM ebenfalls vermehrt exprimiert wird [Schaper und Speiser, 1992]. Die Demonstration der erhöhten Integrin β Produktion in der DCM lässt vermuten, dass Integrin β eine Schlüsselrolle als Transmitter zwischen mechanischem Stress und dem Umbau der EM sowie des Zytoskeletts in der DCM zukommt. Abbildung 59 zeigt einen möglichen Signalweg, über den mechanischer Stress über Integrin β die Versteifung der Kardiomyozyten induzieren könnte.

Die Aktivierung dieser Signalwege als Reaktion auf mechanischen oder hypoxischen Stress führt vermutlich zu einem kompensatorischen Umbau des Myokards, der jedoch zu einer verminderten Elastizität der Herzmuskelzellen und somit zu einer eingeschränkten Herzfunktion führt [Heling et al., 2000]. Interessanterweise induziert eine partielle kardiale Inaktivierung des Integrin β 1 Gens bei Mäusen eine DCM, die mit einer fokaler Auflösung der Myofibrillen und Glanzstreifen einhergeht und zu einer Fibrose sowie einer eingeschränkten Herzfunktion führt [Shai et al., 2002]. Da der Verlust von Myofibrillen das Remodeling der Kardiomyozyten induziert [Hein und Schaper, 1996a; Hein et al., 2000], ist zu vermuten, dass die DCM bei den Mäusen auf diesem Weg ausgelöst wird. Dies unterstreicht die initial kompensatorische Funktion des aktivierten TGF- β -MMP-Integrin β Signalwegs in der DCM.

Das überexprimierte Integrin β spielt dabei nicht nur eine Rolle als Transmitter sondern kann vermutlich auch als Rezeptor kompensatorisch wirken. Dies zeigt eine Studie an Dystrophin defizienten Mäusen. Dystrophin ist, ebenso wie α 7 β 1 Integrin, ein Rezeptor für Laminin. An den Dystrophin defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass α 7 β 1 Integrin Dystrophin ersetzen kann [Burkin et al., 2001]. Eine vermehrte Expression von Integrin β 1 könnte also in der DCM den Ausfall anderer Adhäsionsmoleküle kompensieren.

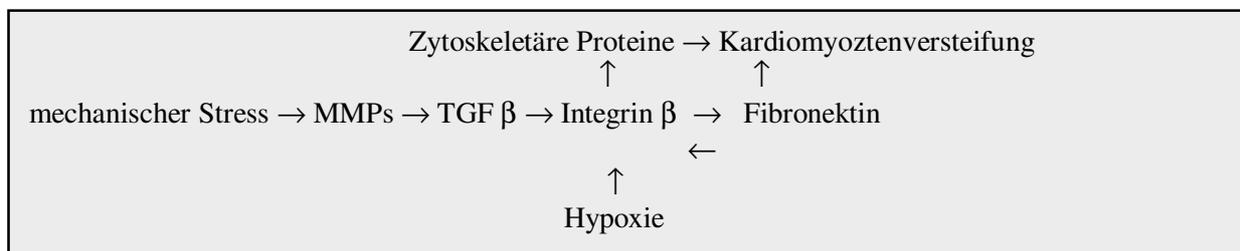


Abb. 59: Potentieller Signalweg, über den mechanischer Stress zur Versteifung der Kardiomyozyten in der DCM führt

3.3 Remodeling der Glanzstreifen

Um synchron arbeiten zu können, werden die Herzmuskelzellen an den apikalen Enden durch eine spezielle Struktur, den Glanzstreifen verbunden (siehe Abbildung 58). Die Glanzstreifen erfüllen drei Funktionen: Die Desmosomen verbinden mehrere Zellen miteinander und verankern die Intermediärfilamente (Desmin), die Adhäsionsverbindungen verknüpfen die Aktinfilamente benachbarter Zellen, und die Gap Junctions erlauben eine rasche Weiterleitung des Aktionspotentials [Alberts et al., 1994]. In der DCM findet sich eine Disorganisation der interzellulären Verbindungsproteine, sowie eine Reduktion und Umverteilung von Connexin 43, welches die Gap junctions bildet [Kostin et al., 1998] (siehe Kapitel II, 2.2).

3.3.1 Gestörte N-Cadherin Expression und Verteilung in der DCM

Die Adhäsionsverbindungen bestehen aus dem transmembranären Glykoprotein N-Cadherin (ehemals A-CAM), welches über seine C-terminale Catenin-Bindungsregion an β - oder γ -Catenin gebunden ist. Dieses wiederum ist an α -Catenin gebunden, welches den Komplex direkt oder indirekt über Vinkulin an Aktin bindet. Das extrazelluläre N-terminale Ende von N-Cadherin bildet Kalzium-abhängig homophile cis-Dimere mit N-Cadherin-Molekülen der gleichen Membran und trans-Dimere mit N-Cadherin Molekülen der gegenüberliegenden Membran, wodurch ein sogenanntes Reißverschlussmuster entsteht. Durch diese Cadherin-Catenin-Struktur werden die Aktingerüste benachbarter Zellen verbunden, wodurch eine Kraftübertragung zwischen den Zellen möglich ist [Tepass et al., 2000; Ivanov et al., 2001]. Darüberhinaus ist N-Cadherin in verschiedene Signaltransduktionswege involviert und ist notwendig für die Entwicklung der Rechts-Links-Achse im Embryo [Garcia-Castro et al., 2000] sowie für die Myofibrillen-Formation im reifenden Herzen [Linask et al., 1997; Soler und Knudsen, 1994]. Ein Knock-out dieses Gens verursacht einen letalen Herzdefekt bei der Maus [Radice et al., 1997].

Die vermehrte Expression der N-Cadherin mRNA, die im Array beobachtet und durch eine Northern Blot Analyse bestätigt wurde, steht im Gegensatz zu der unveränderten Expression des korrespondierenden Proteins, die durch Western Blot und quantitative Immunokonfokalanalysen gezeigt wurde. Dies deutet auf einen erhöhten Protein Umsatz hin, der eventuell als Gegenreaktion auf die mRNA Induktion stattfindet. Ein auffälliger Befund der Immunokonfokalanalyse ist die gestörte Verteilung von N-Cadherin, die bereits zuvor beschrieben wurde [Kostin et al., 1998]. Während N-Cadherin in normalen Kardiomyozyten vorwiegend an den Glanzstreifen lokalisiert ist, verteilt es sich in der DCM überwiegend lateral am Sarkolemma, wo es aberrante Zell-Zellkontakte vermittelt.

Eine erhöhte N-Cadherin Expression konnte ebenfalls in einem Maus-Modell der DCM gezeigt werden [Ehler et al., 2001], und eine transgene Überexpression von N-Cadherin in Mäusen kann eine DCM verursachen [Ferreira-Cornwell et al., 2002]. Die vermehrte Expression scheint also ein Teil des Pathomechanismus der DCM zu sein. Ausgelöst wird diese eventuell durch die Dilatation, da ein Dehnen von Ratten-Kardiomyozyten in der Zellkultur ebenfalls zu einer Induktion der N-Cadherin Expression führt [Zhuang et al., 2000]. Beim Menschen scheint ein erhöhter Proteinumsatz diesen Prozess auszugleichen, wobei es jedoch zu einer Desorganisation der Adhäsionsverbindungen kommt. In einem Meerschweinchen-Modell des kongestiven Herzversagens wurde ebenfalls ein stabiler N-Cadherin Gehalt beobachtet [Wang und Gerdes,

1999]. Im Gegensatz dazu beobachteten Ehler et al. im DCM Maus-Modell eine vermehrte Produktion des Proteins und eine Anhäufung anstelle einer Desorganisation von N-Cadherin [Ehler et al., 2001]. Die widersprüchlichen Befunde der N-Cadherin Protein Expression deuten auf eine komplexe Regulation der N-Cadherin Konzentration hin, die vermutlich von einer Vielzahl von Faktoren gesteuert wird, die von Spezies zu Spezies variieren könnten.

In der DCM des Menschen könnte eine gestörte Phosphorylierung von N-Cadherin zu einem erhöhten Proteinabbau führen. Die Spaltung von N-Cadherin durch membrangebundene Matrix-Metallo-Proteinasen wird durch die Balance der Serin und Tyrosin Phosphorylierung von N-Cadherin reguliert [Paradies und Grunwald, 1993; Lee et al., 1997]. In der DCM wird unter anderem die Proteinkinase C (PKC) vermehrt exprimiert [Bowling et al., 1999]. N-Cadherin steht in Wechselwirkung mit dem PKC-Rezeptor, durch den PKC nachweislich einen erhöhten Proteinabbau induzieren kann [Lee et al., 1997; Wu et al., 1996].

Das Phosphorylierungsmissverhältnis könnte ebenfalls für die gestörte N-Cadherin Verteilung verantwortlich sein, da sowohl die N-Cadherin-Dimerisierung als auch die Bindung an Catenin vom Phosphorylierungsstatus der beteiligten Proteine abhängt [Arregui et al., 2000; Anastasiadis und Reynolds, 2001; Balsamo et al., 1996]. Inwieweit diese Prozesse für die Befunde in der DCM verantwortlich sind, müsste in Zellkulturstudien überprüft werden. Die Ergebnisse der N-Cadherin Untersuchung demonstrieren die komplexen Veränderungen in der DCM und deren vielfältigen möglichen Zusammenhänge.

3.3.2 Konstitutive α - und β -Catenin mRNA und Protein Expression in der DCM

Die Expressionen von α - und β -Catenin, den weiteren Bestandteilen der Adhäsionsverbindungen, wurden mit Northern und Western Blot Analyse untersucht. Dabei zeigte sich ein stabiler Gehalt beider Catenine auf mRNA und Protein Ebene. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Umverteilung der Adhäsionsverbindungen nicht auf ein verändertes Expressionsmuster der beteiligten Proteine, sondern vermutlich auf eine gestörte Verbindung der Komponenten zurückzuführen ist.

3.3.3 Verminderte Expression von Plakoglobin mRNA und Protein

Ein weiterer Befund dieser Untersuchung, der die starke Beeinträchtigung der Glanzstreifen in der DCM zeigt, ist die stark reduzierte Expression von Plakoglobin (= γ -Catenin) auf mRNA (6-fach) und Protein (2-fach) Ebene. Plakoglobin, ein Mitglied der Armadillo-Protein Familie, ist ein Bestandteil der Desmosomen, wo es die desmosomalen Cadherine (Desmoglein und Desmocollin) mit Desmoplakin verbindet. Dieses verankert die Intermediärfilamente mit den Glanzstreifen.

Ähnlich wie N-Cadherin formen auch die desmosomalen Cadherine Dimere, die zur Ausbildung stabiler Intermediärfilament-Verbindungen von Zelle zu Zelle führt. Plakoglobin kann darüberhinaus an den Adhäsionsverbindungen β -Catenin ersetzen [Angst et al., 2000]. Die zytosolische Form von Plakoglobin ist Bestandteil des Wnt-Signalweges [Zhurinsky et al., 2000]. Studien in knock-out Mäusen zeigten, dass Plakoglobin für die korrekte Funktion der Desmosomen, insbesondere in Zellen, die starken mechanischen Belastungen ausgesetzt sind, essentiell ist. Der Verlust von Plakoglobin führte bei den Tieren zu einer reduzierten Anzahl an Desmosomen und schweren Herzfehlern, die einen embryonalen Tod verursachten [Bierkamp et al., 1996; Bierkamp et al., 1999; Ruiz et al., 1996]. Mutationen des Plakoglobingens verursachen beim Menschen die Naxos Krankheit [McKoy et al., 2000]. Die Bedeutung von Plakoglobin für den Zusammenhalt von Zellen, die, wie Herzmuskelzellen, gedehnt werden, konnte in Zellkulturen, die einem Dehnungsstress unterzogen wurden, gezeigt werden. Eine Inhibition der Plakoglobinexpression durch Antisense-Oligonukleotide führte zu einer Dissoziation dieser Zellen [Schnittler et al., 1997]. Diese Befunde unterstreichen die Bedeutung von Plakoglobin für die Funktion der Glanzstreifen im Herzen und die pathophysiologische Bedeutung, die eine verminderte Expression in der DCM vermutlich hat.

In Plakoglobin null-mutanten Mäusen konnten Bierkamp et al. an den Desmosomen eine partielle Substitution von Plakoglobin durch β -Catenin beobachten, die jedoch nicht ausreichte, um die Mäuse vor einem embryonalen Tod auf Grund von schweren Herzfehlern zu bewahren [Bierkamp et al., 1999]. Die β -Catenin Expression war in den hier untersuchten DCM Proben nicht erhöht. Dies deutet an, dass eine Substitution von Plakoglobin durch β -Catenin unwahrscheinlich ist.

Die Studien in den Mausmodellen und in der Zellkultur zeigen, dass die verminderte Plakoglobin Expression eine Schwächung der desmosomalen Verbindungen in der DCM verursacht. Dies führt zu einer verminderten Zellstabilität und eventuell sogar zu einem Verlust von Kardiomyozyten. Da die Mutation von Plakoglobin in der Naxos Krankheit im linken Ventrikel zum Absterben von Kardiomyozyten mit folgender Ersatzfibrose führt, ähnlich wie in der DCM, ist es denkbar, dass in beiden Krankheiten ein vergleichbarer Prozess stattfindet [McKoy et al., 2000].

Zusammengenommen demonstrieren diese Ergebnisse sowie frühere Studien, dass die Glanzstreifen in der DCM stark beeinträchtigt sind. Die Reduktion und Desorganisation der Gap Junctions [Kostin et al., 1998] spielt vermutlich eine Rolle in der Entwicklung der ventrikulären Arrhythmie, einem verbreiteten klinischen Phänotyp der DCM [WHO, 1996]. Die verminderte

Plakoglobineexpression führt wahrscheinlich zu einer Schwächung der desmosomalen Verbindungen und könnte einen Myozytenverlust analog dem Geschehen in der Naxos Krankheit verursachen [McKoy et al., 2000]. Schließlich könnte die Umverteilung von N-Cadherin zu der geschwächten Kraftübertragung und reduzierten systolischen Funktion, einem wesentlichen pathophysiologischen Prozess der DCM, beitragen [Cobet et al., 1998].

3.4 Remodeling zytoskeletärer und Membran assoziierter Proteine

Zytoskeletäre und Membran assoziierte Proteine werden in der DCM vermehrt exprimiert und verursachen eine erhöhte Steifigkeit der Zelle [Heling et al., 2000] und eine gestörte Zelladhäsion [Hein und Schaper, 1996a] (siehe Kapitel II, 2.2).

3.4.1 Vermehrte Expression von Desmin mRNA

Das Zytoskelett besteht aus den Mikrofilamenten (Aktin), den Mikrotubuli (Tubulin) und den Intermediärfilamenten, die im Muskel von Desmin gebildet werden. Es bildet ein Netzwerk im Zytoplasma und weist eine hohe Elastizität auf. Desmin ist mit dem kontraktilem Apparat assoziiert und an den Glanzstreifen verankert [Alberts et al., 1994] (siehe Abbildung 58). Es spielt vermutlich eine Rolle bei der Signaltransduktion und ist verantwortlich für die Stabilität von Myofibrillen [Hein et al., 1998b]. Desminmutationen verursachen DCM beim Menschen [Li et al., 1999] und bei der Maus [Wang et al., 2001]. Desweiteren konnten Antikörper gegen Desmin in Patienten mit DCM isoliert werden [Wilke et al., 1995]. In der idiopathischen DCM wird Desmin vermehrt exprimiert und ist desorganisiert und akkumuliert. Da diese Akkumulation vor allem in Bereichen mit mangelndem kontraktilem Material auftritt, könnte dies einen kompensatorischen Mechanismus zum Erhalt der zellulären Integrität darstellen [Heling et al., 2000]. In den hier untersuchten Proben konnte im Northern Blot eine 2,3-fach erhöhte Expression von Desmin nachgewiesen werden, die sich mit anderen Untersuchungsergebnissen deckt. Desmin erfüllte die Grenzwertkriterien der Array-Analyse nicht. Die Bestätigung der differentiellen Expression von Desmin im Northern Blot zeigt, dass einige differentiell exprimierte Gene in der Array Analyse nicht identifiziert wurden.

3.4.2 Konstitutive Expression von Zyxin mRNA

Zyxin, ein LIM Domäne Protein, ist ein Bestandteil der fokalen Adhäsionsplaques (siehe Abbildung 58). An diesen verbinden Integrine die extrazelluläre Matrix mit dem Aktinzytoskelett. Zyxin hat sowohl Funktionen in der Signaltransduktion als auch in der Zellstabilisation [Macalma

et al., 1996]. In mehreren Untersuchungen konnte die Beteiligung verschiedener LIM-Domäne Proteine in der DCM nachgewiesen werden: MLP (muscle LIM protein) knock-out Mäuse entwickeln eine DCM mit einer zerstörten Zellstruktur [Arber et al., 1997]. Insbesondere die Z-Banden und Myofibrillen weisen eine Desorganisation auf. Ebenso verursacht ein knockout von Cypher, einem LIM Protein, welches für die Aufrechterhaltung der Z-Linie essentiell ist, eine letale Skelett- und Kardiomyopathie [Zhou et al., 2001]. In der DCM des Menschen konnte eine verminderte Expression des Skelettmuskel LIM Protein SLIM 1 gezeigt werden [Yang et al., 2000]. Auf Grund dieser Ergebnisse war zu vermuten, dass auch Zyxin in der DCM differentiell exprimiert wird. Die Untersuchung im Northern Blot zeigte jedoch, dass Zyxin bei der DCM konstitutiv auf mRNA Ebene exprimiert wird und deshalb bei der Pathogenese dieser Erkrankung vermutlich keine Rolle spielen wird. Die Bestätigung der Expression dieses Gens im Northern Blot zeigt die unterschiedliche Sensitivität von Northern Blot und Array Analyse, da Zyxin im Array kein detektierbares Signal ergab.

3.5 Remodeling kontraktiler Proteine

Die kontraktilen Proteine spielen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der DCM. Mutationen dieser Proteine können eine DCM auslösen [Morimoto et al., 2001; Schönberger und Seidman, 2001]. In der idiopathischen DCM werden sie vermindert exprimiert [Heling et al., 2000]. Weiterhin konnten Antikörper gegen verschiedene kontraktile Proteine in der autoimmun bedingten DCM nachgewiesen werden [Carforio et al., 1996; Warraich et al., 1999; Maisch et al., 1993] (siehe Kapitel II, 1.3; 2).

3.5.1 Verminderte Expression von MLC2 mRNA

Die beiden leichtkettigen Myosin Isoformen MLC 1 und 2 sind an den Köpfen der schweren Myosinketten (MHC) lokalisiert und regulieren deren ATPase Aktivität (siehe Abbildung 58). Damit steuern sie die Wechselwirkung der schweren Myosinketten mit Aktin und somit die Kontraktionskraft des Herzens. Die MLC1 Isoform, auch essentielle MLC genannt, erhöht die Kontraktilität. MLC2 oder regulatorische MLC verlangsamt den Spannungsaufbau. Die MLC2 reguliert die Kontraktion über ihren Phosphorylierungsstatus. Der Kalzium/Calmodulin-Komplex aktiviert dabei das Enzym MLC-Kinase, welches MLC2 phosphoryliert, so dass MHC und Aktin in Wechselwirkung treten können.

Von beiden MLCs gibt es jeweils atriale (ALC 1+2) und ventrikuläre Isoformen (VLC1 + VLC2a+b) [Morano, 1999]. Die atriale MLC1 Isoform wird fetal im ganzen Herzen exprimiert und in der HCM reexprimiert, wodurch eine erhöhte Krafterzeugung entsteht [Schaub et al., 1998]. In einer Studie von Poetter et al. wurde eine Mutation der Gene von MLC1 und MLC2 bei der hypertrophen Kardiomyopathie beschrieben [Poetter et al., 1996].

Bezüglich der Expression der MLC2 in der DCM variieren die Angaben. So fanden Morano et al. zwar eine Verschiebung des MLC1/MLC2 Verhältnisses von 2:1 zu 1:1 beim Vergleich fetaler und adulter Herzen, jedoch keine Änderung im versagenden Herzen [Morano et al., 1994]. Im Gegensatz dazu beobachteten Margossian et al. eine Reduktion im MLC2 Gehalt in der idiopathischen DCM und konnten diese auf die erhöhte Aktivität einer Protease, die spezifisch MLC2 abbaut, zurückführen [Margossian et al., 1992]. Array Analysen verschiedener Gruppen ergaben ebenfalls widersprüchliche Ergebnisse: Während einige Studien eine Reduktion von MLC2 in der DCM beobachteten [Yang et al., 2000; Tan et al., 2002], war es in einem DCM Maus-Model unverändert [Tingley et al., 2002]. Barrans et al. wiesen eine vermehrte Expression der MLC2 mRNA in der DCM nach [Barrans et al., 2002]. Die große Schwankungsbreite der verschiedenen Studien ist eventuell darauf zurück zu führen, dass bei Mikroarray-Analysen, bei denen Oligonukleotidsonden verwendet werden, eine Verwechslung von Isoformen möglich ist. Die in dieser Untersuchung beobachtete 2-fach verminderte Expression der MLC2 mRNA deckt sich mit der Mehrheit der Untersuchungen am Menschen [Yang et al., 2000; Tan et al., 2002; Margossian et al., 1992].

Da ein partieller Entzug von MLC2 aus Skelettmuskelzellen in Kultur zu einer erhöhten Steifigkeit und Kalzium-Sensitivität der Zellen führt [Hofmann et al., 1990], ist die reduzierte Expression vermutlich ein Pathomechanismus der DCM.

3.5.2 Induktion aktindepolymerisierender Gene

Aktinfilamente (F-Aktin) bestehen aus einer Helix von globulären Molekülen (G-Aktin) und haben ein + Ende, welches an der Z-Linie verankert ist und deutlich schneller wächst als das – Ende. Die Aktinfilamente werden umgebaut, in dem am – Ende Aktin-ADP abgespalten und am + Ende Aktin-ATP angehängt wird (siehe Abbildung 58). Dieser Prozess wird durch verschiedene Faktoren gesteuert [Alberts et al., 1994].

3.5.2.1 Vermehrte Expression von Cofilin 2 mRNA und Protein

Cofilin ist ein Aktin-depolymerisierendes Protein, welches eine essentielle Funktion in der Anordnung von Aktin zu Myofibrillen hat. Es beschleunigt die Ablösung von ADP-Aktin vom – Ende des Aktinstranges, welches zu ATP-Aktin umgebaut wird und damit für die Verlängerung des Aktin-Stranges am + Ende zur Verfügung steht [Moriyama und Yahara, 2002]. In dieser Arbeit konnte eine Erhöhung von Cofilin 2 mRNA (1,7-fach) und Protein (1,8-fach) bei der DCM nachgewiesen werden, was auf eine verstärkte Aktin-Depolymerisierung schließen lässt. Die pathogenetische Bedeutung dieses Prozesses zeigt sich daran, dass eine erhöhte Cofilinexpression auch bei degenerativen Prozessen der Skelettmuskulatur beim Huhn [Nagaoka et al., 1996] und in der Duchenne Muskeldystrophie des Menschen stattfindet [Thirion et al., 2001].

Durch die Aktindepolymerisierung beeinflusst Cofilin 2 auch den Kalziumspiegel der Myozyten. Rueckschloss et al. konnten zeigen, dass über die Aktin-Depolymerisierung die L-Typ Kalzium Kanäle beeinflusst werden, wodurch es zu einer Reduktion des Einstrompeaks mit erhöhtem basalen Einstrom kommt [Rueckschloss und Isenberg, 2001]. Studien an Sarcoglycan defizienten Hamstern und Mäusen zeigten ebenfalls einen erhöhten basalen Kalzium Einstrom, der vermutlich auf einen mechanosensitiven Kanal und dessen Beeinflussung durch depolymerisiertes Aktin zurückzuführen ist [Nakamura et al., 2001]. Die Störung des Kalziumeinstroms bewirkt eine verzögerte Relaxation sowie einen verlangsamten Spannungsaufbau und stellt somit einen wichtiger Faktor in der Pathogenese der DCM dar, der für systolische wie diastolische Fehlfunktionen verantwortlich ist [Flesch et al., 1996; Perreault et al., 1990].

3.5.2.2 Vermehrte Thymosin β 4 mRNA Expression

Thymosin ist ein G-Aktin-bindendes Molekül, welches die Polymerisation zu F-Aktin verhindert [Alberts et al., 1994]. In der Array Analyse konnte eine 3-fach verstärkte Expression von Thymosin β 4 mRNA nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass die von Cofilin abgespaltenen G-Aktinmoleküle vermindert am + Ende angebaut werden. Die Bedeutung der Aktindepolymerisierung in der Pathogenese der Kardiomyopathien zeigt sich daran, dass in der DCM auch die Thymosin α Isoform [Barrans et al., 2002] und ein weiteres Aktin-depolymerisierendes Protein, Gelsolin, welches mit Thymosin um die Bindung an Aktin konkurriert [Ballweber et al., 1997], vermehrt exprimiert werden [Yang et al., 2000]. Darüberhinaus wird Thymosin β ebenfalls in der HCM überexprimiert [Barrans et al., 2001]. In Zellkulturstudien konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Thymosin β 4 eine erhöhte Expression zytoskeletärer Proteine induziert [Golla et al., 1997]. Die vermehrte Thymosin

β 4 Expression trägt also eventuell zu der Akkumulation von zytoskeletären Proteinen in der DCM bei.

Zusammengenommen sprechen diese Ergebnisse dafür, dass eine erhöhte Aktin-Depolymerisierung zusammen mit einer reduzierten Polymerisierung einen neuen Pathomechanismus in der DCM darstellen könnte. Dieser führt vermutlich ebenso wie die verminderte Expression oder Mutation kontraktile Proteine zu einer verminderten Kontraktionskraft des Herzens.

Embryonal ist der G-Aktin Pool höher als in adulten Myozyten. Dem entsprechend finden sich embryonal auch höhere Spiegel an Aktin-depolymerisierenden Proteinen (ADF/Cofilin, Profilin und Thymosin β) [Nagaoka et al., 1996]. Die vermehrte Expression dieser Gene in der DCM stellt somit eine Reaktivierung eines embryonalen Genprogramms dar, wie es in der DCM häufiger zu beobachten ist (siehe Abschnitt 5).

3.6 Apoptose

Der Verlust von Myozyten durch Onkose, Apoptose und autophagischen Zelltod ist vermutlich für die Fibrosierung der EM [Hein und Schaper, 1996b] und für den Übergang zum dekompenzierten Herzversagen mit verantwortlich [Nicol et al., 2000]. Die Bedeutung der Apoptose für den Verlust von Kardiomyozyten in der DCM ist jedoch umstritten [Elsässer et al., 2000]. Neueren Studien zufolge, spielen der autophagische Zelltod und die Onkose die Hauptrolle bei diesem Prozess [Kostin et al., 2002]. Genexpressionsstudien belegen, dass anti-apoptotische Gene in der Endphase des Herzversagens vermindert exprimiert werden und somit pro-apoptotische Signale überwiegen [Steenbergen et al., 2002]. Dieses Ungleichgewicht konnte auch in anderen Studien gezeigt werden [Olivetti et al., 1997] und ist vermutlich mitverantwortlich für den Übergang zur Dekompensation (siehe Kapitel II, 2.2; 2.3.6).

3.6.1 Vermehrte Expression von Id3 mRNA und Protein

Die Id (Inhibitor of DNA-binding) Familie der Helix-loop-helix Proteine sind negative Regulatoren der Zelldifferenzierung. Da sie keine DNA-Bindungsdomänen aufweisen, können sie durch Dimer-Bildung mit basischen HLH-Transkriptionsfaktoren (bHLH), deren Bindung an die DNA und somit die Transkription bHLH regulierter Gene inhibieren. Id3 wird in proliferierenden Muskelzellen stark exprimiert und in der Differenzierung herunter reguliert [Melnikova und Christy, 1996]. Es inhibiert die Expression muskelspezifischer Gene, in dem es myogene bHLHs

wie MyoD blockiert. Eine Überexpression von Id3 verhindert die Myo-D vermittelte Differenzierung proliferierender Myoblasten [Chen et al., 1997] und induziert Apoptose in verschiedenen Zellkulturen [Norton und Atherton, 1998]. Für Id1, welches eine hohe Homologie zu Id3 aufweist [Tanaka et al., 1998], konnte auch in Kardiomyozyten gezeigt werden, dass eine Überexpression zu einer Apoptose-Induktion führt. In dieser Arbeit wurde eine vermehrte Expression von Id3 auf mRNA (2,2-fach) und Proteinebene (1,6-fach) gezeigt. Die Id3 Expression kann durch TGF- β stimuliert werden [Kee et al., 2001]. TGF- β ist in der DCM ebenfalls erhöht [Pauschinger et al., 1999] und wirkt Apoptose induzierend [Mann, 2002]. Der erhöhte Id3 Gehalt ist also eventuell auf eine Stimulation durch TGF- β zurückzuführen und Id 3 könnte einer der Faktoren sein, über die TGF- β pro-apoptotisch wirkt.

3.6.2 Verminderte Expression von Telomerase reverse transkriptase (TERT) mRNA

Ein Hinweis auf das Versagen anti-apoptotischer Signalwege in der DCM ist die in der Array Analyse gezeigte verminderte Telomerase reverse transkriptase (TERT) mRNA Expression. Die Enden der Chromosomen (Telomere) werden durch das Enzym Telomerase repliziert. Die Telomerase ist eine spezialisierte reverse Transkriptase, die aus einer katalytischen Protein Einheit (TERT) und einer RNA Komponente (telomerase RNA) besteht, die als Template für das Enzym dient [Alberts et al., 1994]. Eine verminderte Expression von TERT führt über eine Telomerverkürzung zu einer größeren Anfälligkeit der Zelle für Apoptose bei Mäusen. Die Herzen dieser Mäuse haben eine reduzierte Anzahl Herzmuskelzellen; die verbliebenen Zellen sind hypertroph, und die meisten Mäuse sterben an plötzlichem Herzversagen [Blasco, 2002]. Eine Überexpression von TERT im Herzmuskel dahingegen führt bei Mäusen und in Kardiomyozyten in Kultur zu einer verlängerten Überlebenszeit mit stabilen Telomerlängen und einer geringeren Apoptose-Anfälligkeit der Kardiomyozyten [Oh et al., 2001]. Auf Grund dieser und weiterer Studien, die eine positive Wirkung von TERT in der Wundheilung und Angiogenese zeigen, postulieren Oh und Schneider einen therapeutischen Effekt einer induzierten TERT Expression im Herzen [Oh und Schneider, 2002]. Die im Array gezeigte verringerte Produktion von TERT mRNA ist also eventuell ein Faktor, der die Apoptose im dilatativen Herzen fördert.

3.6.3 Reduzierte Expression von NF-ATc mRNA

Die Familie der NF-AT (nuclear factors of activated T-cells) Transkriptionsfaktoren ist in verschiedene Signaltransduktionsketten und in die Transkriptionskontrolle involviert und besteht aus einer nukleären und einer zytosolischen Untergruppe (NF-ATn und NF-ATc). NF-ATc wird über die Kalzium/Calmodulin-Calcineurin-Kaskade aktiviert, die zu einer Translokation von NF-ATc in den Nukleus führt, wo es die Transkription verschiedener Gene, unter anderem von Zytokinen, aktiviert [Zhu und McKeon, 2000]. Der Calcineurin-NF-AT Signalweg spielt eine wesentliche Rolle in der Entwicklung der hypertrophen Kardiomyopathie [Molkentin et al., 1998] (siehe Kapitel II, 2.3). In einem Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Calcineurin nur in der Phase der adaptativen Hypertrophie vermehrt exprimiert wird. Im Übergang zum und im Endstadium des Herzversagens erfolgt jedoch eine Reduktion der Expression [Hayashida et al., 2000]. Ebenso konnten Tsao et al. einen beeinträchtigten Calcineurin-Weg im Endstadium des Herzversagens beobachten [Tsao et al., 2000]. Die auf 32 % verminderte Expression von NF-ATc könnte auf eine reduzierte Calcineurinstimulation in der Endphase der DCM zurückzuführen sein. Da NF-ATc nicht nur die Expression hypertropher Gene aktiviert, sondern darüberhinaus die Apoptose-inhibierende Wirkung von Endothelin 1 und IGF-1 vermittelt [Katika et al., 2001], deutet die hier beobachtete verminderte Expression von NF-ATc auf ein Versagen anti-apoptischer Signalwege hin und bestätigt die Beobachtungen im Tiermodell in der DCM des Menschen.

Zusammengenommen sprechen die vorliegenden Ergebnisse für eine fortschreitende Apoptose im Endstadium des Herzversagens durch den Anstieg Apoptose-induzierender Gene (Id3) und die verringerte Expression anti-apoptotischer Gene (TERT und NF-ATc). Dies stimmt mit anderen Beobachtungen überein, die ebenfalls die Hauptdeterminante der myokardialen Apoptose in der Imbalance pro- und anti-apoptotischer Signalwege sehen [Nicol et al., 2000]. Die Rolle der Apoptose für den Verlust von Kardiomyozyten ist hierdurch jedoch nicht zu beurteilen.

3.7 Verminderte Kallistatin mRNA Expression

Die reduzierte Kallistatin Expression in der DCM deutet auf einen Widerstreit pro- und anti-fibrotischer Prozesse in der DCM hin. Kallistatin ist ein Inhibitor des Enzyms Kallikrein, welches die Aktivierung von Kininen, unter anderem Bradykinin und Kallidin, katalysiert. Die Kinine können durch die Kininase II (=ACE) inaktiviert werden. Kinine wirken vasodilatativ und reduzieren die Leukozytenanheftung [Campbell, 2001]. Darüberhinaus spielen sie eine Rolle in

der kardialen Funktion und Fibrotisierung. Eine verminderte Kininaktivität bei Kallikrein und Bradykinin B2 Rezeptor knockout Mäusen löst eine DCM aus [Emanuelli et al., 1999; Meneton et al., 2001]. Umgekehrt konnte in einem Rattenhypertrophiemodell gezeigt werden, dass eine erhöhte Kininaktivität durch ACE Hemmer die linksventrikuläre Hypertrophie und Fibrose verhindert [Linz et al., 1995a; Linz et al., 1995b].

Im Herzversagen konnten unter anderem eine vermehrte Expression des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE) [Studer et al., 1994], der ACE Bindungsstellen sowie eine erhöhte ACE Aktivität nachgewiesen werden [Zisman et al., 1998]. Die Medikation mit ACE-Hemmern gehört mittlerweile zu den Standardtherapieverfahren und verlangsamt die Progression der DCM [Cobet et al., 1998]. Dies ist auf eine verminderte Angiotensin II-Aktivität, die zu einer Verbesserung des Kalziumgleichgewichts führt, und auf eine erhöhte Aktivität von Kininen zurückzuführen [Tschöpe et al., 1997] (siehe Kapitel II, 2.3.2).

Die erhöhte ACE Aktivität, die zu einer reduzierten Kininaktivität führt, und die verminderte Expression von Kallistatin, die diese erhöht, scheinen antagonisierende pathologische und protektive Prozesse in der DCM zu sein. Da jedoch auch die Medikation mit ACE-Hemmern die zunehmende Fibrotisierung des Gewebes und das Fortschreiten des Herzversagens nicht aufhalten können, ist zu vermuten, dass auch die verminderte Kallistatinexpression das Remodeling der EM höchstens verzögern aber nicht verhindern kann.

4. Kalzium-abhängige Pathomechanismen

Der gestörte intrazelluläre Kalzium-Umschlag spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der DCM [Flesch et al., 1996] (siehe Kapitel II, 2.3.5). Eine wesentliche Ursache des erhöhten basalen Kalziumspiegels ist die verminderte Aufnahme von Kalzium durch die sarkoplasmatische Retikulum Kalzium ATPase (SERCA) [Gwathmey et al., 1987]. Dadurch verzögert sich der Spannungsaufbau und die Relaxation [Beuckelmann et al., 1995; Schmidt et al., 1998]. Bisher bekannte Gründe für die verminderte SERCA Aktivität sind die Desensitivierung des β -adrenergen Signalweges [Chien, 2000] sowie die vermehrte Expression der Skelettmuskel-Isoform 1 der SERCA, die zu einer fehlerhaften Regulation der SERCA führt [Münch et al., 2001].

4.1 Verminderte Expression von S100 A1 mRNA

Die Unterfamilie der S100 Proteine gehört zu den EF-Hand Kalzium-bindenden Proteinen. S100 A1 wird bevorzugt im Herzen exprimiert, wo es mit dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) und den kontraktilen Elementen kolokalisiert und die Freisetzung von Kalzium aus dem SR reguliert. In einer Zellkulturstudie wurde nachgewiesen, dass eine Überexpression von S100 A1, über eine verbesserte Kalzium Aufnahme durch das SR, zu einem schnelleren Kalzium-Kreislauf und somit zu einer gesteigerten Kontraktilität führt. Außerdem beschleunigt S100, vermutlich durch eine verminderte Kalzium Sensitivität der kontraktilen Elemente, die Relaxation der Herzmuskelzellen [Most et al., 2001].

In der experimentellen Hypertrophie beim Schwein findet sich in der frühen Phase eine vermehrte Expression von S100 A1 [Ehlermann et al., 2000]. Wohingegen beim Schweinmodell des chronischen Herzversagens eine verminderte Produktion von S100 A1 nachgewiesen werden konnte [Remppis et al., 1996]. In einer Array-Analyse wurde eine verminderte Expression der S100 A4 Isoform in der DCM nachgewiesen [Barrans et al., 2002]. Die in dieser Arbeit nachgewiesene 3,5-fach verminderte Expression von S100 A1 mRNA in der DCM deckt sich mit diesen Untersuchungen. Die Zellkulturstudien lassen vermuten, dass diese zu einer reduzierten Kalzium-Aufnahme durch das SR sowie einer erhöhten myofibrillären Kalzium-Sensitivität führt. Dies bedingt eine verschlechterte systolische und diastolische Funktion des Herzens, so dass die reduzierte S100 A1 Expression vermutlich eine weitere Ursache des progressiven Herzversagens darstellt. Die vermehrte Expression in der Hypertrophie trägt vermutlich zu der verbesserten Schlagkraft in der kompensierten Phase der HCM bei. Eine Zufuhr von S100 A1 könnte einen neuen Therapieweg zur Verbesserung der Schlagkraft des Herzens darstellen [Most et al., 2001].

4.2 Reduzierte Annexin VI mRNA Expression

Annexine sind eine Familie Membran-assoziiertes, Kalzium- und Phospholipidbindender Proteine. Annexin VI beeinflusst den intrazellulären Kalzium-Haushalt und somit die Kontraktilität in isolierten Kardiomyozyten, in dem es die SERCA Öffnungsphasen verlängert, die Leitfähigkeit der L-Typ Kalzium-Kanäle erhöht und die Aktivität des Na/Ca-Austauschers modifiziert [Diaz-Munoz et al., 1990; Song et al., 1998]. Eine Überexpression von Annexin VI in Mäusen führt zu einem reduzierten intrazellulären Kalzium Spiegel und einer verminderten Kontraktilität der Kardiomyozyten [Gunteski-Hamblin et al., 1996]. Die in der Array Analyse beobachtete, auf die Hälfte reduzierte Expression von Annexin VI mRNA in der DCM deckt sich mit Ergebnissen

anderer Untersuchungen, die dies auf mRNA und Proteinebene nachwiesen [Song et al., 1998]. Die Reduktion von Annexin VI trägt vermutlich zu dem erhöhten intrazellulären Kalzium Spiegel in der DCM bei.

Die verminderten Expressionen von S100 A1 und Annexin VI stellen weitere Mechanismen dar, durch die die Wiederaufnahme von Kalzium durch die SERCA reduziert werden kann. Diese Veränderungen tragen zu einem erhöhten Kalzium-Ruhepegel sowie einem verminderten Kalzium-Peak und –Abfall bei und beeinträchtigen somit die systolische und diastolische Funktion des Herzens [Song et al., 1998].

5. Reaktivierung fetal exprimierter Gene

Die Expression von Genen oder Isoformen, die normalerweise fetal aktiv sind, ist typisch für die Phase der kompensatorischen Hypertrophie [Hoshijima und Kenneth, 2002] (siehe Kapitel II, 2.3.3). In dieser Studie wurden verschiedene Wechsel zu fetalen Programmen beobachtet. Einer davon ist die erhöhte Expression Aktin-depolymerisierender Gene, die in Abschnitt 3.5.2 beschrieben wurde. Weitere Veränderungen, die auf eine Reaktivierung fetaler Mechanismen hindeuten, werden im folgenden beschrieben werden.

5.1 Vermehrte Expression der ANF mRNA

Die atrialen natriuretischen Faktoren sind eine Familie von Peptidhormonen, deren Expression im Vorhof durch steigenden Blutdruck induziert wird. [Alberts et al., 1994]. ANF wird embryonal im gesamten Herzen exprimiert, während im adulten Herzen nur im Atrium eine Expression nachweisbar ist. Bei der hypertrophen und dilatativen Kardiomyopathie wird die ventrikuläre Expression von ANF in der kompensatorischen Hypertrophie im Rahmen der Aktivierung fetaler Gene induziert [Saito et al., 1987; Barrans et al., 2002; Yang et al., 2000]. ANF wiederum aktiviert weitere Gene wie NFAT und MEF2, die die Expression hypertropher Gene im Nukleus induzieren. [Hoshijima und Kenneth, 2002]. Da ANF in der DCM und der HCM vermehrt exprimiert wird, dient es als Marker für kardialen Stress [Tingley et al., 2002]. In der Array Analyse wurde die erhöhte Expression dieses Gens ebenfalls detektiert.

5.2 Erhöhte Carp mRNA und Protein Expression

Carp (cardiac ankyrin repeat protein) ist ein nukleäres Protein, welches die Regulation anderer Muskel-Gene kontrolliert. Es kolokalisiert mit Myopallidin an der Z-Linie, was auf eine kritische Rolle von Carp für den Erhalt der sarkomerischen Struktur hindeutet [Bang et al., 2001]. Carp ist ein früher Marker für Herzmuskelzellen und wird in der Entwicklung herunter reguliert. In der hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) wird Carp als Teil des reaktivierten embryonalen Genprogramms vermehrt exprimiert [Kuo et al., 1999] und gilt als Marker RNA für diese Erkrankung [Aihara et al., 2000]. Eine signifikante Zunahme von Carp mRNA (1,8-fach) und Protein (2,6-fach) in der DCM konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Die vermehrte Expression von Carp in der DCM konnte ebenfalls in einem Mausmodell der DCM (MLP-knockout) [Arber et al., 1997] und kürzlich von Zolk et al. in einem Hundemodell und in humanen Proben gezeigt werden [Zolk et al., 2002]. Die Expression von Carp wird durch TGF- β 1 induziert [Chu et al., 1995]. TGF- β 1, wie aus anderen Studien bekannt, wird bei der DCM (und der HCM) ebenfalls vermehrt exprimiert [Pauschinger et al., 1999]. Dies deutet darauf hin, dass die verstärkte Carp mRNA Produktion ein Folge der erhöhten TGF- β 1 Konzentration sein könnte. Ein weiterer Induktionsweg über die GATA 4- α 1-adrenerge Signalkette konnte kürzlich gezeigt werden [Maeda et al., 2002]. Dieser Signalweg wird in der hypertrophen Phase der DCM vermehrt aktiviert [Nicol et al., 2000] und könnte somit für die erhöhte Carp Expression mitverantwortlich sein. Da Carp ein negativer Regulator von MLC2 ist [Zou et al., 1997], könnte die verminderte Expression von MLC2 (Abschnitt 3.5.1) eine Folge der erhöhten Carp Expression sein.

5.3 Erhöhte Expression von Fatty acid binding protein 4 mRNA

Fettsäure bindende Proteine (FABP) sind zytosolische Proteine, die langkettige Fettsäuren in die Mitochondrien transportieren, wo sie oxidiert werden. Unter normalen Bedingungen bezieht das Herz seine Energie größtenteils aus der Oxidation von langkettigen Fettsäuren. Diese werden von membranständigen FABP aus der Zirkulation aufgenommen, durch zytosolische FABP zu den Mitochondrien transportiert und dort durch einen Carnitintransporter aufgenommen [Schaap et al., 1998].

Veränderungen im myokardialen Energiemetabolismus werden für die kontraktile Dysfunktion im Herzversagen mitverantwortlich gemacht [Barger und Kelly, 1999; Sack et al., 1996]. Beim Übergang von der kompensatorischen Hypertrophie zum Herzversagen findet ein Wechsel im

Energiemetabolismus von der normalen Fettverbrennung zur fetalen Glucoseoxidierung statt [Dávila-Román et al., 2002] (s. Kapitel II, 2.3.4). Dadurch entsteht ein Energiedefizit und eine Anreicherung toxischer, langer Fettsäuren in den Kardiomyozyten [Dávila-Román et al., 2002]. Die Anwesenheit von Fettsäure-bindenden Proteinen könnte die Zelle vor den Effekten der akkumulierten Fettsäuren schützen [De Villiers und Lochner, 1986].

Die im Array beobachtete stark vermehrte Expression von FABP4 in der DCM könnte also eine protektive Funktion haben. Studien an Patienten mit postoperativen Infarkten haben gezeigt, dass geschädigte Myokardzellen FABP aus den Zellen verlieren. Dieses lässt sich im Plasma nachweisen und dient als Marker für postoperative Zellschädigung [Sohmiya et al., 1993] und Ischämie-Reperfusionsschädigung [Knowlton et al., 1989]. Die erhöhte Expression von FABP 4 mRNA könnte also eine Kompensation für einen erhöhten Verlust von FABP 4 über geschädigte Kardiomyozyten darstellen. Serologische Untersuchungen von Patienten könnten zeigen, ob FABP4 auch in der DCM, wie in der Ischämie oder post operationem, vermehrt in die Blutbahn austritt und als diagnostischer Marker der Zellschädigung bei dieser Erkrankung geeignet ist.

6. Entzündungsreaktionen

Es gibt nicht-entzündliche und entzündliche Formen der DCM, wobei letztere durch Infektionen oder Autoantikörper ausgelöst sein kann (siehe Kapitel II, 1.3.3). Die Diagnose einer inflammatorischen DCM wird auf Grund einer Biopsatuntersuchung gestellt, wobei man ab einem Gehalt von ≥ 14 Leukozyten/mm² von einer Myokarditis spricht [Maisch et al., 2000]. Eine besondere Rolle bei der inflammatorischen DCM spielen Adhäsionsproteine wie LFA-1 oder die Proteine der CAM Familie. Wie es zur Aktivierung dieser Adhäsionsmoleküle kommt ist noch ungeklärt, jedoch vermitteln sie die inflammatorische Reaktion, die über die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen zur Beeinflussung der myokardialen Funktion führt [Maisch et al., 2000]. Die Angaben über die Häufigkeit inflammatorischer Prozesse bei der DCM schwanken in der Literatur stark, entsprechend den vielfältigen Ursachen dieser Erkrankung. So konnten Benvenuti et al. [Benvenuti et al., 2000] einen Anstieg von Adhäsionsmolekülen (unter anderem LFA-1) und Klasse I HLA in der Chagas Kardiomyopathie, jedoch nicht in der DCM zeigen. Ebenso konnten de Leeuw et al. [Leeuw et al., 2001] in keinem von 37 DCM Herzen Anzeichen einer Entzündung feststellen. Noutsias et al. [Noutsias et al., 1999] und Kühl et al. [Kuehl et al., 1996] diagnostizierten dahingegen bei 67 % beziehungsweise 50 % der untersuchten DCM

Herzen eine Entzündung und Devaux et al. [Devaux et al., 1997] beobachteten eine geringgradige chronische Entzündung in DCM Herzen. Die Varianz dieser Untersuchungsergebnisse ist auf die große Bandbreite der Pathogenese der DCM zurückzuführen.

6.1 Verminderte Expression von LFA-1 α mRNA

Das Leukozyten Adhäsions Glykoprotein LFA wird auf Lymphozyten (Lymphocyte function associated antigen) und Phagozyten exprimiert. Es gehört zu den β 2-Integrinen, die nach einer Immunstimulation auf Leukozyten exprimiert werden, und vermittelt die Adhäsion dieser Zellen an ihre Zielzelle. In einer Studie von Noutsias et al. wurden Biopate von Kontrollherzen sowie von Herzen mit inflammatorischer und nicht inflammatorischer DCM verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von LFA-1 positiven Lymphozyten sowie weiterer Entzündungsmarker mit der entzündlichen DCM korreliert [Noutsias et al., 2002].

In den hier untersuchten Proben war die Expression von LFA-1 α mRNA in der Array Analyse der DCM-Proben unter die Nachweisgrenze vermindert. Dies spricht dafür, dass nur wenige aktivierte Entzündungszellen in den untersuchten Proben vorlagen und die Patienten vermutlich eine idiopathische DCM, die nicht durch inflammatorische Prozesse beeinflusst wurde, aufwiesen oder ein inflammatorisches Geschehen antagonisiert wurde. Da eine Blockade von LFA-1 einen protektiven Effekt auf myokardiale Reperfusion nach globaler Ischämie in der Ratte hat [Tamiya et al., 1995], ist es außerdem denkbar, dass die verminderte Expression von LFA-1 eine kardioprotektive Funktion bei der DCM hat.

6.2 Reduktion der Rantes mRNA Expression

Ein weiterer Befund der Array Analyse, der dafür spricht, dass in den hier untersuchten Proben keine Immigration von aktivierten Leukozyten vorlag, ist die verminderte Expression des T-cell spezifischen Rantes (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) Protein. Dieses Chemokin wurde mit beiden Array Systemen identifiziert und zeigte eine 3-fach reduzierte Expression im Cardiovascular Array. Im 1.2 Array lag seine Expression in den DCM-Proben unter der Nachweisgrenze. Da Rantes hauptsächlich von T-Zellen gebildet wird, sind unterschiedliche Ergebnisse zu erwarten, je nachdem, ob gering oder stark inflammatorisch infiltrierte Gewebe untersucht wird. So beschrieben Damås et al. ebenfalls eine verminderte mRNA-Produktion von Rantes und anderen Chemokinen bei der DCM [Damås et al., 2000]. Dahingegen zeigte sich jedoch in einer Untersuchung von Aukrust et al., in der die

Blutkonzentrationen verschiedener Chemokine bei der DCM untersucht wurden, dass alle untersuchten Chemokine, darunter auch Rantes, in erhöhten Konzentrationen vorlagen [Aukrust et al., 1998]. Diese Befunde decken sich mit der Variabilität inflammatorischer Prozesse in der DCM. Da Rantes zu den C-C Chemokinen gehört, die starke Chemoattraktoren und Aktivatoren von Monozyten und Lymphozyten sind, korreliert die geringe Expressionsstärke dieses Chemokines mit der schwachen LFA-1 Produktion.

6.3 Verminderte Expression von Phospholipase A2 Rezeptor mRNA

Ein wichtiger Mediator entzündlicher Prozesse ist das Enzym Phospholipase A2 (PLA2), welches über den Phospholipase A2 Rezeptor unter anderem die Produktion von Eikosanoiden aktiviert. Hanasaki et al. konnten zeigen, dass eine Inaktivierung dieses Rezeptors Mäuse vor einem Lipopolysaccharid-induzierten septischen Schock schützt, da die Freisetzung von Entzündungsmediatoren über den PLA2-PLA2R-Weg reduziert ist [Hanasaki und Arita, 1999]. In den Array Analysen konnte eine 4-fach verminderte Expression des Phospholipase A2 Rezeptors nachgewiesen werden. Die Studie von Hanasaki et al. lässt vermuten, dass diese Reduktion eine protektive Funktion in der DCM haben könnte.

Einen ähnlichen Effekt wie der knock-out des Phospholipase A2 Rezeptors hat die Blockade dieses Signalwegs durch einen synthetischen PLA2-Inhibitor [Hanasaki und Arita, 1999].

6.4 Erhöhte Annexin I mRNA und Protein Expression

Annexin I ist ein physiologischer Inhibitor der PLA2 [Wallner et al., 1986]. Annexin I (ehemals Lipocortin 1) gehört zur Annexin Familie, die bei den Säugern mindestens 13 Mitglieder umfasst. Das individuelle N-terminale Ende ist vermutlich für die unterschiedlichen Funktionen der Annexine verantwortlich. Annexin I wird durch Glukokortikoide induziert und vermittelt deren anti-inflammatorische Wirkung, in dem es durch direkte Proteininteraktion die PLA2 inhibiert [Kim et al., 2001]. Darüberhinaus verhindert Annexin I über seine N-terminale Region die Leukozytenmigration [La et al., 2001a]. Durch die Reduktion der Leukozytenkonzentration hat Annexin I bei der Ischämie-Reperfusionsschädigung [D'Amico et al., 2000] und beim septischen Schock [Ritchie et al., 1999] eine protektive Wirkung auf das Herz beziehungsweise den Papillarmuskel. Die Annexin I mRNA war in der Array Analyse um das 2,6 fache erhöht, das Protein im Western Blot 4-fach vermehrt. Vermutlich stellt dies auch in der DCM einen protektiven Mechanismus dar.

Die vielversprechenden Ergebnisse der Studien in Ischämie-Reperfusionen-Modellen lassen Annexin I als mögliches neues anti-inflammatorisches Therapeutikum mit großer Wirkkraft am Herzen erscheinen [La et al., 2001b]. Studien an DCM-Mausmodellen könnten klären, ob eine exogene oder transgene Zufuhr von Annexin I als Therapeutikum für diese Erkrankung in Frage kommt.

Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass Annexin I bei chronischen Entzündungen verstärkt abgebaut wird [La et al., 2001b]. Daher spricht die erhöhte Proteinproduktion in den untersuchten Proben gegen ein inflammatorisches Geschehen bei diesen Patienten. Weiterhin deuten die vermehrte Produktion des PLA2 Inhibitors Annexin I sowie die verminderte Expression des PLA2-Rezeptors darauf hin, dass in der idiopathischen DCM eine Unterdrückung der Phospholipase A2 vermittelten Entzündungsreaktion stattfindet.

Da Annexin I die Migration von Leukozyten reduziert, könnte die vermehrte Annexin I Produktion die verminderte Expression von Rantes und LFA-1 erklären. Es ist denkbar, dass anti-inflammatorische Prozesse in den untersuchten Proben durch die Therapie der Patienten verstärkt wurden, da die Expression von Annexin I durch Glukokorticoide erhöht wird. Die Regulation der Inflammation durch Annexin I ist in Abbildung 60 dargestellt.

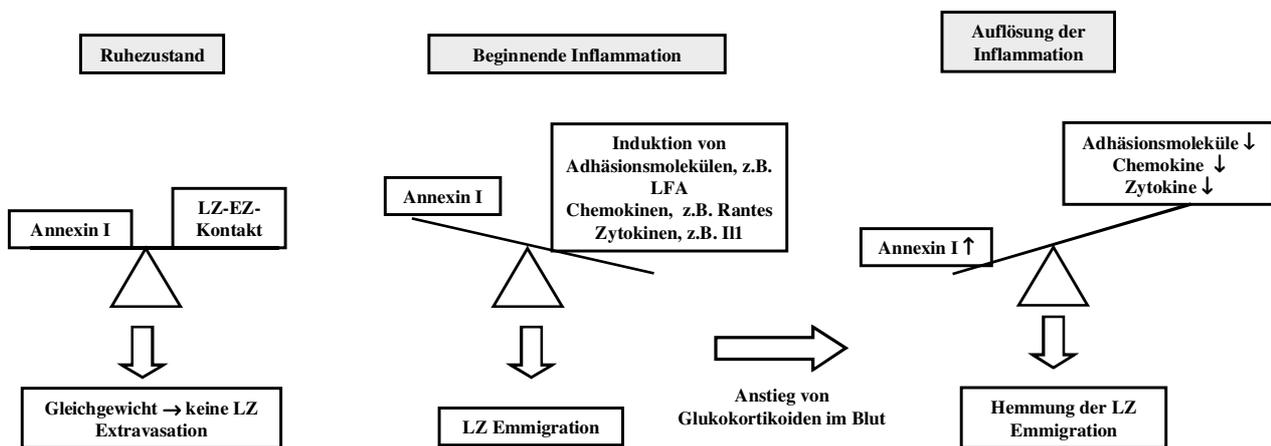


Abb. 60: Regulation der Inflammation. LZ: Leukozyt; EZ: Endothelzellen; nach Peretti, M., *Gen Pharmac*, Vol. 31, No 4, 545-552, 1999 [Perretti, 1998]

7. Differentielle Expression weiterer Gene

7.1 Verminderte Expression der Tyrosinkinase 1 mRNA

Protein Tyrosinkinasen (tnk) phosphorylieren die OH-Gruppe in Tyrosinresten ihrer Zielproteine und beeinflussen somit zum Beispiel die Aktivität oder den Abbau dieser Proteine. Tnks bestehen aus einer Kinase-Domäne, einer Erkennungsdomäne und einer Region, über die ihre Aktivität gesteuert wird [Alberts et al., 1994]. Die intrazelluläre nicht-Rezeptor Tyrosinkinase 1 (tnk 1), die laut der Array Analyse in der DCM auf 36 % vermindert exprimiert wird, wurde erst vor wenigen Jahren kloniert [Hoehn et al., 1996]. Es konnte inzwischen gezeigt werden, dass sie durch Auto- und Tyrosinphosphorylierung aktiviert werden kann. Sie reagiert jedoch mit keinem der Interaktionspartner anderer Tyrosinkinasen, so dass man von einer hochspezifischen Regulierung dieser Kinase ausgehen muss. Es konnte lediglich eine Bindungsstelle für PLC γ identifiziert werden, die vermuten lässt, dass die tnk1 in Phospholipid vermittelte Signalwege involviert ist [Felschow et al., 2000]. Die hier beobachtete verminderte Expression der tnk1 erlaubt ohne Untersuchung ihres Phosphorylierungsstatus in der DCM keine Aussage über ihre Aktivität bei dieser Erkrankung. Ohne weitere Erkenntnisse über die Funktion von tnk1 ist es nicht möglich, über die Bedeutung der verminderten Expression in der DCM zu spekulieren.

7.2 Reduzierte Expression der nikotinergen Acetylcholinrezeptor β 4 mRNA

Nikotinerge Acetylcholinrezeptoren sind eine Familie Liganden-gesteuerter Ionenkanäle, die durch Nikotin und den endogenen Liganden Acetylcholin aktiviert und vor allem im peripheren Nervensystem exprimiert werden [Lindstrom, 1997]. Es sind transmembranäre Pentamere, die sich aus α und β Untereinheiten zusammensetzen [Picciotto et al., 2001]. Über die Bedeutung der nikotinergen Acetylcholinrezeptoren im Herzen gibt es bisher wenig Erkenntnisse, im Gegensatz zum muskarinergen Acetylcholinrezeptor, der über G-Rezeptoren die Kontraktionskraft im Herzen beeinflusst. Untersuchungen bei Hunden haben gezeigt, dass sich die nikotinergen Rezeptoren im Herzen aus α 3 β 4 Untereinheiten zusammensetzen [Bibevski et al., 2000]. Die Aktivierung dieses Rezeptors durch Nikotin führt über eine Freisetzung von Catecholaminen zu einer gesteigerten Herzfrequenz und einer verstärkten myokardialen Kontraktion [Haass und Kubler, 1997]. In der Array Analyse zeigte sich eine starke Reduktion der mRNA des neuronalen nikotinergen Acetylcholinrezeptors β 4. Man könnte vermuten, dass die reduzierte Expression dieses Rezeptors in der DCM zu einer verminderten Herzleistung beiträgt. Da jedoch knockout Studien bei Mäusen gezeigt haben, dass die β 2 Einheit β 4 ersetzen kann [Picciotto et al., 2001],

hat die verminderte Expression der β_4 Einheit in der DCM eventuell keine pathophysiologische Bedeutung.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Millionen Patienten sind weltweit von der DCM betroffen. Diese entsteht durch ein komplexes Zusammenwirken von genetischen Faktoren, dem Lebenswandel und der Umwelt [Schönberger und Seidman, 2001]. Das Herz reagiert auf diese Stimuli mit einer morphologischen Umstrukturierung. Dieser kompensatorische Mechanismus ist initial nützlich, wird jedoch schließlich unkontrolliert und führt zu einer funktionalen Störung, die im Herzversagen endet. In früheren Studien konnten einige der molekularen Prozesse, die diesem Geschehen zu Grunde liegen, aufgeklärt werden [Seidman und Seidman, 2001; Hoshijima und Kenneth, 2002].

Die Entwicklung der Gen Arrays erlauben seit kurzem die simultane Untersuchung großer Gengruppen, wodurch ein breit gefächertes Überblick über die Veränderungen der Genexpression bei Krankheiten gegeben werden kann [Cook und Rosenzweig, 2002].

In der vorliegenden Arbeit wurden diese Technik, sowie Northern und Western Blot Analysen, angewendet, um humanes DCM Gewebe im Vergleich zu gesunden Herzen zu untersuchen. Dabei sollten neue Erkenntnisse über die Pathophysiologie dieser Erkrankung gewonnen werden.

Zunächst musste das Verfahren der Array Analyse optimiert und die Grenzwertkriterien der Auswertung definiert werden. Um die Identifikation falsch positiver Gene zu vermeiden, wurden hohe Grenzwerte gesetzt. Dadurch konnten nicht alle differentiell exprimierten Gene mit der Array Analyse erkannt werden. Dies zeigte exemplarisch die Untersuchung von Desmin, welches die Auswertungskriterien nicht erfüllte, in der Northern Blot Untersuchung jedoch eine differentielle Expression aufwies. Der Vorteil dieser Kriterien ist der weitestgehende Ausschluss falsch positiver Resultate. Für die Aussagekraft der Arraydaten spricht ebenfalls die Identifikation von drei Markergenen, deren differentielle Expression für die DCM charakteristisch ist, sowie der Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur und die Bestätigung einiger Resultate durch Northern und vor allem Western Blot Analyse. Als Vorbedingung für die Western Blot Untersuchung wurde die Eignung von GAPDH als interner Standard, durch den Nachweis der konstitutiven Expression, demonstriert.

Insgesamt wurden 25 differentiell exprimierte Gene identifiziert, die verschiedenen funktionellen Gruppen zugehören und größtenteils neue Aspekte in der Pathophysiologie der DCM darstellen.

1. Entzündungsreaktion

Die verminderte Expression entzündlicher Gene (LFA1, Rantes, PLA2R), sowie die vermehrte Expression des anti-inflammatorischen Proteins Annexin I, sprechen dafür, dass bei den hier

untersuchten Proben entweder eine nicht-entzündliche Form der DCM vorlag oder eine Inflammation durch Annexin I antagonisiert wurde.

2. Remodeling

In dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse über den Umbau des Myokards, einem charakteristischen Merkmal der DCM, gewonnen werden:

Die Nachweise der gestörten N-Cadherin Expression, sowie der reduzierten Plakoglobin-Produktion, ergänzen andere Arbeiten, die ein Remodeling der Glanzstreifen beschreiben und lassen darauf schließen, dass die Kraftübertragung zwischen den Kardiomyozyten sowie ihr Zusammenhalt beeinträchtigt ist.

Die Detektion der erhöhten Integrin β mRNA und Protein Expression in dieser Arbeit lässt vermuten, dass Integrin β eine Schlüsselrolle in einem Signalweg, über den mechanischer Stress den Umbau des Zytoskeletts und der EM induziert, spielt.

Die erhöhte Expression Aktin-depolymerisierender Gene (Cofilin 2, Thymosin β 4) spricht für einen neuen Weg, auf dem es zu der reduzierten Kontraktionskraft in der DCM kommen könnte und repräsentiert eine Reexpression fetaler Gene.

3. Reaktivierung fetaler Programme

Die Reaktivierung fetaler Programme ist ein charakteristisches Merkmal der DCM. Für dieses Geschehen wurden sowohl bekannte (ANF, Carp) als auch bisher unbekannte (Cofilin 2, Thymosin β 4) Belege gefunden.

4. Gestörte Kalziumhomöostase

Die Inhibition der SERCA trägt wesentlich zu dem gestörten Kalziumgleichgewicht in der DCM bei. Mit dem Nachweis der verminderten S100 A1 Expression konnte ein neuer Faktor, der wahrscheinlich für die reduzierte SERCA Aktivität in der DCM mitverantwortlich ist, identifiziert werden.

5. Protektive und pathologische Signalwege

In der kompensatorischen Phase der DCM findet ein Balance protektiver und pathologischer Signalwege statt. Die Störung dieses Gleichgewichts ist vermutlich für den Übergang zum Herzversagen verantwortlich [Hoshijima und Kenneth, 2002; Chien, 2000]. In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass im Endstadium der DCM eine verminderte Expression anti-apoptotischer Gene (NF-ATc, TERT) sowie eine erhöhte Produktion des pro-apoptotischen Proteins Id3 stattfindet. Die hier detektierten Gene stellen bisher nicht beschriebene Signalwege

der Apoptose in der DCM dar. Weiterhin deutet die verminderte Kallistatin Expression einen Widerstreit pro- und anti-fibrotischer Signale in der DCM an.

6. Identifizierung potentieller neuer Therapieansätze

TERT, S100A1 und Annexin I, deren differentielle Expression in dieser Arbeit detektiert wurde, stellen möglicherweise Kandidaten für neue therapeutische Ansätze dar, da ihre Substitution beziehungsweise Überexpression bei anderen Erkrankungen oder in Zellkulturstudien positive Resultate zeigte.

7. Detektion eines potentiellen diagnostischen Markers

Die erhöhte FABP4 mRNA Expression lässt zusammen mit Studien bei anderen Herzschäden vermuten, dass das korrespondierende Protein auch in der DCM im Blut erhöht sein und einen neuen diagnostischen Marker darstellen könnte.

Diese Ergebnisse belegen, dass mit der vorliegenden Arbeit neue Erkenntnisse über die molekularen Grundlagen der DCM gewonnen werden konnten. Sie zeigen neue Pathomechanismen und Signalwege auf. Einigen der hier detektierten Gene könnte eine diagnostische oder therapeutische Bedeutung zukommen. Um die protektive beziehungsweise pathologische Funktion sowie die diagnostische oder therapeutische Eignung der differentiell exprimierten Gene nachzuweisen, sind weiterführende Studien in Zellkulturen oder an Tiermodellen sowie serologische Untersuchungen von DCM-Patienten notwendig.

VII. SUMMARY

Millions of patients worldwide are affected by DCM, a disease caused by complex interactions of genetic factors, lifestyle and environment. Upon this stimuli the heart reacts with a morphological remodeling. Being initially compensatory, this mechanism finally becomes uncontrollable, leading to insufficiency and resulting in heart failure. Earlier studies enlightened some of the molecular changes underlying this process [Seidman and Seidman, 2001; Hoshijima and Kenneth, 2002].

The recent development of gene arrays allows the simultaneous investigation of large groups of genes resulting in a broad overview of the changes in gene expression in certain medical conditions [Cook and Rosenzweig, 2002].

This technique as well as Northern and Western blot analysis was used in this study to compare tissue from patients suffering from DCM with healthy tissue in order to get new insights into the pathophysiology of the disease.

First the procedure of the array analysis had to be optimised and the threshold criteria for the evaluation had to be defined. In order to avoid the identification of false positive genes, stringent boundary values were set. Thus, not all differentially expressed genes could be identified by the array analysis. Exemplarily, this was shown by the investigation of desmin, which did not meet the threshold criteria, but displayed an upregulation in Northern blot analysis. The advantage of the standards used is the prevention of gaining false positive findings. The identification of three marker genes, whose differential expression is characteristic for DCM, as well as the comparison of the results with the literature and the confirmation of some observations by Northern and, mainly, Western blot analysis are also indicating a high significance of the data from the array analysis.

As a pre-requisite for the Western blot analysis, the constitutive expression of GAPDH was demonstrated, proofing its suitability as an internal control.

In total, 25 differentially expressed genes belonging to several functional groups and mostly representing new aspects in the pathophysiology of DCM, could be identified.

1. Inflammation

The downregulation of inflammatory genes (LFA1, Rantes, PLA2R) and the upregulation of the anti-inflammatory protein annexin I indicate, that the studied samples either were affected by a non-inflammatory form of DCM or that an inflammation was antagonised by annexin I.

2. Remodeling

This study revealed new insights into the remodeling of the myocardium, a characteristic feature of DCM:

The detection of the modified N-cadherin expression and the reduced plakoglobin production add to other studies, describing a remodeling of the intercalated disc and indicate, that the force transduction between myocytes and their connection with each other is affected.

The upregulation of integrin $\beta 1$ mRNA and protein show, that integrin $\beta 1$ seems to have a key function in a signaling pathway by which mechanical stress induces the remodeling of the cytoskeleton and the extracellular matrix.

The observation of the increased expression of actin-depolymerising genes (cofilin 2, thymosin $\beta 4$) point at a new mechanism by which the diminished contractility in DCM could be caused and represents a reexpression of genes mainly active during fetal development.

3. Reactivation of fetal programs

The reactivation of fetal programs is a characteristic symptom of DCM. Some genes previously described to be involved in this process (ANF, Carp) as well as genes not known to participate (cofilin 2, thymosin $\beta 4$) have been identified.

4. Disturbed calcium homeostasis

The inhibition of the SERCA contributes mainly to the disturbed calcium homeostasis in DCM. By the detection of the S100A1 downregulation, a new factor responsible for the reduced SERCA activity in DCM, might have been identified.

5. Protective and pathological pathways

In the compensatory stage of DCM protective and pathological pathways are in a delicate balance. Disturbances of this equilibrium are possibly responsible for the initiation of heart failure [Hoshijima and Kenneth, 2002] [Chien, 2000]. In this study a downregulation of anti-apoptotic genes (NF-ATc, TERT) and an upregulation of a pro-apoptotic protein (Id3) could be testified. These genes illustrate as yet unpublished pathways of apoptosis in DCM. The reduced expression of Kallistatin indicates a balance of pro- and anti-fibrotic signals in DCM.

6. Identification of potentially new therapeutic strategies

TERT, S100A1 and annexin I, which are differentially expressed in DCM, might be candidates for new therapeutic strategies, as their substitution or overexpression gained positive results in other diseases or in cell culture studies.

7. Detection of a potentially new diagnostic marker

The upregulation of FABP4 mRNA indicates together with other studies that the corresponding protein could be increased in the blood of DCM patients and may represent a new diagnostic marker.

These results demonstrate that new insights into the molecular processes underlying DCM could be gained by this study. They point at new pathomechanisms and signal transduction pathways. Some of the detected genes could be of diagnostic or therapeutic function. In order to prove the protective or pathological effect or the diagnostic respectively therapeutic suitability of the differentially expressed gene, ongoing studies in cell culture or animal models as well as in sera of DCM patients will be necessary.

VIII. ANHANG

1. Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Donay A, Kostin S, Hein S, Klövekorn W-P, Schaper J, Zimmermann R. N-cadherin mRNA but not protein is significantly increased in patients with dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 2002; 34: A20

Donay A, Hein S, Böngler K, Klövekorn W-P, Schaper J, Zimmermann R. Gene array analysis of differential gene expression in dilated cardiomyopathy. In *American heart association-Scientific conference on advances in the molecular and cellular mechanisms of heart failure*, Salt Lake City Utah; 2002

2. Verzeichnis der verwendeten Materialien und Reagentien

2.1 Arbeitsvorschriften und Allgemeine Materialien

2.1.1 Arbeitsvorschriften

Alle Versuche wurden mit Handschuhen, sowie autoklavierten Materialien und Reagentien durchgeführt. Die Arbeiten mit RNA wurden mit DEPC-behandeltem autoklaviertem Wasser durchgeführt, da DEPC RNAsen inaktiviert.

Die Arbeiten mit radioaktiven Substanzen erfolgten nach der Strahlenschutzverordnung. Alle Versuche mit Bakterien wurden gemäß dem Gentechnikgesetz durchgeführt.

2.1.2 Allgemeine Materialien und Reagentien

Allgemeine Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, Filterspitzen usw. werden nicht extra aufgeführt.

Geräte und Materialien

Autoklav, Varioklav, Typ 500 (H-P Labortechnik, München)

pH-Meter (Schott, Mainz)

Heizplatte/Magnetrührer (IKA-Labortechnik, Staufen)

Wasserbäder (IKA-Labortechnik, Staufen; Köttermann, Uetze)

Ultra-Turrax Homogenisator (IKA-Labortechnik, Staufen)

Betastrahlendzähler (β -Counter) (Berthold, Bad Wildbad)

Hybridisierungsofen + Hybridisierungsröhren (Biometra, Göttingen)

UV-Transilluminator (Herolab, Wiesloch)

Kamera (Polaroid, UK)

Röntgenfilme X-Omat AR (Kodak, Stuttgart)

Filmentwicklungsmaschine Optimax (Beetz, Langen)

PhosphorImager Storm 860, Screens (Molecular Dynamics, Freiburg)

SigmaStat Software (Jandel, San Raffael, CA, USA)

DEPC-H₂O

0,1 % DEPC (Roth, Karlsruhe) in H₂O; bei 37 °C über Nacht inkubieren; autoklavieren

2.2 Untersuchungsmaterial: Kontroll-Proben

RNA

Firma BD Clontech, Heidelberg:

Human heart total RNA, Lot # 0070014

Firma BioChain Institute Inc, Hayward, USA:

Human adult normal heart total RNA, Lot # A405045

Human adult normal heart total RNA, Lot # A405047

Protein

Firma BD Clontech, Heidelberg:

Human heart protein medley, Lot # 0100053

Firma BioChain Institute Inc, Hayward, USA:

Human adult normal heart total protein, Lot # A409033

2.3 RNA-Isolierung

2.3.1 RNA-Isolierung mittels Qiagen RNeasy® Midi Kit

Geräte und Materialien

Zentrifuge: Multifuge 3 S-R (Heraeus, Hanau)

Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (Falcon, Le Pont de Claix, FR)

Reagentien (soweit nicht im Kit enthalten)

Qiagen RNeasy® Midi Kit (Fa. Quiagen, Hilden)

14,3 M β -Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe)

Proteinase K 20 mg/ml (Promega, Mannheim)

Ethanol (Roth, Karlsruhe)

2.3.2 RNA Isolierung nach Chomczynski und Sacchi

Geräte und Materialien

Zentrifugen: Sorvall RC-5B mit Rotor SS34 (Sorvall, Hanau)

Kühlzentrifuge (Eppendorf, Hamburg)

Vakuum Konzentrator Speed-Vac SVC100 (GMI, Clearwater, USA)

Heizblock (Eppendorf, Hamburg)

Proben-Schüttler (Vortex) (IKA, Labortechnik, Staufen)

Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (Falcon, Le Pont de Claix, FR)

Reagentien

Guanidinium-Puffer:

4 M Guanidiniumthiocyanat (Roth, Karlsruhe)

25 mM Na-Citrat, pH 7 (Roth, Karlsruhe)

0,5 % N-Lauryl-Sarcosylsarcosin (Sigma, Deisenhofen)

0,1 M β -Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe)

Na-Acetat, Aqua-Roti-Phenol, Chloroform, Isoamylalkohl, Isopropanol, Ethanol (Roth, Karlsruhe)

2.4 Nukleinsäuren-Quantifizierung und Gelelektrophorese

Geräte und Materialien

Spektrophotometer 4054, UV/visible (Pharmacia Biosystems, Freiburg)

Präzisionsküvetten (Hellma, Nürnberg)

Heizblock (Eppendorf, Hamburg)

Elektrophoresekammer + Kamm (Werkstatt MPI)

Powersupply (Pharmacia Biosystem)

Reagentien

SeaKem LE-Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf)

SeaKem GTG-Agarose für die Insertisolierung (Biozym, Hess. Oldendorf)

Ethidiumbromid 10 mg/ml und 1 mg/ml (Roth, Karlsruhe)

RNA-Gößenmarker: G319 A (Promega, Mannheim)

DNA-Gößenmarker: Lamda DNA / *Hind* III-Fragmente (Promega, Mannheim)

phi X 174 RF DNA / *Hae* III-Fragmente (Promega, Mannheim)

1 kb DNA-Ladder (Promega, Mannheim)

10 x MOPS-Puffer:

0,2 M MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure) (Roth, Karlsruhe)

50 mM Na-Acetat (Roth, Karlsruhe)

10 mM NA-EDTA (Ethylendiamintetraacetat) (Roth, Karlsruhe)

in 1 l DEPC-Wasser mit NaOH auf pH 7.0 einstellen

10 x TBE:

1 M Tris/HCL pH 8.0 (Roth, Karlsruhe)

1 M Borsäure (Roth, Karlsruhe)

25 mM EDTA (Roth, Karlsruhe)

RNA-Ladungspuffer:

1,5 ml deionisiertes Formamid (bei -20 °C lagern) (Gibco, Karlsruhe)

0,3 ml 10 x MOPS-Puffer

0,48 ml Formaldehyd (Merck, Frankfurt a.M.)

0,2 ml Glycerol ((Roth, Karlsruhe)

0,16 ml Bromphenolblau 10 % (Roth, Karlsruhe)

0,36 ml DEPC-Wasser

bei -20 °C lagern

DNA-Ladungspuffer:

10 mg Bromphenolblau (Sigma, Deisenhofen)

20 mg Xylolcyanol (Sigma, Deisenhofen)

20 mg Orange G (Sigma, Deisenhofen)

2,7 ml Glycerol (Roth, Karlsruhe)

2,5 ml 0,2 M EDTA pH 8,0 (Roth, Karlsruhe)

mit 10x TBE auf 10 ml auffüllen, aliquotieren

2.5 Array Analyse

Geräte und Materialien

Thermocycler Cetus (Perkin Elmer, Weiterstadt)

Tischzentrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg)

AtlasImageTM2.01 Software (Clontech, Heidelberg)

Reagentien (soweit nicht im Kit enthalten)

Human AtlasTMCardiovascular Array (BD Clontech, Heidelberg)

Human AtlasTM 1.2 Array (BD Clontech, Heidelberg)

[α -³³P] dATP (Amersham, Freiburg)

10 x Denaturierungspuffer:

1 M NaOH (Merck, Darmstadt)

10 mM EDTA (Roth, Karlsruhe)

2 x Renaturierungspuffer: 1 M NaH₂PO₄, pH 7.0 (Roth, Karlsruhe)

Heringssperma DNA 10 mg/ml (Sigma, Deisenhofen)

20 x SSC *ultra pure* (Gibco BRL, Karlsruhe)

20 % SDS (Roth, Karlsruhe)

200 g SDS in 1000 ml DEPC-Wasser bei 68 °C lösen
mit konz. HCl (Roth, Karlsruhe) auf pH 7.2 einstellen

Waschpuffer:

2 x SSC / 0,1 % SDS

1 x SSC / 0,1 % SDS

Strippuffer: 0,5 % SDS

2.6 Northern Blot Analyse

2.6.1 RNA-Gelelektrophorese: siehe 2.4

2.6.2 Northern Transfer

Geräte und Materialien

UV-Stratalinker 1800 (Stratagene, Heidelberg)

Duralon UVTMMembran (Stratagene, Heidelberg)

3MM-Papier (Whatmann, Kent, UK)

Reagentien

20 x SSC *ultra pure* (Gibco BRL, Karlsruhe)

2.6.3 Herstellung von Sonden

2.6.3.1 Erzeugung und Transformation kompetenter Bakterien /
Amplifikation und Plasmidpräparation

Geräte und Materialien

Laminar Flow (Ceag Schirp, Selm-Bork)

Bakterienschüttler Certomat HK (B.Braun Biotech)

Brutschrank Cytoperm (Heraeus, Hanau)

Spektrophotometer 4054, UV/visible (Pharmacia Biosystems, Freiburg)

Präzisionsküvetten (Hellma, Nürnberg)

Zentrifuge: Sorvall RC-5B mit Rotor GS3 (Sorvall, Hanau)

VacManTM (Promega, Mannheim)

Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden)

E.coli JM109 (Promega, Heidelberg)

Reagentien (soweit nicht im Wizard Kit enthalten)

Wizard Plus Mini/Midiprep Purification System (Promega, Mannheim)

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium):

10 g/l Pepton aus Casein tryptisch verdaut (Roth, Karlsruhe)

5 g/l Hefeextrakt (Roth, Karlsruhe)

5 g/l NaCl (Roth, Karlsruhe)

pH 7,0 einstellen, autoklavieren

LB-Platten:

LB-Medium

1,5 % Agar (Roth, Karlsruhe)

Ampicillin (Roth, Karlsruhe)

Stammlösung: 60 mg/ml in sterilem Wasser; Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

In LB-Medium: Verdünnung auf 60 $\mu\text{g/ml}$

CaCl_2 (Merck, Frankfurt a.M.)

Glycerol 86 %, steril (Roth, Karlsruhe)

2.6.3.2 Sequenzierung

A.L.F. DNA Sequencer (Pharmacia LKB, Freiburg)

AutoReadTM Sequencing Kit (Pharmacia LKB, Freiburg)

2.6.3.3 Restriktion

Thermoblock (Thermodux, Wertheim)

Restriktionsendonukleasen + Puffer:

Eco RI; *Not* I; *Rsa* I; / *Xho* (Promega, Mannheim)

Pac I (NEB, Frankfurt a.M.)

Gelelektrophorese: siehe 2.4

2.6.3.4 Insetisolierung

Gelelektrophorese und Konzentrationsmessung: siehe 2.4

UltraCleanTM DNA Purification Kit (Dianova, Hamburg)

Tischzentrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg)

2.6.3.5 Sondenmarkierung

Geräte und Materialien

Sonden:

18S Oligonukleotid: 5'-CGGAACTACGACGGTATCTG-3' (MWG, Ebersberg)

cDNA-Sonden: siehe Tabelle 6, Kapitel III; 5.2

Tischzentrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg)

Thermomixer (Eppendorf, Hamburg)

Reagentien

RediprimeIITM RandomPrime Labeling Kit (Amersham, Freiburg)

T4-Polynucleotidkinase + PNK-Puffer (Promega, Mannheim)

$[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP (Amersham, Freiburg)

$[\gamma^{32}\text{P}]$ dATP (Amersham, Freiburg)

0,5 M EDTA (Roth, Karlsruhe)

2.6.3.6 Einbaukontrolle

Liquid Scintillation Analyser (Pakard BioScience, Meriden, USA)

Chromatographiekammer (Werkstatt MPI)

Chromatographiepapier DE 81 (Whatmann, Kent, UK)

0,5 M Kaliumdihydrogenphosphat (Roth, Karlsruhe)

2.6.3.7 Hybridisierung

Reagentien

Hybridisierungspuffer für cDNA-Sonden:

50 % deionisiertes Formamid (bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagern) (Gibco, Karlsruhe)

1 M NaCl (Roth, Karlsruhe)

10 % Dextransulfat (Roth, Karlsruhe)

1 % SDS (Roth, Karlsruhe)

0,1 mg/ml ssDNA (Sigma, Deisenhofen)

ExpressHyb (Clontech, Heidelberg)

20 x SSC *ultra pure* (Gibco BRL, Karlsruhe)

20 % SDS, pH 7,2 (Roth, Karlsruhe)

Waschpuffer:

2 x SSC / 0,1 % SDS

1 x SSC / 0,1 % SDS

Strippuffer: 0,1 % SDS

2.7 Western Blot Analyse

2.7.1 Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung

Geräte und Materialien

Ultraschall Sonikator (Branson, Dietzenbach)

Kühlzentrifuge (Eppendorf, Hamburg)

Photometer Tecan Spectra (Tecan GmbH, Crailsheim)

Reagentien

Ripa-Puffer:

10 mM Tris pH 7,4 (Roth, Karlsruhe)

0,15 M NaCl (Roth, Karlsruhe)

1 % Deoxycholic acid (Merck, Frankfurt a.M.)

1 % Triton-X 100 (Roth, Karlsruhe)

0,1 % SDS (Roth, Karlsruhe)

1 mM Na-Vanadat (Sigma, Deisenhofen)

0,57 mM Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF) (Roth, Karlsruhe)

DC Protein assay (BioRad, München)

BSA (Sigma, Deisenhofen)

2.7.2 Western Blot Analyse

2.7.2.1 Elektrophorese und Transfer

Materialien und Geräte

Power Supply (Amersham, Freiburg)

Vertikale Elektrophoresekammer (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

Blot Modul (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

Schwämme (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

NuPage® 4-12 % Bis-Tris Gel (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

Nitrocellulose Membran (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

Reagentien

Laemmli-Sample Buffer (Biorad, München)

β-Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe)

Laufpuffer:

50 ml NuPage® MES Running buffer (20x) (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

950 ml steriles Wasser

Laufpuffer für innere Kammer:

200 ml Laufpuffer

500 µl NuPage® Antioxidant (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

Transferpuffer: (für 2 Gele)

50 ml NuPage® Transfer buffer (20x) (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

1 ml NuPage® Antioxidant (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

200 ml Methanol (Roth, Karlsruhe)

749 ml steriles Wasser

Multi Mark™ Multi Color Standard (Invitrogen, Groningen, Niederlande)
Ponceau S:

- 0,5 % Ponceau S (Merck, Darmstadt)
- 40 % Methanol (Roth, Karlsruhe)
- 15 % Eisessig (Roth, Karlsruhe)

2.7.2.2 Immunologische Detektion

Geräte und Materialien

ECL-Filme (Amersham, Freiburg)

Reagentien

10 x TBS (Tris buffered saline):

- 200 mM Tris (Roth, Karlsruhe)
- 1,37 M NaCl (Roth, Karlsruhe)
- pH 7,6 einstellen mit konz. HCl (Roth, Karlsruhe)

TBS-T:

- 1x TBS
- 0,1 % Tween-20 (Roth, Karlsruhe)

Milchpulver (Roth, Karlsruhe)

ECL-Western blotting detection reagent (Amersham, Freiburg)

Stripping-Puffer:

- 100 mM β -Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe)
- 2 % SDS (Roth, Karlsruhe)
- 62,5 mM Tris/HCl pH 6,7 (Roth, Karlsruhe)

2.8. Immunhistochemie und Konfokalanalyse

Geräte und Materialien

Objekträger, Deckgläser (Menzel/ Roth, Karlsruhe)

CM 3000 Kryostat (Leica, Solms)

DM-RB Fluoreszenz-Mikroskop (Leica, Solms)

Lasermikroskop Leica TCNT mit SoftwareSCANware 05.1b (Leica, Solms)

Silicon Graphics Workstation mit Software Imaris® (Bitplane AG, Zürich, Schweiz)

Feuchte Kammer (Werkstatt, MPI)

Reagentien

Tissue-Tek (Miles)

1 x PBS:

- 137 mM NaCl (Roth, Karlsruhe)
- 2,7 mM KCl (Roth, Karlsruhe)
- 7,4 mM Na_2HPO_4 (Roth, Karlsruhe)
- 1,5 mM KH_2PO_4 (Roth, Karlsruhe)
- auf pH 7,4 einstellen

Mowiol (Höchst, Frankfurt a.M.)

4 % Paraformaldehyd (Merck, Frankfurt a.M.)
in PBS; mit NaOH auf pH 7,4 einstellen

3. Abkürzungsverzeichnis

α -1AR	α -1 Adrenorezeptor
Abb.	Abbildung
A-CAM	A-cell adhesion molecule (=N-Cadherin)
ACE	Angiotensin converting enzyme
ADF	Aktin depolymerisierender Faktor
ADP	Adenosindiphosphat
(m)AK	(monoklonaler) Antikörper
ANF	atrialer natriuretischer Faktor
ANT	Adenin Nukleotid Translokator
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
Ca	Kalzium
CaMKinase	Kalzium/Calmodulin abhängige Kinase
Carp	cardiac ankyrin repeat protein
CTNNA	α -Catenin
CTNNB	β -Catenin
cpm	counts per minute (Zerfälle pro Minute)
DAG	Diacylglycerol
(d)ATP	(Desoxy)adenosintriphosphat
DCM	dilatative Kardiomyopathie
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
(c)DNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EF	ejection fraction (Auswurffraktion)
EM	extrazelluläre Matrix
ERK	extrazellulär-regulierte Kinase
EST	expressed sequence tag
FABP	fatty acid binding protein
F-Aktin	Aktinfilament
g	Gravitationskonstante
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
G-Aktin	globuläres Aktin
GATA	GATA bindendes Protein
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
h	Stunde
HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
(b)HLH	basisches Helix-loop-helix Protein
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
Id3	inhibitor of DNA binding

IgG	Immunoglobulin G
ISEL	in situ end labeling
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
LFA	lymphocyte function associated antigen
LIM	Lin1-Isl1-Mec3
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck (pressure)
M, mM, pM	Molar, millimolar, picomolar
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
mg, µg	Milligramm, Mikrogramm
MHC	myosin heavy chain
min	Minute
ml, µl	Milliliter, Mikroliter
MLC2	regulatory myosin light chain
MLP	muscle LIM-domaine protein
mm, nm	Millimeter, Nanometer
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
Na	Natrium
NADD	Nikotinamidadenin Dinukleotid Dehydrogenase
NF-ATc/n	nuclear factor of activated T-cells zytosolische/ nukleäre Form
NF-κB	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-synthase
OD	optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat gepuffertes Kochsalz)
(RT)-PCR	(reverse transcription) polymerase chain reaction
PIP2	1-Phosphatidyl-D-myo-inosit-4,5-biphosphat
PLA2 (R)	Phospholipase A2 (Rezeptor)
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
PNK	Polynukleotidkinase
RAAV	rekombinantes Adenoassoziertes Virus
Rantes	regulated on activation, normal T-cell expressed
(m)RNA	(messenger) ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute
SAGE	serial analysis of gene expression
sec	Sekunde
SERCA	sarkoplasmatisches Retikulum Kalzium ATPase
SEM	Standardfehler
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOCS	supressor of cytokine signaling
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SSC	standard saline citrat
Tab.	Tabelle
TERT	Telomerase reverse transcriptase

TBE	Tris-Bor-EDTA
TBS	tris buffered saline (Tris gepuffertes Kochsalz)
TGF	transforming growth factor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tnk	Tyrosinkinase
TOGA	total gene expression analysis
TOT	Tropomodulin overexpressing
TRITC	Tetramethylrhodamin Isothiocyanat
TUNEL	terminal deoxynukleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling
U	Units (Einheiten)
UV	ultraviolettes Licht
WHO	World Health Organisation

IX. LITERATURVERZEICHNIS

- Aihara Y, Kurabayashi M, Saito Y, Ohyama Y, Tanaka T, Takeda S, Tomaru K, Sekiguchi K, Arai M, Nakamura T, Nagai R (2000): Cardiac ankyrin repeat protein is a novel marker of cardiac hypertrophy: role of M-CAT element within the promoter. *Hypertension* 36:48-53.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J (1994): "Molecular biology of the cell." New York: Garland Publishing, Inc.
- Anastasiadis P, Reynolds AB (2001): Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. *Curr Opin Cell Biol* 13:604-610.
- Angst BD, Marozzi C, Magee AI (2000): The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci* 114:629-641.
- Arber S, Hunter JJ, Ross JJ, Hongo M, Sansig G, Borg J, Perriard JC, Chien KR, Caroni P (1997): MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell* 88:393-403.
- Arell D, Neverova I, Eyk J (2001): Cardiovascular proteomics-evolution and potential. *Circ Res* 88:763-773.
- Arregui C, Pathre P, Lilien J, Balsamo J (2000): The nonreceptor tyrosine kinase fer mediates cross-talk between N-cadherin and β 1-Integrins. *J Cell Biol* 149:1263-1274.
- Aukrust P, Ueland T, Muller F, Andreassen A, Nordoy I, Aas H, Kjekshus J, Simonsen S, Froland S, Gullestad L (1998): Elevated circulating levels of C-C chemokines in patients with congestive heart failure. *Circulation* 97:1136-43.
- Aumailley M, Pesch M, Tunggal L, Gaill F, Fassler R (2000): Altered synthesis of laminin 1 and absence of basement membrane component deposition in (beta) 1 integrin-deficient embryoid bodies. *J Cell Sci* 113:259-268.
- Azuma M, Fukui T, Tamatani T, Motegi K, Hoque MO, Yoshida H, Sato M (1996): Expression of integrin subunits in normal and malignant salivary gland cell clones and its regulation by transforming growth factor beta 1. *Cancer Let* 109:91-99.
- Badorff C, Lee GH, Lamphear BJ, Martone ME, Campell KP, Rhoads RE, Knowlton KU (1999): Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nat Med* 5:320-326.
- Ballweber E, Hannapel E, Huff T, Mannherz H (1997): Mapping the binding site of thymosin beta 4 on actin by competition with G-actin binding proteins indicates negative co-operativity between binding sites located on opposite subdomains of actin. *Biochem J* 327:787-793.

- Balsamo J, Leung T, Ernst H, Zanin MK, Hoffman S, Lilien J (1996): Regulated binding of PTP1B-like phosphatase to N-Cadherin: control of cadherin mediated adhesion by dephosphorylation of beta-catenin. *J Cell Biol* 134:801-813.
- Bang ML, Mudry R, McElhinny A, Trombitás K, Geach A, Yamasaki R, Sorimachi H, Granzier H, Gregorio C, Labeit S (2001): Myopallidin a novel 145kD sarcomeric protein with multiple roles in Z-disc and I-Band protein assemblies. *JCB* 153:413-428.
- Barger P, Kelly D (1999): Fatty acid utilization in the hypertrophied and failing heart: molecular regulatory mechanisms. *Am J Med Sci* 318:36-42.
- Barrans J, Stamatiou D, Liew C (2001): Construction of a human cardiovascular cDNA microarray: portrait of a failing heart. *Biochem Biophys Res Comm* 280:964-969.
- Barrans JD, Allen PD, Stamatiou D, Dzau VJ, Liew C-C (2002): Global Gene Expression Profiling of End-Stage Dilated Cardiomyopathy Using a Human Cardiovascular-Based cDNA Microarray. *Am J Pathol* 160:2035-2043.
- Benvenuti LA, Higuchi ML, Reis MM (2000): Upregulation of adhesion molecules and class I HLA in the myocardium of chronic chagasic cardiomyopathy and allograft rejection, but not dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Pathol* 9:111-117.
- Beuckelmann D, Nabauer M, Kruger C, Erdmann E (1995): Altered diastolic Ca²⁺ handling in human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Am Heart J* 129:684-689.
- Bibeovski S, Zhou Y, McIntoch JM, Zigmond R, Dunlap M (2000): Functional nicotinic acetylcholin receptors that mediate ganglionic transmission in cardiac parasympathic neurons. *J Neurosci* 20:5076-5082.
- Bierkamp C, McLaughlin K, Schwarz H, Huber O, Kemler R (1996): Embryonic heart and skin defects in mice lacking plakoglobin. *Dev Biol* 180:780-785.
- Bierkamp C, Schwarz H, Huber O, Kemler R (1999): Desmosomal localization of beta-catenin in the skin of plakoglobin null-mutant mice. *Development* 126:371-381.
- Bione S, D'Adamo P, Maestrini E, Gedeon AK, Bolhuis PA, Toniolo D (1996): A novel X-linked gene, G4.5 is responsible for Barth syndrome. *Nat Genet* 12:385-389.
- Bishop J, Greenbaum R, Gibson D, Yacoub M, Laurent G (1990): Enhanced deposition of predominantly type I collagen in myocardial disease. *J Mol Cell Card* 22:1157-1165.
- Blaschke F, Stawowy P, Goetze S, Hintz O, Gräfe M, Kintscher U, Fleck E, Graf K (2002): Hypoxia activates β 1 Integrin via ERK1/2 and p38 MAP kinase in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Comm* 296:890-896.

- Blasco M (2002): Lack of telomerase gives mice heart failure. ELSO.2002; 1.July:<http://www.news.bmn.com>
- Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S (1999): Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 21:285-288.
- Bowles KR, Gajarski R, Porter P, Goytia V, Bachinski L, Roberts R, Pignatelli R, Towbin JA (1996): Gene mapping of familial autosomal dominant dilated cardiomyopathy to chromosome 10q21-23. *J Clin Invest* 98:1355-1360.
- Bowles N, Bowles K, Towbin J (2000): The final common pathway hypothesis and inherited cardiovascular disease. *Herz* 25:168-175.
- Bowling N, Walsh RA, Song G, Estridge T, Sandusky GE, Fouts RL, Mintze K, Pickard T, Roden R, Bristow MR, Sabbah HN, Mizrahi JL, Gromom G, King GL, Vlahos CJ (1999): Increased protein kinase C activity and expression of Ca²⁺-sensitive isoforms in the failing human heart. *Circulation* 99:334-337.
- Bozkurt B, Torre-Amione G, Warren MS, Whitmore J, Soran O, Feldman A, Mann D (2001): Results of targeted anti-tumor necrosis factor therapy with etanercept (ENBREL) in patients with advanced heart failure. *Circulation* 103:1044-1047.
- Burkin D, Wallace G, Nicole K, Kaufman D, Kaufman S (2001): Enhanced expression of the alpha7 beta 1 integrin reduces muscular dystrophy and restores viability in dystrophic mice. *J Cell Biol* 152:1207-1218.
- Campbell D (2001): The kallikrein-kinin system in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28:1060-1065.
- Carforio AL, Goldman JH, Haven AJ (1996): Evidence for autoimmunity to myosin and other heart specific autoantigens in patients with dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 54:157-163.
- Ceselli D, Jagoniuk I, Barlucchi L, Beltrami A, Hintze T, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P (2001): Oxidative stress-mediated cardiac cell death is a major determinant of ventricular dysfunction and failure in dog dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 89:279-286.
- Chen B, Han B, Sun X, Lim R (1997): Inhibition of muscle-specific gene expression by Id3: requirement of the C-terminal region of the protein for stable expression and function. *Nucl. Acids. Res.* 25:423-430.
- Chien KR (2000): Genomic circuits and the integrative biology of cardiac diseases. *Nature* 407:227-223.

- Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Christ T, Wettwer E, Dobrev D, Adolph E, Knaut M, Wallukat G, Ravens U (2001): Autoantibodies against the beta 1 adrenoceptor from patients with dilated cardiomyopathy prolong action potential duration and enhance contractility in isolated cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 33:1515-1525.
- Chu W, Burns D, Swerlick R, Presky D (1995): Identification and characterization of a novel cytokine-inducible nuclear protein from human endothelial cells. *JBC* 270:10236-10245.
- Clontech (2000): Atlas cDNA Expression Arrays- User manual.
- Cobet R, Gutzeit K, Bock HE (1998): Dilatative Kardiomyopathie. In Peter HH, Pfreundschuh M, Philipp T, Schölmerich J, Schuster HP, Sybrecht GW (eds): "Klinik der Gegenwart." München; Wien; Baltimore: Urban und Schwarzenberg, pp IX, 1:4-21.
- Cohn J, Ferrari R, Sharpe N (2000): Cardiac remodeling- Concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Col Cardiol* 35:569-582.
- Cohn RD, Durbeej M, Moore SA, Coral-Vazquez R, Prouty S, Campbell KP (2001): Prevention of cardiomyopathy in mouse models lacking the smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex. *J Clin Invest* 107:R1-7.
- Cook S, Rosenzweig A (2002): DNA Microarrays. *Circ Res* 91:559-564.
- Coral-Vazquez R, Cohn RD, Moore SA, Hill JA, Weiss RM, Davisson RL, Straub V, Barresi R, Bansal D, Hrstka RF, Williamsson R, Campbell KP (1999): Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy. *Cell* 98:465-476.
- Coumans J, Yeoh T, Seeto R, Keogh A, Brennan K, Gunning P, Hardeman E, Remedios C (1997): Variations in the relative mRNA levels of actins and myosin heavy chains do not produce corresponding differences in their proteins in the adult human heart. *J Mol Cell Cardiol* 29:895-905.
- D'Amico M, Di Filippo C, La M, Solito E, McLean P, Flower R, Oliani S, Peretti M (2000): Lipocortin 1 reduces myocardial ischemia-reperfusion injury by affecting local leukocyte recruitment. *FASEB J* 14:1867-1869.

- Damås J, Eiken H, Øie E, Bjerkeli V, Ynestad A, Ueland T, Tønnessen T, Geiran O, Aass H, Simonsen S, Christensen G, Frøland S, Attramadal H, Gullestad L, Aukrust P (2000): Myocardial expression of CC- and CXC-chemokines and their receptors in human end-stage heart failure. *Cardiovasc Res* 47:778-87.
- Dávila-Román V, Vedala G, Herrero P, Fuentes L, Rogers J, Kelly D, Gropler R (2002): Altered myocardial fatty acid and glucose metabolism in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 40:271-277.
- De Villiers M, Lochner A (1986): Mitochondrial Ca²⁺ fluxes: role of free fatty acids, acyl-Co A and acylcarnitine. *Biochim Biophys Acta* 876:309-317.
- Deindl E (2001): 18S ribosomal RNA detection on Northern blot employing a specific oligonucleotide. *BioTechniques* 31:1250-1252.
- Dempsey A, Dzau VJ, Choong-Chin L (2001): Cardiovascular genomics: estimating the total number of genes expressed in the human cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol* 33:1879-1886.
- Devaux B, Scholz D, Hirche A, Kloevekorn WP, Schaper J (1997): Upregulation of cell adhesion molecules and the presence of low grade inflammation in human chronic heart failure. *Eur Heart J* 18:470-479.
- Diaz-Munoz M, Hamilton S, Kaetzle M, Hazarika P, Dedman J (1990): Modulation of Ca²⁺ release channel activity from sarcoplasmic reticulum by annexin VI. *J Biol Chem* 265:15894-15899.
- Dörner A, Schultheiss H-P (2000): The myocardial expression of the adenine nucleotide translocator isoforms is specifically altered in dilated cardiomyopathy. *Herz* 25:176-180.
- Durand JB, Bachinski LL, Bieling LC, Czernuszewicz GZ, Abchee AB, Yu QT, Tapscott T, Hill R, Ifegwu J, Marian AJ (1995): Localization of a gene responsible for familial dilated cardiomyopathy to chromosome 1q32. *Circulation* 92:3387-3389.
- Ehler E, Horowitz R, Zuppinger C, Price RL, Perriard E, Leu M, Caroni P, Sussman M, Eppenberger HM, Perriard JC (2001): Alterations at the intercalated disk associated with the absence of muscle LIM protein. *J Cell Biol* 153:763-772.
- Ehlermann P, Remppis A, Guddat O, Weimann J, Schnabel PA, Motsch J, Heizmann CW, Katus HA (2000): Right ventricular upregulation of the Ca²⁺ binding protein S100 A1 in chronic pulmonary hypertrophy. *Biochim Biophys Acta* 1500:249-255.
- Elsässer A, Kostin S, Hein S, Zimmermann R, Schaper J Remodeling and cell death in failing human myocardium. In Levis BS, Halon DA, Flugelman M, Hradek J (eds): "Coronary heart disease."

- Elsässer A, Suzuki K, Schaper J (2000): Unresolved issues regarding the role of apoptosis in the pathogenesis of ischemic injury and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 32:711-724.
- Emanuelli C, Maestri R, Corradi D, Marchione R, Minasi A, Tozzi Mg, Salis MB, Straino S, Capogrossi MC, Olivetti G, Madeddu P (1999): Dilated and failing cardiomyopathy in bradykinin B(2) receptor knockout mice. *Circulation* 100:2359-2365.
- Fatkin D, MacRae C, Sasaki T, Wolff M, Porcu M, Frenenaux M, Atherton J, Humberto JV, Spudich S, Girolami U, Seidman JG, Seidman C (1999): Missense mutations in the rod domain of the Lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med* 341:1715-1724.
- Felschow D, Civin C, Hoehn G (2000): Characterization of the tyrosin e kinase *tnk1* and its binding with phospholipase C-gamma 1. *Biochem Biophys Res Comm* 273:294-301.
- Ferreira-Cornwell MC, Luo Y, Narula N, Lennox JM, Lieberman M, Radice GL (2002): Remodelling the intercalated disc leads to cardiomyopathy in mice misexpressing cadherins in the heart. *J Cell Science* 115:1623-1634.
- Figulla H, Vetterlein F, Wiegand V, Schuler S, Kreuzer H (1987): Capillary density and oxygen supply in human dilated cardiomyopathy. *Z Kardiol* 76:152-154.
- Flesch M, Schwinger R, Schnabel P, Schiffer F, Gelder I, Bavendiek U, Südkamp M, Kuhn-Regnier F, Böhm M (1996): Sarcoplasmatic reticulum Ca²⁺ ATPase and phospholamban mRNA and protein levels in end-stage heart failure due to ischemic or dilated cardiomyopathy. *J Mol Med* 74:321-332
- Freeman WM, Robertson DJ, Vrana KE (2000): Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *BioTechniques* 29:1042-1055.
- Fridde C, Koga T, Rubin E, Bristow J (2000): Expression profiling reveals distinct sets of genes altered during induction and regression of cardiac hypertrophy. *PNAS* 97:6745-6750.
- Garcia-Castro M, Vielmetter E, Bronner-Fraser M (2000): N-cadherin, a cell adhesion molecule involved in establishment of embryonic left-right asymmetry. *Science* 288:1047-1051.
- Gerull B, Gramlich M, Atherton J, McNabb M, Trombitas K, Sasse-Klaassen S, Seidman JG, Seidman C, Granzier H, Labeit S, Frenneaux M, Thierfelder L (2002): Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy. *Nature Genetics* 30:201-204.
- Goin JC, Borda ES, Auger S, Storino R, Sterin-Borda L (1999): Cardiac (M2) muscarinic cholinceptor activation by human chagasic autoantibodies: association with bradycardia. *Heart* 82:273-278.

- Golla R, Philp N, Safer D, Chintapalli J, Hoffman R, Collins L, Nachmias V (1997): Coordinate regulation of the cytoskeleton in 3T3 cells overexpressing thymosin beta 4. *Cell Motil Cytoskeleton* 38:187-200.
- Goodwin JF (1982): The frontiers of cardiomyopathy. *Br Heart J* 48:1-18.
- Gunja-Smith Z, Morales A, Romanelli R, Woessner J (1996): Remodeling of human myocardial collagen in idiopathic dilated cardiomyopathy. Role of metalloproteinases and pyridinoline cross-links. *Am J Pathol* 148:1639-1650.
- Gunteski-Hamblin A, Song G, Walsh R, Frenzke M, Boivin G, Dorn G, Kaetzel M, Horseman N, Dedman J (1996): Annexin VI overexpression targeted to heart alters cardiomyocyte function in transgenic mice. *Am J Physiol* 270:H: 1091-1100.
- Gwathmey JK, Mc Kinnon R, Schoen FJ, Feldman MD, Grossman W, Morgan JP (1987): Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ Res* 61:70-76.
- Haass M, Kubler W (1997): Nicotine and sympathetic neurotransmission. *Cardiovasc Drugs Ther* 10:657-665.
- Hanasaki K, Arita H (1999): Biological and pathological functions of phospholipase A2 receptor. *Archives of biochemistry and biophysics* 372:215-223.
- Hayashida W, Kihara Y, Yasaka A, Sasayama S (2000): Cardiac calcineurin during transition from hypertrophy to heart failure in rats. *Biochem Biophys Res Com* 273:347-351.
- Hein S, Kostin S, Bauer EP, Klövekorn WP, Schaper J (1998a): Das Zytoskelett des Kardiomyozyten im normalen und insuffizienten menschlichen Myokard. I. Sarkomere und Zytoplasma. *Z Kardiovask Med* 2:7-22.
- Hein S, Kostin S, Bauer EP, Klövekorn WP, Schaper J (1998b): Das Zytoskelett des Kardiomyozyten im normalen und insuffizienten menschlichen Myokard. II. Membran-assoziierte Proteine. *Z Kardiovask Med* 2:78-95.
- Hein S, Kostin S, Heling A, Maeno Y, Schaper J (2000): The role of the cytoskeleton in heart failure. *Cardiovasc Res* 45:273-378.
- Hein S, Schaper J (1996a): The cytoskeleton of cardiomyocytes is altered in the failing human heart. *Heart Fail* 12:128-132.
- Hein S, Schaper J (1996b): Pathogenesis of dilated cardiomyopathy and heart failure: insights from cell morphology and biology. *Curr Opin Cardiol* 11:293-301.

- Heling A, Zimmermann R, Kostin S, Maeno Y, Hein S, Devaux B, Bauer E, Klovekorn W-P, Schlepper M, Schaper W, Schaper J (2000): Increased Expression of Cytoskeletal, Linkage, and Extracellular Proteins in Failing Human Myocardium. *Circ Res* 86:846-853.
- Hoehn GT, Stokland T, Amin S, Ramirez M, Hawkins AL, Griffin CA, Small D, Civin CI (1996): Tnk1: a novel intracellular tyrosine kinase gene isolated from human umbilical cord blood CD34+/Lin/Cd38- stem/progenitor cells. *Oncogene* 12:903-913.
- Hofmann PA, Metzger JM, Greaser ML, Moss RL (1990): Effects of partial extraction of light chain 2 on the Ca²⁺ sensitivity of isometric tension, stiffness and velocity of shortening in skinned skeletal muscle fibers. *J Gen Physiol* 95:477-498.
- Hoheisel J, Fellenberg K, Brors B, Diehl F, Hauser N, Vingron M (2001): Transkriptionelle Untersuchungen auf DNS-Mikroarrays. *Bioforum* 12:908-922.
- Hoshijima M, Kenneth RC (2002): Mixed signals in heart failure: cancer rules. *J Clin Invest* 109:849-855.
- Huang W, Aramburu J, Douglas P, Izumo S (2000): Transgenic expression of green fluorescence protein can cause dilated cardiomyopathy. *Nature Med* 6:482-483.
- Ivanov DB, Phillippova MP, Tkachuk VA (2001): Structure and function of classical cadherins. *Biochemistry* 66:1174-1186.
- Jarreta D, Orús J, Barrientos A, Miró O, Roig E, Heras M, Moraes C, Cardellach F, Casademont J (2000): Mitochondrial function in heart muscle from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 45:860-865.
- Jiang C, Lu H, Vincent K, Shankara S, Belanger A, Cheng S, Akita G, Kelly R, Goldberg M, Gregory R (2001): Gene expression profiling in human cardiac cells subjected to hypoxia or expressing a hybrid form of HIF-1alpha. *Physiol Genomics* 8:23-32.
- Jung M, Poepping I, Perrot A, Ellmer AE, Wienker TF, Dietz R, Reis R, Osterziel KJ (1999): Investigation of a family with autosomal dominant dilated cardiomyopathy defines a novel locus on chromosome 2q14-q22. *Am J Hum Genet* 65:1068-1077.
- Kamisago M, Sharma SD, DePalma SR, Solomon S, Sharma P, McDonough B, Smoot L, Mullen MP, Woolf PK, Wigle ED, Seidman JG, Seidman CE (2000): Mutations in sarcomeric protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 343:1688-1696.
- Kass S, McRae C, Graber H, Sparks E, McNamara D, Boudoulas H, Basson C, Baker P, Cody R, Fishman M, Cox N, Kong A, Wooley C, Seidman JG, Seidman C (1994): A gene defect that causes conduction system disease and dilated cardiomyopathy maps to chromosome 1p1-1q1. *Nature Genetics* 7:546-551.

- Katika T, Hasegawa K, Iwai-Kanai E, Adachi S, Morimoto T, Wada H, Kawamura T, Yanazume T, Sasayama S (2001): Calcineurin pathway is required for endothelin-1-mediated protection against oxidant stress-induced apoptosis in cardiac myocytes. *Circ Res* 88:1239-1246.
- Katz AM (1988): Molecular biology in cardiology, a paradigmatic shift. *J Mol Cell Cardiol* 20:355-366.
- Kawada T, Nakazawa M, Nakauchi S, Ymazaki K, Shimamoto R, Urabe M, Nakat J, Hemmi C, Masui F, Nakajima T, Szuki J, Monahan J, Sato H, Masaki T, Ozawa K, Toyooka T (2002): Rescue of hereditary form of dilated cardiomyopathy by rAAV mediated somatic gene therapy: Amelioration of morphological findings, sarcolemmal permeability, cardiac performances and the prognosis of TO-2 hamsters. *PNAS* 99:901-906.
- Kee B, Rivera R, Murre C (2001): Id3 inhibits B lymphocyte progenitor growth and survival in response to TGF-beta. *Nat Immunol* 2:242-247.
- Kim S, Rhee H, Ko J, Kim H, Yang J, Choi E, Na D (2001): Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by Annexin I. *J Biol Chem* 276:15712-15719.
- Knowlton AA, Apstein CS, Saouf R, Brecher P (1989): Leakage of heart fatty acid binding protein with ischemia and reperfusion in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 21:577-583.
- Kostin S, Hein S, Zimmermann R, Schaper J (2002): Myocytes die by multiple mechanisms. *J Mol Cell Cardiol* 34:A35.
- Kostin S, Heling A, Hein S, Scholz D, Klövekorn W-P, Schaper J (1998): The protein composition of the normal and diseased cardiac myocyte. *Heart Fail Rev* 2:245-260.
- Krajinovic M, Pinamonti B, Sinagra G, Vatta M, Severini GM, Milasin J, Falaschi A, Camerini F, Giacca M, Mestroni L (1995): Linkage of familial dilated cardiomyopathy to chromosome 9. Heart muscle disease study group. *Am J Hum Genet* 57:846-52.
- Kress H, Paschke E, von Figura K, Gilberg W, Fuchs W (1980): Sanfilippo disease type D: deficiency of N-acetylglucosamine-6-sulfate sulfatase required for heparan sulfate degradation. *PNAS* 77:6822-6826.
- Kuehl U, Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss HP (1996): Immunohistological evidence for a chronic intramyocardial inflammatory process in dilated cardiomyopathy. *Heart* 75:295-300.
- Kuo H, Chen J, Ruiz-Lozano P, Zou Y, Nemer M, Chien K (1999): Control of segmental expression of the cardiac-restricted ankyrin repeat protein gene by distinct regulatory pathways in murine cardiogenesis. *Development* 126:4223-4234.

- La M, D'Amico M, Bandiera S, Di Filippo C, Oliani S, Gavins F, Flower R, Peretti M (2001a): Annexin 1 peptides protect against experimental myocardial ischemia-reperfusion: analysis of their mechanism of action. *FASEB* 15:2247-2256.
- La M, Taylor A, D'Amico M, Flower R, Peretti M (2001b): Analysis of the protection afforded by annexin I in ischemia-reperfusion injury: focus on neutrophil recruitment. *Eur J of Pharmac* 429:263-278.
- Laser M, Willey D, Jiang W, Cooper G, Minck D, Zile M, Kuppuswamy D (2000): Integrin activation and focal complex formation in cardiac hypertrophy. *JBC* 275:35624-35630.
- Lee MM, Fink BD, Grunwald G (1997): Evidence that tyrosine phosphorylation regulates N-Cadherin turnover during retinal development. *Dev Genetics* 20:224-234.
- Leeuw N, Ruiter D, Balk A, de Jonge N, Melchers W, Galama J (2001): Histopathological findings in explanted heart tissue from patients with end-stage idiopathic dilated cardiomyopathy. *Transpl Int* 14:299-306.
- Li D, Tapscoft T, Gonzalez O, Burch PE, Quinones MA, Zoghbi WA, Hill R, Bachinski LL, Mann DL, Roberts R (1999): Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 100:461-464.
- Limas CJ, Limas C, Kubo SH, Olivari MT (1990): Anti- β -receptor antibodies in human dilated cardiomyopathy and correlation with HLA-DR antigens. *Am J Cardiol* 65:483-487.
- Linask KK, Knudsen KA, Gui YH (1997): N-cadherin-catenin interaction: necessary component of cardiac cell compartmentalization during early vertebrate heart development. *Dev Biol* 185:148-164.
- Lindstrom J (1997): Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease. *Mol Neurobiol* 15:193-222.
- Linz W, Wiemer G, Gohlke P, Unger T, Schölkens BA (1995a): Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev* 47:25-49.
- Linz W, Wiemer G, Schaper J, Zimmermann R, Nagasawa K, Gohlke P, Unger T, Schölkens BA (1995b): Angiotensin converting enzyme inhibitors, left ventricular hypertrophy and fibrosis. *Mol Cell Biochem* 147:89-97.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Macalma T, Otte J, Hensler M, Bockholt S, Louis H, Kalff-Suske M, Grzeschik K-H, Ahe D, Beckerle M (1996): Molecular characterization of human zyxin. *JBC* 271:31470-31478.

- Maisch B, Bauer E, Cirsi M, Kochsiek K (1993): Cytolytic cross-reactive antibodies directed against the cardiac membrane and viral proteins in coxsackievirus B3 and B4 myocarditis. Characterisation and pathogenetic relevance. *Circulation* 87:Suppl IV: 49-56.
- Maisch B, Bauer E, Hufnagel G (1988): The use of endomyocardial biopsies in heart failure. *Eur Heart J* 9:59-71.
- Maisch B, Portig I, Ristic A, Hufnagel G, Pankuweit S (2000): Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): on the way to consensus. *Herz* 25:200-209.
- Mann D (2002): New insights into the role of cardiac myocytes and apoptosis and left ventricular remodeling: "AHA-Scientific conference on advances in the molecular and cellular mechanisms of heart failure." Salt Lake City, Utah, USA.
- Margossian S, White H, Caulfield J, Norton P, Taylor S, Slayter HS (1992): Light chain 2 profile and activity of human ventricular myosin during dilated cardiomyopathy. Identification of a causal agent for impaired myocardial function. *Circulation* 85:1720-1733.
- McKoy G, Protonotarios N, Crosby A, Tsatsopoulou A, Anastasakis A, Coonar A, Norman M, Baboonian C, Jeffery S, McKenna WJ (2000): Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and wooly hair (Naxos disease). *Lancet* 355:2119-2124.
- Melnikova I, Christy B (1996): Muscle cell differentiation is inhibited by the helix-loop-helix protein Id3. *Cell Growth Differ* 7:1067-1079.
- Meneton P, Bloch-Faure M, Hagege AA, Ruetten H, Huang W, Bergaya S, Ceiler D, Gehring D, Martins I, Salmon G, Boulanger CM, Nussberger J, Crozatier B, Gasc J-M, Heudes D, Bruneval P, Doetschman T, Menard J, Alhenc-Gelas F (2001): Cardiovascular abnormalities with normal blood pressure in tissue kallikrein-deficient mice. *PNAS* 98:2634-2639.
- Messina DN, Speer MC, Pericak-Vance MA, McNally EM (1997): Linkage of familial dilated cardiomyopathy with conduction defect and muscular dystrophy to chromosome 6q23. *Am J Hum Genet* 61:909-917.
- Milner DJ, Weitzer G, Tran D, Bradley A, Capetanaki Y (1996): Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. *J Cell Biol* 134:1255-1270.
- Minamisawa S, Hoshijima M, Chu G, Ward CA, Frank K, Gu Y, Martone ME, Wang Y, Ross JJ, Kranias EG, Giles WR, Chien KR (1999): Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. *Cell* 99:313-322.
- Mittmann C, Eschenhagen T, Scholz H (1998): Cellular and molecular aspects of contractile dysfunction in heart failure. *Cardiovasc Res* 39:267-275.

- Molkentin J, Lu J, Antos C, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant S, Olson E (1998): A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93:215-228.
- Morano I (1999): Tuning the human heart molecular motors by myosin light chains. *J Mol Med* 77:544-555.
- Morano I, Hadicke K, Grom S, Koch A, Schwinger RH, Boehm M, Bartel S, Erdman E, Krause EG (1994): Titin, myosin light chains and C-protein in the developing and failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* 26:361-368.
- Morimoto S, Lu QW, Harada K, Takahashi-Yanaga F, Minakami R, Ohta M, Sasaguri T, Ohtsuki I (2001): Ca²⁺ desensitizing effect of a deletion mutation delta K210 in cardiac troponin T that causes familial dilated cardiomyopathy. *PNAS* 99:913-918.
- Moriyama K, Yahara I (2002): Human Cap 1 is a key factor in the recycling of cofilin and actin for rapid actin turnover. *J Cell Sci* 115:1591-1601.
- Most P, Bernotat J, Ehlermann P, Pleger S, Reppel M, Borries M, Niroomand F, Pieske B, Janssen P, Eschenhagen T, Karczewski P, Smith G, Koch W, Katus H, Remppis A (2001): S100A1: a regulator of myocardial contractility. *Proc Natl Acad Sci* 98:13889-13894.
- Münch G, Bölcck B, Sugaru A, Brixius K, Bloch W, Schwinger R (2001): Increased expression of isoform 1 of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channel in failing human heart. *Circulation* 103:2739-2744.
- Nagaoka R, Minami N, Hayakawa K, Abe H, Obinata T (1996): Quantitative analysis of low molecular weight G-actin binding proteins, cofilin, ADF, profilin, expressed in developing and degenerating chicken skeletal muscles. *J Muscle Res Cell Motility* 17:463-473.
- Nakamura T, Iwata Y, Sampaolesi M, Hanada H, Saito N, Artman M, Coetzee W, Shigekawa M (2001): Stretch-activated cation channels in skeletal muscle myotubes from sarcoglycan-deficient hamsters. *J Neurophysiol* 281:C690-C699.
- Natarajan A, Yamagishi H, Ahmad FL, D., Roberts R, Matsuoka R, Hill S, Srivastava D (2001): Human eHand, but not dHand, is down-regulated in cardiomyopathies. *J Mol Cell Cardiol* 33:1607-1614.
- National Heart LaBI (1997): Facts about cardiomyopathy. NIH Publication 97.
- Nicol RL, Frey N, Olson EN (2000): FROM THE SARCOMERE TO THE NUCLEUS: Role of Genetics and Signaling in Structural Heart Disease. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* 1:179-223.

- Nigro V, Okazaki Y, Belsito A, Piluso G, Matsuda Y, Politano L, Nigro G, Ventura C, Abbondanza, Molinari AM, Acampora D, Michimura M, Hayashizaki Y, Puca GA (1997): Identification of the syrian hamster cardiomyopathy gene. *Hum Mol Genet* 6:601-607.
- Nogami K, Kusachi S, Nunoyama H, Kondo J, Endo C, Yamamoto K, Murakami T, Tsuji T (1996): Extracellular matrix components in dilated cardiomyopathy. Immunohistochemical study of endomyocardial biopsy specimen. *Jpn Heart J* 37:483-493.
- Norgett EE, Hatsell SJ, Carvajal-Huerta L, Cabezas JC, Common J, Purkis PE, Whittock N, Leigh IM, Stevens HP, Kelsell DP (2000): Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma. *Hum Mol Genet* 9:2761-2766.
- Norton JD, Atherton GT (1998): Coupling of Cell Growth Control and Apoptosis Functions of Id Proteins. *Mol. Cell. Biol.* 18:2371-2381.
- Noutsias M, Pauschinger M, Schultheiss H, Kuehl U (2002): Phenotypic characterization of infiltrates in dilated cardiomyopathy-diagnostic significance of T-Lymphocytes and macrophages in inflammatory cardiomyopathy. *Med Sci Monit* 8:CR478-487.
- Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss H-P, Kuhl U (1999): Expression of Cell Adhesion Molecules in Dilated Cardiomyopathy : Evidence for Endothelial Activation in Inflammatory Cardiomyopathy. *Circulation* 99:2124-2131.
- Oh H, Schneider M (2002): The emerging role of telomerase in cardiac muscle cell growth and survival. *J Mol Cell Cardiol* 34:717-724.
- Oh H, Taffet G, Youker K, Entman M, Overbeek P, Michael L, Schneider M (2001): Telomerase reverse transcriptase promotes cardiac muscle cell proliferation, hypertrophy and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10308-10313.
- Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara J, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami C, Krajewski S, Reed J, Anversa P (1997): Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 336:1131-1141.
- Olson T, Illenberger S, Kishimoto N, Huttelmier S, Keating M, Jockusch B (2002): Metavinculin mutations alter actin interaction in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 105:431-437.
- Olson T, Kshimoto N, Whitby F, Michels V (2001): Mutations that alter the surface charge of alpha-tropomyosin are associated with dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 33:723-732.
- Olson TM, Keating MT (1996): Mapping a cardiomyopathy locus to chromosome 3p22-p25. *J Clin Invest* 97:528-532.

- Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, Tai YS, Keating MT (1998): Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science* 280:750-752.
- Osterziel KJ, Schefoold T, Perrot A, Dietz R (2001): Genetik der dilatativen Kardiomyopathie. *Z Kardiologie* 90:461-469.
- Paradies NE, Grunwald GB (1993): Purification and characterization of NCAD90, a soluble endogenous form of N-cadherin, which is generated by proteolysis during retinal development and retains adhesive and neurite-promoting function. *J Neurosci Res* 36:33-45.
- Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, Doerner A, Poller W, Schwimmbeck PL, Kuhl U, Schultheiss H-P (1999): Dilated Cardiomyopathy Is Associated With Significant Changes in Collagen Type I/III ratio. *Circulation* 99:2750-2756.
- Perreault C, Meuse A, Bentivegna L, Morgan J (1990): Abnormal intracellular calcium handling in acute and chronic heart failure: role in systolic and diastolic dysfunction. *Eur Heart J* 11:Suppl: 8-21.
- Picciotto M, Caldarone B, Brunzell D, Zachariou V, Stevens T, King S (2001): Neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit knockout mice: physiological and behavioral phenotypes and possible clinical implications. *Pharmac Therap* 92:89-108.
- Poetter K, Jiang H, Hassanzadeh S, Master S, Chang A, Dalakas M, Rayment I, Sellers J, Fananapazir L, Epstein N (1996): Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle. *Nature Genet* 13:63-69.
- Pohlner K, Portig I, Pakuweit S (1997): Identification of mitochondrial antigens recognized by antibodies in sera of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy by two-dimensional gel electrophoresis and protein sequencing. *Am J Cardiol* 80:1040-1045.
- Radice GL, Rayburn H, Matsunami H, Knudsen KA, Takeichi M, Hynes RO (1997): Developmental defects in mouse embryos lacking N-Cadherin. *Dev Biol* 181:64-78.
- Remppis A, Greten T, Schafer B, Hunziker P, Erne P, Katus H, Heizmann C (1996): Altered expression of the Ca(2+)-binding protein S100A1 in human cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta* 1313:253-257.
- Ritchie R, Sun X, Dusting G (1999): Lipocortin-1 preserves myocardial responsiveness to beta-adrenergic stimulation in rat papillary muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26:522-524.
- Rueckschloss U, Isenberg G (2001): Cytochalasin D reduces Ca²⁺ currents via cofilin-activated depolymerisation of F-actin in guinea-pig cardiomyocytes. *J Physiol* 537:363-370.

- Ruiz P, Brinkmann V, Ledermann B, Behrend M, Grund C, Thalhammer S, Vogel F, Birchmeier C, Gunthert U, Franke WW, Birchmeier W (1996): Target mutation of plakoglobin in mice reveals essential functions of desmosomes in the embryonic heart. *J Cell Biol* 135:215-225.
- Ruppert V, Maisch B (2000): Mitochondrial DNA deletions in cardiomyopathies. *Herz* 25:161-167.
- Saborowski F "Innere Medizin in Praxis und Klinik." Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Sack M, Rader T, Park S, J. B, McCune S, Kelly D (1996): Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. *Circulation* 94:2837-2842.
- Saito Y, Nakao K, Arai H, Sugawara A, Morii N, Yamada T, Itoh H, Shiono S, Mukoyama M, Obata K (1987): Atrial natriuretic polypeptide (ANP) in human ventricle. Increased gene expression of ANP in dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Comm* 148:211-217.
- Sanger F, Nickeln S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74:5463-5467.
- Schaap F, Vusse G, Glatz J (1998): Fatty-acid binding protein in the heart. *Mol Cell Biochem* 180:43-51.
- Schaper J, Lorenz-Meyer S, Suzuki K (1999): The role of apoptosis in dilated cardiomyopathy. *Herz* 24:219-224.
- Schaper J, Speiser B (1992): The extracellular matrix in the failing human heart. *Basic Res Cardiol* 87 Suppl:s303-309.
- Schaub MC, Hefti MA, Zuellig RA, Morano I (1998): Modulation of contractility in human cardiac hypertrophy by myosin essential light chain isoforms. *Cardiovasc Res* 37:381-404.
- Schmidt U, Hajjar R, Helm P, Kim C, Doye A, Gwathmey J (1998): Contribution of abnormal sarcoplasmic reticulum ATPase activity to systolic and diastolic dysfunction in human heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 30:1929-1937.
- Schnittler HJ, Puschel B, Drenckhahn D (1997): Role of cadherins and plakoglobin in interendothelial adhesion under resting conditions and shear stress. *Am J Physiol* 273:H2396-2405.
- Schönberger J, Levy H, Grüning E, Sangwatanaroj S, Fatkin D, McRae C, Stacker H, Halpin C, Eavey R, Philbin EF, Katus H, Seidman CE (2000): Dilated Cardiomyopathy and sensorineural hearing loss: a heritable syndrome that maps to 6q23-24. *Circulation* 101:1912-1818.

- Schönberger J, Seidman C (2001): Many roads lead to a broken heart: the genetics of dilated cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 69:249-260.
- Schulze K, Heinemann FW, Schultheiss HP (1999): Impairment of myocardial calcium homeostasis by antibodies against the adenine nucleotide translocator. *Cell Calcium* 25:361-370.
- Schulze K, Schultheiss HP (1995): The role of the ADP/ATP carrier in the pathogenesis of viral heart disease. *Eur Heart J* 16:64-67.
- Seidman JG, Seidman C (2001): The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* 104:557-567.
- Serner GGN, Boddi M, Cecioni I, Vanni S, Coppo M, Papa ML, Bandinelli B, Bertolozzi I, Polidori G, Toscano T, Maccherini M, Modesti PA (2001): Cardiac Angiotensin II Formation in the Clinical Course of Heart Failure and Its Relationship With Left Ventricular Function. *Circ Res* 88:961-968.
- Shai S-Y, Harpf AE, Babbitt CJ, Jordan MC, Fishbein MC, Chen J, Omura M, Leil TA, Becker KD, Jiang M, Smith DJ, Cherry SR, Loftus JC, Ross RS (2002): Cardiac Myocyte-Specific Excision of the β 1 Integrin Gene Results in Myocardial Fibrosis and Cardiac Failure. *Circ Res* 90:458-464.
- Siu BL, Niimura H, Osborne JA, Fatkin D, McRae C, Solomon S, Benson DW, Seidman J, Seidman C (1999): Familial dilated cardiomyopathy locus maps to chromosome 2q31. *Circulation* 99:1022-1026.
- Sohmiya K, Tanaka T, Tsujii R, Yoshimoto K, Nakayama Y, Hirota Y, Kawamura K, Matsunaga Y, Nishimura S, Miyazaki H (1993): Plasma and urinary heart-type cytoplasmic fatty acid-binding protein in coronary occlusion and reperfusion induced myocardial injury model. *J Moll Cell Cardiol* 25:1413-1426.
- Soler AP, Knudsen KA (1994): N-cadherin involvement in cardiac myocyte interaction and myofibrillogenesis. *Dev Biol* 162:9-17.
- Song G, Campos B, Wagoner L, Dedman J, Walsh R (1998): Altered cardiac annexin mRNA and protein levels in the left ventricle of patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Card* 30:443-451.
- Spinale F (2002): Matrix Metalloproteinases-Regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 90:520-530.
- Spinale F, Coker M, Bond B, Zellner J (2000): Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. *Cardiovasc Res* 46:225-238.

- Steenbergen S, Afshari C, Petranka J, Collins J, Martin K, Bennet L, Haugen A, Bushel P, Murphy E (2002): Alterations in apoptotic signaling in human idiopathic cardiomyopathic hearts in failure. *AJP* 2002; September, in press.
- Strothmann K, Gromoll J (1999): DNA-Array-Technologie: Ein Meilenstein in der molekularen Endokrinologie. *Endokrinologie* 23:19-23.
- Studer R, Reinecke H, Muller B, Holtz J, Just H, Drexler H (1994): Increased angiotensin-I converting enzyme gene expression in the failing human heart. Quantification by competitive RNA polymerase chain reaction. *J Clin Invest* 94:301-310.
- Sussman MA, Welch S, Cambon N, Kleivitsky R, Hewett TE, Price R, Witt SA, Kimball TR (1998): Myofibril Degeneration Caused by Tropomodulin Overexpression Leads to Dilated Cardiomyopathy in Juvenile Mice. *J. Clin. Invest.* 101:51-61.
- Suzuki T, Higgins P, Crawford D (2000): Control Selection for RNA Quantitation. *BioTechniques* 29:332-337.
- Sylvius N, Tesson F, Gayet C, Charron P, B ena che A, Mangin L, Peuchmaurd M, Duboscq-Bidot L, Feingold J, Beckmann JS, Bouchier C, Komajda M (2001): A new locus for autosomal dominant dilated cardiomyopathy identified on chromosome 6q12-q16. *Am J Hum Genet* 68:241-246.
- Tamiya Y, Yamamoto N, Uede T (1995): Protective effect of monoclonal antibodies against LFA-1 and ICAM-1 on myocardial reperfusion injury following global ischemia in rat. *Immunopharmacology* 29:53-63.
- Tan F, Moravec C, Li J, Cnoklin B, Apperson-Hansen C, McCarthy P, Young J, Bond M (2002): A complete assessment of the expression profile of heart failure on multiple human hearts: "AHA-Scientific conference on advances in the molecular and cellular mechanisms of heart failure." Salt Lake City, Utah, USA.
- Tanaka K, Pracyk JB, Takeda K, Yu Z-X, Ferrans VJ, Deshpande SS, Ozaki M, Hwang PM, Lowenstein CJ, Irani K, Finkel T (1998): Expression of Id1 Results in Apoptosis of Cardiac Myocytes through a Redox-dependent Mechanism. *J. Biol. Chem.* 273:25922-25928.
- Tepass U, Truong K, Godt D, Ikura M, Peifer M (2000): Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:91-100.
- Thirion C, Stucka R, Mendel B, Gruhler A, Jaksch M, Nowak K, Binz N, Laing N, Lochmuller H (2001): Characterization of human muscle type cofilin in normal and regenerating muscle. *Eur J Biochem* 268:3473-3482.

- Tingley W, Salomonis N, Schinke M, Izumao S, Conklin B (2002): Gene expression during cardiac remodelling: "AHA-Scientific conference on advances in the molecular and cellular mechanisms of heart failure." Salt Lake City, Utah, USA.
- Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young J, Mann D (1996): Tumor necrosis factor alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation* 93:704-711.
- Towbin J (1998): The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies. *Curr Opin Cell Biol* 10:131-139.
- Tsao L, Neville C, Musaro A, McCullagh K, Rosenthal N (2000): Revisiting Calcineurin and human heart failure. *Nat Med* 6:2-3.
- Tschope C, Gohlke P, Zhu Y, Linz W, Scholkens B, Unger T (1997): Antihypertensive and cardioprotective effects after angiotensin-converting enzyme inhibition: role of kinins. *J Cardiac Fail* 3:133-148.
- Tsubata S, Bowles KR, Vatta M, Zintz C, Titus J, Muhonen L, Bowles NE, Towbin JA (2000): Mutations in the human delta-sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. *J Clin Inv* 106:655-662.
- Wallner B, Mattaliano R, Hession C, Cate R, Tizard R, Sinclair L, Foeller C, Chow E, Browning J, Ramchandran K (1986): Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A2 inhibitor with potential anti-inflammatory activity. *Nature* 320:77-81.
- Wallukat G, Nissen E, Morwinski R, Muller J (2000): Autoantibodies against the beta and muscarinic receptors in cardiomyopathy. *Herz* 25:261-266.
- Wang J, Wilhelmsson H, Graff C, Li H, Oldfors A, Rustin P, Bruning JC, Kahn CR, Clayton DA, Barsh GS, Thoren P, Larsson NG (1999): Dilated cardiomyopathy and atrioventricular conduction blocks induced by heart-specific inactivation of mitochondrial DNA gene expression. *Nat Genet* 21:133-137.
- Wang N, Butler JP, Ingber D (1993): Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 260:1124-1127.
- Wang X, Gerdes AM (1999): Chronic pressure overload cardiac hypertrophy and failure in guinea pigs: III. Intercalated disc remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 31:333-343.
- Wang X, Osinska H, Dorn G, Nieman M, Lorenz J, Gerdes M, Witt S, Kimball T, Gulick J, Robbins J (2001): Mouse model of desmin-related cardiomyopathy. *Circulation* 103:2402-2407.

- Warraich RS, Dunn MJ, Yacoub MH (1999): Subclass specificity of autoantibodies against myosin in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: pro-inflammatory antibodies in DCM patients. *Biochem Biophys Res Comm* 259:255-261.
- WHO (1980): Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br Heart J* 44:672-3.
- WHO (1996): Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation* 93:841-842.
- Wilke A, Funk R, Rupp H, Brilla C (1996): Effect of the renin-angiotensin-aldosterone system on the cardiac interstitium in heart failure. *Basic Res Cardiol* 91:79-84.
- Wilke A, Schonian U, Herzum M, Hengstenberg C, Hufnagel G, Brilla CG, Maisch B (1995): The extracellular matrix and cytoskeleton of the myocardium in cardiac inflammatory reaction. *Herz* 20:95-108.
- WMA (2000): World medical association declaration of Helsinki- Ethical principles for medical research involving human subjects: "52nd WMA general assembly." Edinburgh, Scotland.
- Wu JC, Wang SM, Tseng YZ (1996): The involvement of PKC in N-cadherin-mediated adherens junction assembly in cultured cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Comm* 225:733-739.
- Wynne J, Braunwald E (1980): The Cardiomyopathies and Myocarditides: Toxic, chemical and physical damage to the heart. In Braunwald E (ed): "Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine." Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo: W.B. Saunders Company, pp 1394-1401.
- Xiong D, Lee G, Badorff C, Dorener A, Lee S, Wolf P, Knowlton K (2002): Dystrophin deficiency markedly increases enterovirus-induced cardiomyopathy: a genetic predisposition to viral heart disease. *Nat Med* 8:872-877.
- Yamada K, Miyamoto S (1995): Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr Opin Cell Biol* 7:681-689.
- Yang J, Moravec C, Sussman M, DiPaola N, Fu D, Hawthorn L, Mitchell C, Young J, Francis G, McCarthy P, Bond M (2000): Decreased SLIM1 expression and increased Gelsolin expression in failing human hearts measured by high-density oligonucleotide arrays. *Circulation* 102:3046-3052.
- Zhong H, Simons J (1999): Direct comparison of GAPDH, β -Actin, Cyclophilin and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Com* 259:423-526.

- Zhou Q, Chu P, Huang C, Cheng C, Martone M, Knoll G, Shelton G, Evans S, Chen J (2001): Ablation of cypher, a PDZ-LIM domain Z-line protein, causes a severe form of congenital myopathy. *JBC* 155:605-612.
- Zhu J, McKeon F (2000): Nucleocytoplasmic shuttling and the control of NR-AT signaling. *Cell Mol Life Sci* 57:411-420.
- Zhuang J, Yamada KA, Saffitz JE, Kleber AG (2000): Pulsatile stretch remodels cell-to-cell communication in cultured myocytes. *Circ Res* 87:316-322.
- Zhurinsky J, Shtutman M, Ben-Ze'ev A (2000): Plakoglobin and β -catenin : protein interactions, regulation and biological roles. *J Cell Sci* 113:3127-3139.
- Zisman L, Asano K, Dutcher D, Ferdensi A, Robertson A, Jenkin M, Bush E, Bohlmeier T, Perryman B, Bristow M (1998): Differential regulation of cardiac angiotensin converting enzyme binding sites and AT1 receptor density in the failing human heart. *Circulation* 98:1735-1741.
- Zolk O, Caroni P, Böhm M (2000): Decreased expression of the cardiac LIM domain protein MLP in chronic human heart failure. *Circulation* 101:2674-2677.
- Zolk O, Frohme M, Maurer A, Kluxen FW, Hentsch B, Zubakov D, Hoheisel JD, Zucker IH, Pepe S, Eschenhagen T (2002): Cardiac ankyrin repeat protein, a negative regulator of cardiac gene expression, is augmented in human heart failure. *Biochem Biophys Res Com* 293:1377-1382.
- Zou Y, Evans S, Chen J, Kuo H, Harvey R, Chien K (1997): Carp, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in the Nkx2.5 homeobox gene pathway. *Development* 124:793-804.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben, ganz herzlich bedanken.

Insbesondere danke ich:

Frau Prof. Dr. Dr. h.c. Jutta Schaper für die Vergabe des Themas, die Begutachtung der Arbeit und die gute Kooperation mit ihrer Arbeitsgruppe.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Schaper für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie für die Möglichkeit die Ergebnisse dieser Arbeit auf verschiedenen Kongressen vorstellen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Rudolf Leiser für die Begutachtung der Arbeit und die Vertretung dieser Dissertation am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen.

Herrn Dr. René Zimmermann für die Vermittlung und Betreuung dieser Arbeit, seine stete Unterstützung und die Durchsicht der Dissertation.

Frau Claudia Ullmann, Frau Kerstin Böngler, Frau Dr. Stefanie Böhm, Frau Granz und Frau Neubauer für die gute Zusammenarbeit und die stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Gerhard Stämmler und Herrn Falk Sittner für ihre Hilfe bei allen computertechnischen Fragen.

Frau Renate Nordgren und Frau Elke Konradi, den guten Geistern des Max-Planck Instituts.

Allen Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts Bad Nauheim für das angenehme Arbeitsklima, viele interessante Gespräche und Diskussionen und für die schöne gemeinsame Zeit.

Frau Dr. Silke Zebandt für die Korrektur des Manuskripts und ihre unschätzbare Hilfe in allen Lebenslagen.

Meinem Mann Andreas, mein ruhender Fels in der Brandung, für seine unendliche Geduld und Ruhe.

Meiner Familie und meinen Freunden, die mich in allen Höhen und Tiefen unterstützen und mir somit diesen Weg ermöglicht haben.