

Differentielle Expression von α -Aktinin Isoformen
im Myokard von Patienten mit
Dilatativer Kardiomyopathie

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Tim Michael Block
aus Ehringshausen (Hessen)

Gießen 2006

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

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. J. Schaper
2. Gutachter: Prof. Dr. med. D. Schranz

Tag der Disputation: 16.04.07

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
1.1 Kardiomyopathien	1
1.1.1 Hypertrophe Kardiomyopathien	1
1.1.2 Restriktive Kardiomyopathien	2
1.1.3 Dilatative Kardiomyopathien	2
1.2 Proteine des Kardiomyozyten	3
1.2.1 α -Aktinin	6
II. Material und Methoden	9
2.1 Gewinnung der Gewebeproben	9
2.2 Patienten	9
2.3 Präparation und Analyse von RNA	10
2.3.1 Isolation von totaler RNA	11
2.3.1.1 Photometrische Konzentrationsmessung	12
2.3.2 Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen	12
2.3.2.1 Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese	12
2.3.2.2 Kapillar-Blot	13
2.4 Northern-Blot-Hybridisierung	15
2.4.1 Isolation von Hybridisierungssonden	15
2.4.1.1 Insertpräparation und Fragmentisolation	15

2.4.2	Kommerzielle Oligonukleotide	17
2.4.3	Radioaktive Markierung der Sonden	18
2.4.3.1	Markierung von cDNA mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$	18
2.4.3.2	Hybridisierung der Membran bei $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ - Markierung	19
2.4.3.3	Markierung von Oligonukleotiden mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$	20
2.4.3.4	Hybridisierung der Membran bei $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -Markierung	20
2.4.4	Stringentes Waschen der Membran	21
2.4.5	Quantifizierung	22
2.5	Polymerasekettenreaktion	22
2.5.1	Reverse Transkriptase	22
2.5.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	23
2.5.3	Ligation	24
2.5.4	Transformation	25
2.5.5	Plasmispräparation	26
2.5.6	Restriktionsverdau	26
2.5.7	Automatische DNA-Sequenzierung mit Hilfe des „ALF“	27
2.6	Proteinextraktion und Analyse	28
2.6.1.	Proteinextraktion aus Gewebe und Bestimmung der Konzentration	28
2.6.2	Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western Blot)	30

2.7	Western-Blot-Analyse	32
2.7.1	Antikörper	32
2.7.2	Immundetektion	32
2.7.3	Quantifizierung der Signale	33
2.8	Immunhistochemie und konfokale Mikroskopie	34
2.8.1	Mikrotomie	34
2.8.2	Immunhistochemie	34
2.8.3	Konfokale Lasermikroskopie und Bildverarbeitung	37
2.9	Fixierung und Einbettung der Gewebeprobe zur Auswertung mit dem Elektronenmikroskop	38
2.10	Auswertung am Elektronenmikroskop	39
III.	Ergebnisse	
3.1	Analyse des Northern-Blots	40
3.1.1	Allgemeine Angaben zu den Versuchen	40
3.1.2	Northern-Blot-Analyse mit cDNA-Sonden	41
3.1.2.1	α -Aktinin-1 cDNA-Sonde	41
3.1.2.2	α -Aktinin-2 cDNA-Sonde	43
3.1.2.3	α -Aktinin-3 cDNA-Sonde	43
3.1.2.4	α -Aktinin-4 cDNA-Sonde	43

3.2	Northern-Blot-Analyse mit Oligonukleotiden	45
3.2.1	Hybridisierung mit α -Aktinin-1-Antisense-Oligonukleotiden	46
3.2.2	Hybridisierung mit α -Aktinin-2 Antisense-Oligonukleotide „antiB1“	52
3.2.3	Hybridisierung mit α -Aktinin-3 und -4 Antisense-Oligonukleotiden „antiC1/antiD1“	55
3.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)-Analyse	56
3.4	Analyse des Western-Blot	60
3.4.1	Sarkomerischer α -Aktinin Antikörper (EA-53)	61
3.4.2	Nicht sarkomerischer α -Aktinin Antikörper (BM 75.2)	63
3.4.3	Nicht muskulärer α -Aktinin-4 Antikörper (NCC-LU-632)	65
3.4.4	Quantifizierung durch den GAPDH-Antikörper	67
3.5	Immunhistochemie	69
3.5.1	Sarkomerischer α -Aktinin Antikörper (EA-53)	69
3.5.2	Nicht sarkomerischer α -Aktinin Antikörper (BM 75.2)	70
3.5.3	Nicht muskulärer α -Aktinin-4 Antikörper (NCC-LU-632)	71
3.6	Elektronenmikroskop	71

IV. Diskussion	75
4.1 Einführung	75
4.2 Genetik der dilatativen Kardiomyopathie	77
4.3 Die Rolle der sarkomerischen Proteine im kontraktilen Apparat des Herzens	79
4.3.1 α -Aktinin	80
4.4 Molekulargenetische Ursachen für die Entstehung der dilatativen Kardiomyopathie	82
4.4.1 Expression von multiplen Isoformen mit Defektlokalisierung auf mRNA-Ebene	82
4.4.1.1 Alternatives Spleißen	82
4.4.1.2 Die parallele Expression zweier Isoformen desselben Proteins	84
4.4.1.3 Ausbildung fetaler Isoformen bei dilatativer Kardiomyopathie	85
4.4.2 Ursprung und Lokalisation der fehlerhaften Produktion von Aktinin-Isoformen	86
4.4.2.1 Ursprung der fehlerhaften Produktion auf mRNA-Ebene	86
4.4.2.2 Ursprung der fehlerhaften Produktion auf Protein-Ebene	87
4.4.3 Ursachen und Auswirkungen der Akkumulation im endoplasmatischen Retikulum	87

4.5	Aktinin assoziierte Proteine	88
4.6	Krankheitsbedingter Isoformen-„Switch“ im Herz	89
V.	Zusammenfassung	90
VI.	Summary	93
VII.	Literaturverzeichnis	94
VIII.	Lebenslauf	105
IX.	Danksagung	106

I. Einleitung

1.1 Kardiomyopathien

Im Jahre 1957 veröffentlichte W. Bridgen einen Bericht über „ungewöhnliche Herzerkrankungen¹ und prägte hier als erster den Begriff der Kardiomyopathien. Diese wurden als akute, subakute oder chronische Dysfunktionen des Herzens beschrieben, oft in Zusammenhang mit einer endokardialen oder manchmal perikardialen Beteiligung, wobei der atherosklerotische Ursprung ausgeschlossen wurde^{2,3}. Dieses Konzept wurde zwar von der „Task Force“ der World Health Organisation und „International Society and Federation of Cardiology on the definition and classification of cardiomyopathies“ anerkannt, aber nicht gleichermaßen übernommen⁴. Die Grundzüge dieser Klassifikation basierten auf der Einteilung von Struktur- und Funktionsstörungen⁵. So wurden die Kardiomyopathien als „Herzmuskelerkrankungen unbekanntes Ursprungs“ definiert, und von spezifischen Herzmuskelerkrankungen bekannten Ursprungs abgegrenzt, wie zum Beispiel bei Infektionskrankheiten, Systemerkrankungen und metabolischen- und hereditären Erkrankungen. Bei den Kardiomyopathien müssen eine koronare Herzerkrankung, eine arterielle Hypertonie, kongenitale Vitien, sowie Herzklappen- und Perikarderkrankungen ausgeschlossen werden⁶. Die zuletzt 1980 von der WHO vorgenommene Einteilung wurde in den folgenden Jahren noch durch verschiedene Autoren ergänzt. Es sind jedoch ursprünglich drei Hauptformen bekannt:

1. die hypertrophe Kardiomyopathie mit Obstruktion (**HOCM**) und ohne Obstruktion (**HNCM**)
2. die restriktive (oblitative) Kardiomyopathie (**ROCM**)
3. die dilatative Kardiomyopathie, die früher auch als kongestive Kardiomyopathie bezeichnet wurde (**DCM**).
4. arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie

1.1.1 Hypertrophe Kardiomyopathie

Die *hypertrophe Kardiomyopathie* ist charakterisiert durch links- und/oder rechtsventrikuläre Hypertrophie, die normalerweise asymmetrisch vorliegt und das interventrikuläre Septum mit involviert⁷. Hierbei ist typischerweise das linksventrikuläre Volumen normal bis reduziert. Es liegt überwiegend eine familiäre Erkrankung mit autosomal-dominant bedingter Vererbung vor. Die Krankheit wird häufig von Mutationen in den Genen der sarkomerisch-kontraktile Proteine verursacht⁸. Experimentelle und klinische Untersuchungen konnten zeigen, dass einige Störungen in der Katecholaminfunktion zur Ätiologie der Krankheit beitragen⁹. Die Krankheit beginnt schon in dem sich entwickelnden Herzen und hat ein breites Spektrum in Bezug auf Verlauf und Prognose.

1.1.2 Restriktive Kardiomyopathie

Bei der *restriktiven Kardiomyopathie* liegt eine reduzierte Füllung der Ventrikel und ein vermindertes diastolisches Volumen eines oder beider Ventrikel vor, wobei hier jedoch eine normale oder annähernd normale systolische Funktion und Wanddicke gegeben ist. Zusätzlich kann eine gesteigerte interstitielle Fibrose präsent sein. Die Ursache für die restriktive Kardiomyopathie ist nicht vollends geklärt, wobei mehrere Typen bekannt sind, welche von idiopathischer Art sein oder in Zusammenhang mit anderen Krankheiten auftauchen können. Einige Beispiele sind die Amyloidosis, endomyokardiale Erkrankungen mit oder ohne Hypereosinophilie sowie die endomyokardiale Fibrose¹⁰.

1.1.3 Dilatative Kardiomyopathie

Die *dilatative (kongestive) Kardiomyopathie* ist die häufigste und zur Zeit wohl die im Mittelpunkt der Forschung stehende Kardiomyopathie. Die Inzidenz der Erkrankung scheint bevölkerungsabhängig zu sein^{11,12}. So ist zum Beispiel das Auftreten in Schwarzafrika deutlich höher als in den westlichen Industriegesellschaften. Männer sind etwa dreimal so häufig betroffen wie Frauen, wobei das Diagnosealter im Durchschnitt bei 40 Jahren liegt. Die Krankheit kann jedoch in allen Alterstufen auftreten⁶. So scheint die jährliche Prävalenz in Europa bei ca. 36/100.000 zu liegen, welche schon bei über 65jährigen auf bis zu 100 Individuen ansteigt. Die Inzidenz in der Allgemeinbevölkerung der westlichen Industriestaaten liegt zwischen 6-8 Fällen bei 100.000 Menschen pro Jahr¹³. Auch hier steigt die Anzahl der Fälle auf 40 Fälle pro Jahr bei über 75-Jährigen. Bei Vorliegen des Vollbildes der Erkrankung ist sie durch eine globale Herzinsuffizienz charakterisiert.

Makroskopisch stehen die Dilatation der Herzhöhlen ohne oder mit geringer muskuläre Hypertrophie im Vordergrund. Die histologische Untersuchung des Myokards zeigt häufig hypertrophierte Myozyten und stets eine interstitielle Fibrose^{14,15}.

Nachweislich liegt bei der dilatativen Kardiomyopathie eine eingeschränkte Kontraktionsleistung der Herzmuskulatur mit Vergrößerung des enddiastolischen und des endsystolischen Volumens vor. Dementsprechend ist auch die Ejektionsfraktion herabgesetzt¹⁶.

Ursächlich kann man die Entstehung der dilatativen Kardiomyopathie nicht auf einen Faktor reduzieren. Man geht davon aus, dass es sich um eine Vielfachkonditionierung durch Einzelfaktoren handelt¹⁷, die bisher nicht in ihrem Zusammenhang definierbar sind. Dazu werden zum Beispiel auch abgelaufene Virusmyokarditiden¹⁸, toxische Einflüsse, genetische Dispositionen¹⁹⁻²², immunologische Prozesse und auch übermäßiger Alkoholgenuß gezählt²³. Nur bei ca. 40% aller Fälle gelingt es, die Ätiologie der Erkrankung festzustellen. Familiäre Formen sind für ca. 25-30 % verantwortlich. Der Erbgang ist überwiegend autosomal dominant oder, seltener, X-chromosomal.

Beispielsweise ist eine genetische Abnormalität, die nachweislich eine Ursache für die familiären dilatativen Kardiomyopathie ist, die Mutation des Dystrophins bei der X-chromosomalen dilatativen Kardiomyopathie.

Das kardiale Zytoskelett und die extrazelluläre Matrix spielen eine essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung der zellulären Einheit und der Funktion des Myokards. Änderungen im Aufbau des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix können daher die kontraktile Funktion beeinträchtigen. So ist auch bekannt, dass intrazellulär gestörte Prozesse, eine veränderte Genexpression, als Ausgangspunkt für die Erkrankung von entscheidender Bedeutung sind²⁴. Vor allem zytoskelettäre und intrasarkomerische Proteine spielen hier eine große Rolle.

Durch zahlreiche Untersuchungen unserer Forschungsgruppe am gesunden, als auch am erkrankten Myokard konnten strukturelle Änderungen und Beeinträchtigungen von Proteinen der Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Insbesondere zeigten Veränderungen der Sarkomer- oder Gerüstproteine maßgebliche Auswirkungen auf die kardiale Funktion²⁴⁻²⁸. Aus diesem Grund folgte, als logische Konsequenz auf die früheren Ergebnisse mit Titin, die Untersuchung von α -Aktinin, ein Protein mit zentraler Rolle im Sarkomer. In immunhistochemischen Versuchen fielen ungewöhnliche Akkumulationen von nicht sarkomerischem α -Aktinin in DCM erkrankten Myozyten auf, weswegen α -Aktinin im weiteren Verlauf dieser Untersuchung durch zahlreiche Methoden intensiviert betrachtet werden sollte.

Die nachfolgenden Schemata sollen einen Überblick über die Funktion und die Interaktionen der Proteine des Kardiomyozyten geben.

1.2 Proteine des Kardiomyozyten

Die folgende Abbildung zeigt den Aufbau des Kardiomyozyten:

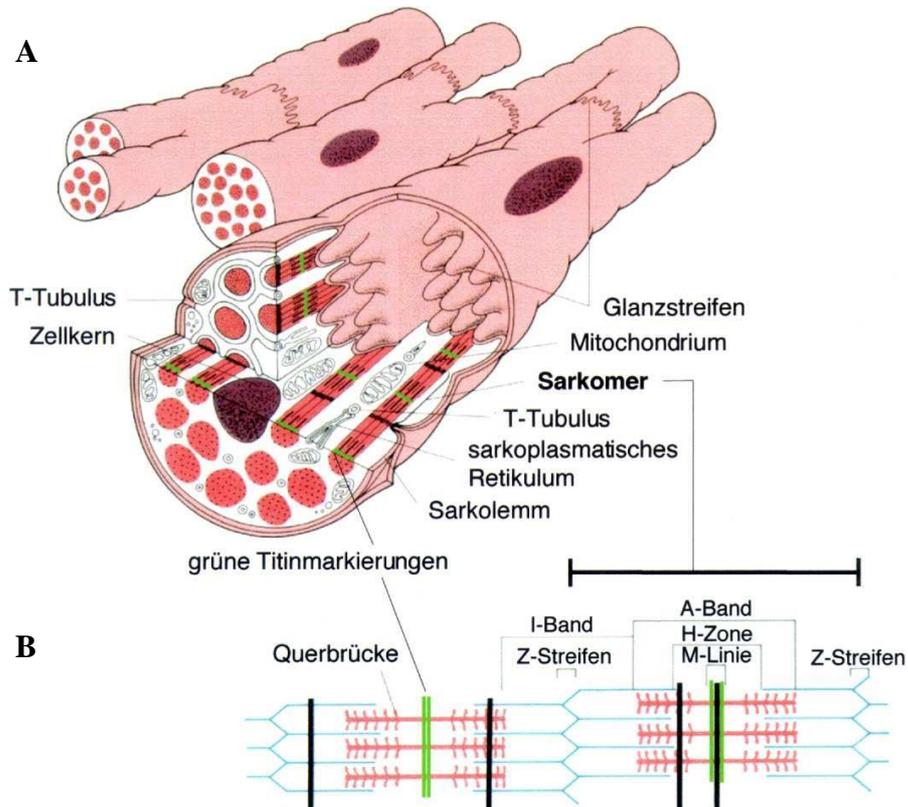


Abb. 1: Aufbau einer Herzmuskelzelle

(A) Die gabelförmig verzweigten Zellen sind über die Glanzstreifen mit den Nachbarzellen verbunden.

(B) Eine Herzmuskelzelle enthält zahlreiche Myofibrillen, die als kontraktile Komponenten fungieren. Die Myofibrillen sind aus sich wiederholenden funktionellen Untereinheiten, den Sarkomeren, aufgebaut.

(Die Abbildung wurde, mit freundlicher Genehmigung, aus der Dissertation „Die Rolle von Titin in der Sarkomerogenese“ von Dr. Veronika Person übernommen. Fachbereich Veterinärmedizin der J-L-U Giessen, 2000).

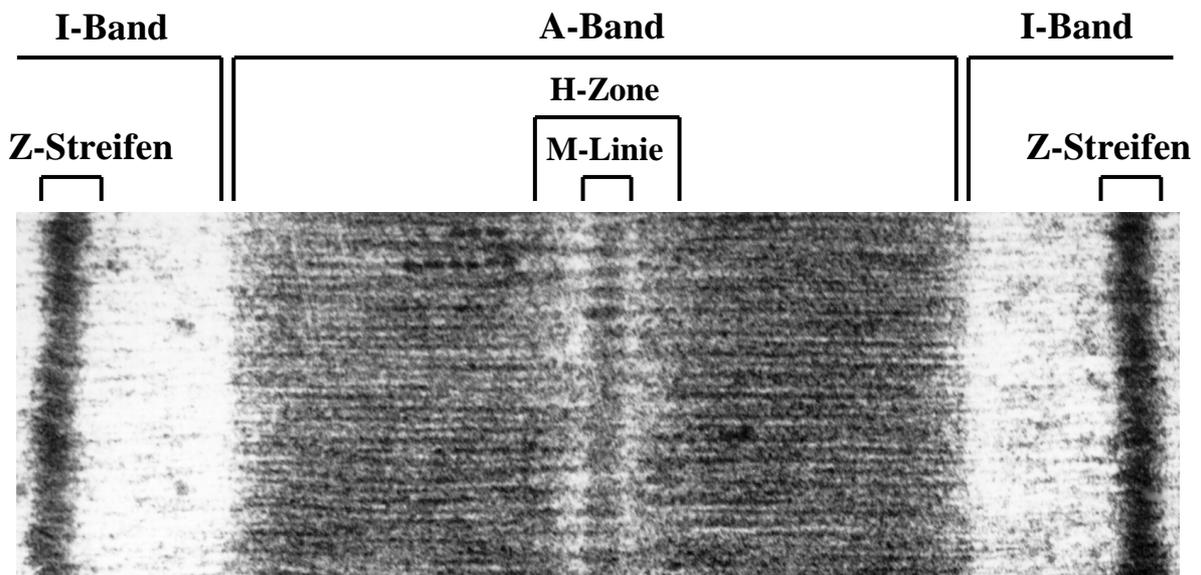


Abb. 2: Sarkomerstruktur: Elektronenmikroskopisches Bild eines Sarkomers

Struktur des Sarkomers

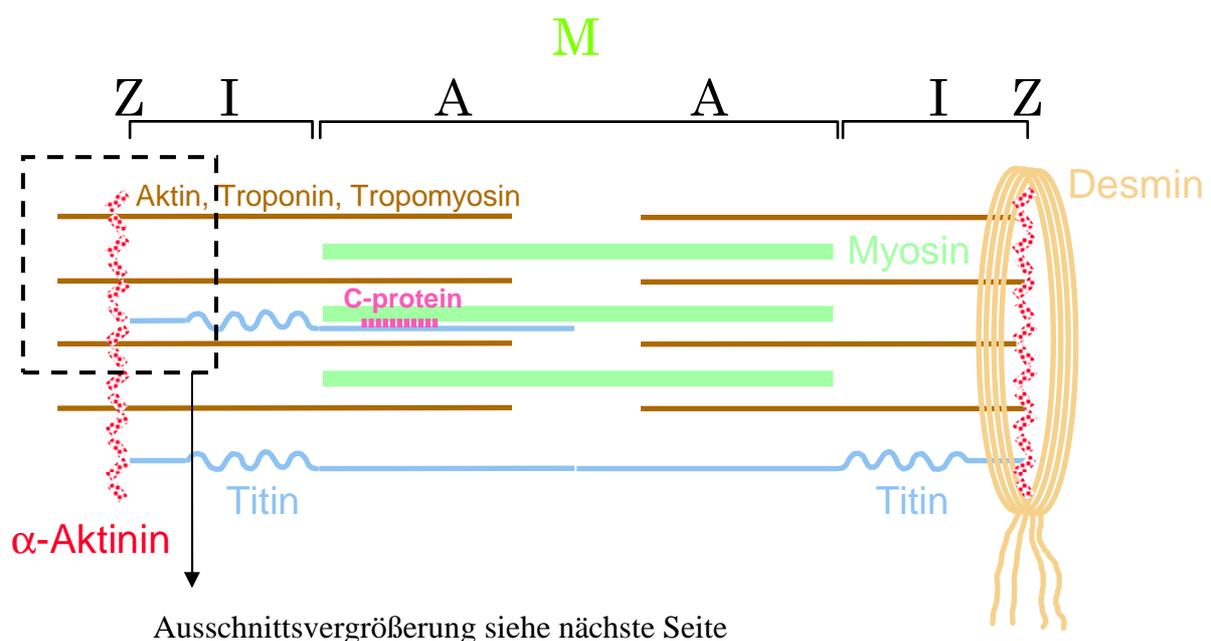


Abb.3: Schematische Zeichnung eines Sarkomers mit charakteristischen Proteinen.

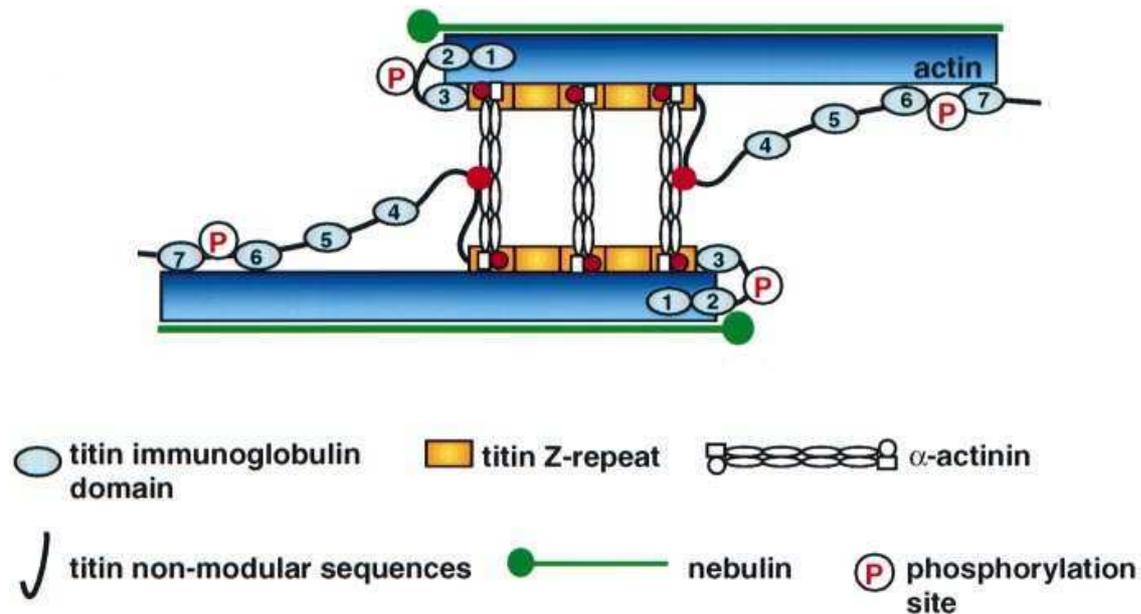


Abb. 4: Molekularstruktur der Z-Scheibe und deren Proteininteraktionen. Die sarkomerische Z-Scheibe, als Bindungsebene für Aktinfilamente, verankert diese und Titinfilamente von gegenüberliegenden Sarkomerhälften in einem Gitter gebunden durch α -Aktinin. Das hier erwähnte Nebulin kommt jedoch vorwiegend im Skelettmuskel vor.

(Die Abbildung wurde, mit freundlicher Genehmigung, aus dem EMBO Journal Vol. 17 No. 6pp. 1614-1624 übernommen⁴⁰).

Die Proteine in den Kardiomyozyten befinden sich in verschiedenen Kompartimenten die in der folgenden Tabelle aufgeführt sind.

Tab. 1: Proteine im Kardiomyozyten (modifiziert nach Kostin et al.²⁴)

Kontraktile Proteine	Aktin, Troponine, Tropomyosin, Myosin
Sarkomer-assoziierte Gerüstproteine	α-Aktinin , Titin, Myomesin, M-Protein, H-Protein, C-Protein
Proteine des Zytoskeletts	Intermediärfilamente (Desmin, Vimentin, Keratin) Mikrotubuli (Tubulin) Zytoskelettäres Aktin
Membran-assoziierte Proteine	Dystrophin, Vinculin, Talin, Spektrin
Proteine des Glanzstreifens, als Stabilisierung der Impulsweiterleitung	Connexin 43, Cadherin, Catenin, Desmoplakin

1.2.1 α -Aktinin

Wie schon zuvor erwähnt stand α -Aktinin bei dieser Studie im Vordergrund des Interesses. Untersuchungen in der Immunhistochemie haben gezeigt, dass bei der DCM α -Aktinin-Akkumulationen auftraten, vor allem das nicht sarkomerische α -Aktinin-1. Im Western-Blot zeigte sich gleichzeitig eine Abnahme der Konzentration von kontraktilen Proteinen wie Aktin und das Myosin.

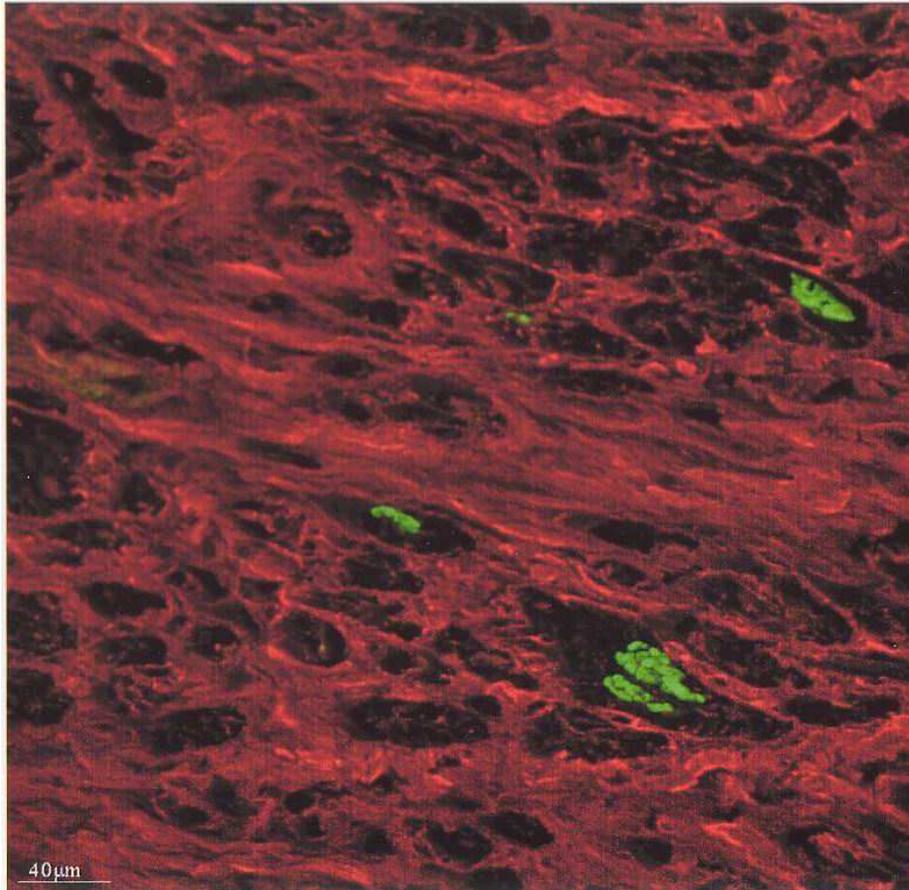


Abb. 5: Das Bild zeigt eine für den Herzmuskel (DCM), ungewöhnliche Akkumulation des α -Aktinin-1 im Kardiomyozyten, welches hier grün erscheint. Myocyten stellen sich schwarz dar.

α -Aktinin, ein ubiquitär vorkommendes, aktin-bindendes Protein mit einem Molekulargewicht zwischen 94-103 kDa, ist als Homodimer aus zwei identischen Polypeptidketten aufgebaut, die antiparallel zueinander stehen.

Das N-terminale Ende besitzt eine Aktin-bindende Domäne, das C-terminale Ende hingegen bindet das ebenfalls sarkomerische Protein Titin²⁸. α -Aktinin stellt sich im elektronenmikroskopischen Bild als stabförmiges Molekül mit einem Durchmesser von 3-4 nm und einer Länge von 30-40 nm dar²⁴.

Bis heute wurden beim Menschen vier verschiedene Isoformen des α -Aktinins und vier für die Expression verantwortlichen Gene beschrieben, wobei die Lokalisation des vierten Gens noch nicht bekannt ist²⁹⁻³³.

Neben den sarkomerischen Isoformen α -Aktinin-2 und α -Aktinin-3 (beide Isoformen erscheinen im Skelettmuskel, herzspezifisch ist jedoch nur α -Aktinin-2) wurde eine spezifische, nicht sarkomerische Isoform für glatte Muskulatur (α -Aktinin-1) und auch eine nicht muskuläre Isoform (α -Aktinin-4) beschrieben, welche im Gehirn, in Makrophagen, Thrombozyten und Fibroblasten in Kultur gefunden wurden^{34,35}. Darüber hinaus scheinen heterodimere Formen zwischen den sarkomerischen Formen des Aktinins und der glatten Muskulatur-Form möglich zu sein, was aber noch nicht endgültig geklärt ist²⁴. Durch Sequenzvergleiche der Isoformen konnte gezeigt werden, dass alle korrespondierenden Proteine eine hohe Sequenzhomologie aufweisen (ca. 80%), und ein annähernd gleiches Molekulargewicht haben. (siehe Tabelle 2)

Tab. 2: α -Aktinin Isoformen

Isoform	Vorkommen	Homologie	Lokalisation
α -Aktinin-1 (ACTN-1)	Glatte Muskulatur	1:2 \approx 78,4% 1:3 \approx 78,2% 1:4 \approx 82,6%	14q 22-24
α -Aktinin-2 (ACTN-2)	Herzmuskulatur Skelettmuskel	2:3 \approx 75,9% 2:4 \approx 76,2%	1q 42-43
α -Aktinin-3 (ACTN-3)	Skelettmuskulatur	3:4 \approx 76,9%	11q 13-14
α -Aktinin-4 (ACTN-4)	Nicht muskulär	4:1 \approx 82,6% 4:2 \approx 76,2% 4:3 \approx 76,9%	Nicht bekannt

Ein wichtiger Unterschied zwischen den Isoformen ist der Befund, dass die Bindungsstelle zu Aktin bei nicht muskulären Formen (ACTN-4) Ca^{2+} -sensitiv ist, bei den sarkomerischen Formen (ACTN-2/3) jedoch Ca^{2+} -insensitiv^{36,37}. Aktinin-1 ist diesbezüglich noch nicht weiter untersucht.

In den Sarkomeren quergestreifter Muskelzellen bindet α -Aktinin die Aktinfilamente auf Höhe der Z-Scheibe und hält diese auch in einer stabilen Position. Diese Eigenschaft führt dazu, dass zwei Reihen von überlappenden Aktinfilamenten von gegensätzlichen Polaritäten, die von zwei angrenzenden Sarkomeren ihren Ausgang nehmen und an der Z-Scheibe verankert sind, durch das Aktinin zusätzliche Stabilität erfahren.

Mit ca. 5% des Gesamtproteinanteils der Sarkomere findet α -Aktinin sich in der Herzmuskulatur sowohl in den Z-Streifen, als auch in den Glanzstreifen, welche elektronenmikroskopisch gut erkennbare Zellgrenzen der Herzmuskulatur darstellen, in deren Bereich die Faserenden eng verzahnt sind.

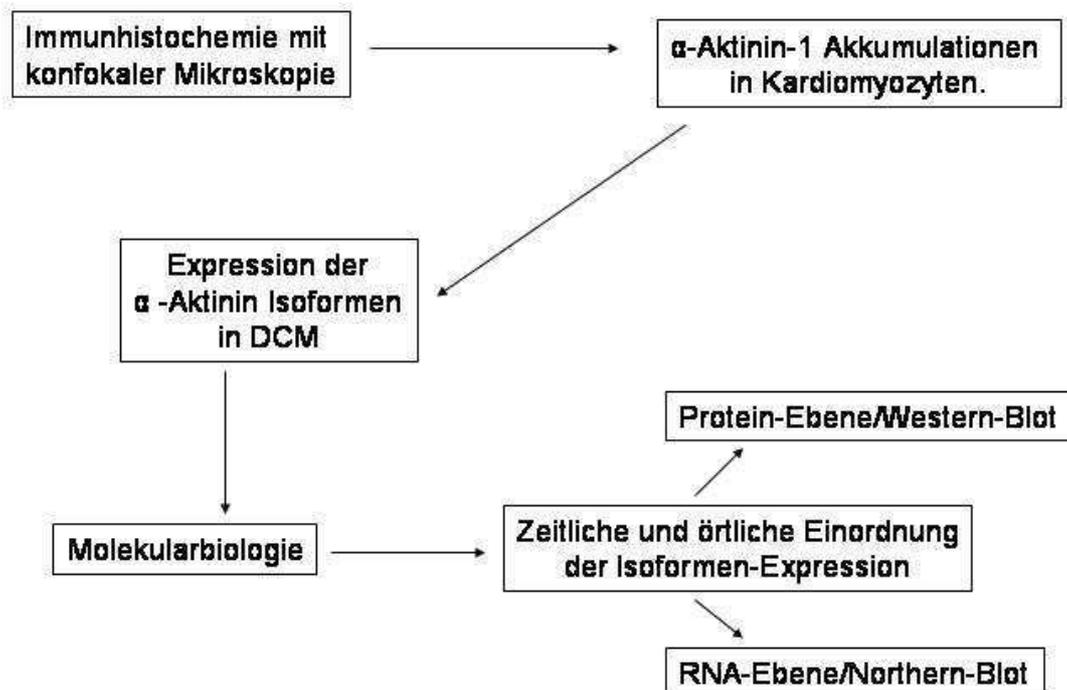
Darüber hinaus spielt α -Aktinin eine wichtige Rolle als Verbindungsstück zwischen Aktin und der Zellmembran, bindet Integrine und etabliert somit eine Interaktion zwischen intrazellulärem Milieu und extrazellulärer Matrix³⁸⁻³⁹.

Wie bereits in Abb. 4 erläutert wurde vernetzt α -Aktinin in der Herzmuskulatur die Aktin- und die Titinfilamente der beiden benachbarten Sarkomere im Z-Streifen und verankert sie auch am Zellende im Glanzstreifen⁴⁰. Neben den stabilisierenden Funktionen im Zytoskelett wird α -Aktinin auch eine wichtige Rolle in der Sarkomerogenese zugesprochen⁴¹.

Ausgehend von dem Befund der ungewöhnlichen Ansammlung von α -Aktinin-1 in den Kardiomyozyten bei DCM-Patienten war das Ziel unserer Untersuchungen, die Expression der verschiedenen α -Aktinin Isoformen bei dilatativer Kardiomyopathie festzustellen. Besonderes Interesse galt dabei den nicht sarkomerischen Formen (ACTN1 und 4) und deren Manifestation auf mRNA- und Protein Ebene.

In allen Fällen stammte das untersuchte Gewebe aus humanem linksventrikulären Myokard von Explantaten und wurde für den Northern-Blot, Western-Blot und die Immunhistochemie verwendet. Mit Hilfe der quantitativen Auswertung wurden dann die vorliegenden Ergebnisse ermittelt, zusammengefasst und diskutiert.

Das folgende Schaubild soll als Überblick über die folgende Versuchsanordnung und deren Absicht dienen.



II. Material und Methoden

2.1 Gewinnung der Gewebeproben

Das Material wurde direkt im Operationssaal aus dem bei der Transplantation gewonnenen linken Ventrikel entnommen, d.h. aus der freien Wand und ohne Anteile der Papillarmuskeln, umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren, und im Anschluss bei -80°C bis zur Weiterbehandlung aufbewahrt. Für die einzelnen Versuche wurde das Gewebe ohne chemische Weiterbehandlung direkt aus dem gefrorenen Zustand verwendet.

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Methoden zur Präparation und Analyse von DNA und RNA, gegebenenfalls unter entsprechenden Modifizierungen, gemäß den Angaben von Sambrook⁴² sowie Ausubel⁴³ und Mitarbeitern durchgeführt. Dies gilt ebenso für alle weiteren Versuche, bei denen unter anderem Protokolle der kommerziell erworbenen Produkte einzelner Firmen verwandt wurden.

2.2 Patienten

Es wurden 17 Patienten mit Linksherzinsuffizienz infolge dilatativer Kardiomyopathie und drei Kontrollen von nicht transplantierten Herzen untersucht. Als Kontrolle für glatte Muskulatur dienten vier Gewebeproben der linken arteria thoracica interna. Alle klinischen Daten sind in der Tabelle 3 zusammengefasst. Die 17 Patienten (siehe Tabelle) hatten eine terminale Herzinsuffizienz ($\text{EF} \leq 20\%$, ejection fraction, Ejektionsfraktion) und wurden deshalb transplantiert. Nach initial massiver Dilatation erhöht sich der LVEDP im Endstadium (left ventricular end-diastolic pressure, linksventrikulärer enddiastolischer Druck) als Folge einer erhöhten Steifigkeit des linken Ventrikels durch zunehmende Fibrosierung und stellenweise hypertrophe Kardiomyozyten. Dies trägt zur Reduzierung der EF bei.

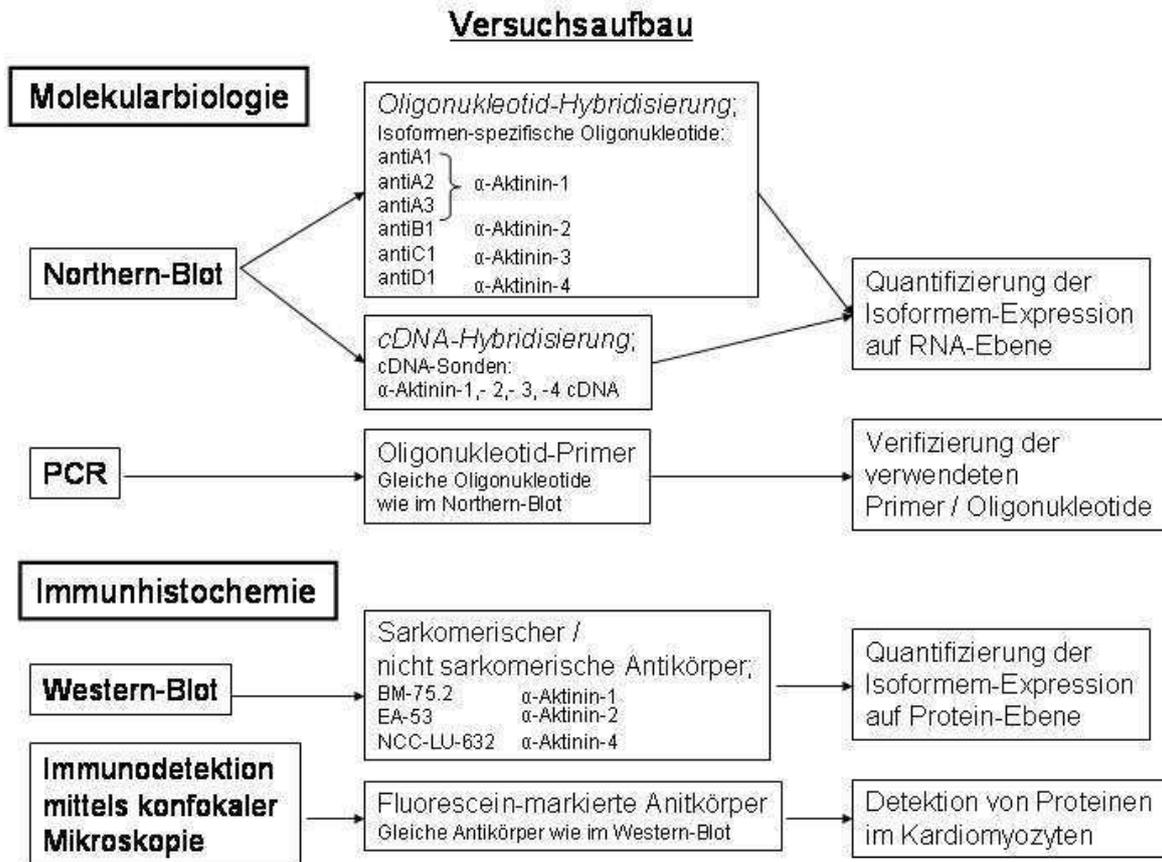
Bei dem ventrikulären Kontrollgewebe handelte es sich um Spenderherzen, welche für eine Transplantation vorgesehen waren, jedoch im Folgenden nicht transplantiert wurden. Die klinischen, hämodynamischen Parameter jeder Kontrolle befanden sich altersentsprechend im Normbereich (siehe Tabelle). Alle Kontrollgewebe konnten auch schon in früheren Studien als adäquate Kontrollen herangezogen werden.

Die wichtigsten hämodynamischen Daten der Patienten finden sich in der folgenden Tabelle.

Tab. 3: Klinische Daten der Patienten

Anzahl der Patienten	Geschlecht	Alter	LVEDP (mmHg)	EF (%)	PAP Mean (mmHg)	LVEDD (mm)
DCM (n=17)	16 m / 1 w	50.8±8.3	29.1±9.1	16±3.9	30.1±8.5	69.9±5.6
Kontrollen (n=3)	3 m	48±10	8-12	65-70	15-18	35-56

Das folgende Schaubild soll den im Folgenden beschriebenen Aufbau und Ablauf der Versuche darstellen.



2.3 Präparation und Analyse von RNA

Die im Folgenden beschriebene Analyse von RNA durch den Northern-Blot ist eine Methode, bei der die spezifische Markierung von RNA-Sequenzen durch die Hybridisierung mit komplementären Sonden möglich ist. Hierzu wird die nach Größe aufgetrennte RNA auf eine Membran übertragen. In unserem Fall wurden Oligonukleotidsonden, hier spezifische Vertreter der einzelnen mRNA's, und cDNA-Sonden als hochsignifikant komplementäre Stränge der ursprünglichen mRNA benutzt.

2.3.1 Isolierung von totaler RNA

Material

- Guanidiniumthiozyanat ($C_2H_6N_4S$), Roth GmbH Karlsruhe
- Tri-Natriumcitrat-Dihydrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$), Roth GmbH Karlsruhe
- N-Lauroylsarcosine Natrium Salz 0,5%
- 2 Mercapto-ethanol ($C_2H_6O_5$), Roth GmbH Karlsruhe
- Trichlormethan/Chloroform ($CHCl_3$), Roth GmbH Karlsruhe
- Isoamylalkohol ($C_5H_{12}O$), Roth
- Aqua-Roti-Phenol (für RNA-Isolierung), Roth
- 2-Propanol-Isopropanol (C_3H_8O), Roth
- Na-Acetat ($C_2H_3NaO_2$), Roth
- Ethanol absolut, Riedel-de Häen
- flüssiger Stickstoff
- 15 ml Polypropylene Round Bottom Tube 17x100 mm Nonpyrogenic, Falcon
- Vortexer
- Homogenisator Ultra-Turrax T 25, Janke-Kunkel, IKA-Labortechnik
- 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße
- Mörser und Schale
- Zentrifuge Sorvall RC5B, Du Pont Instruments

Methode

Die Guanidinium-Phenol-Chloroform-Methode wird sowohl zur RNA-Isolation aus Zellen, als auch aus Gewebe angewandt. Das folgende Protokoll beschreibt die RNA-Isolation aus 0,15 g humanem, linksventrikulärem Myokard. Die Isolierung von totaler RNA erfolgte nach der von Chomzynki und Sacchi beschriebenen Methode⁴⁴, die eine hohe Ausbeute und Reinheit bei Einsatz kleiner Gewebemengen ermöglicht. Zu Beginn wird eine Denaturierungslösung („Stocklösung“) je nach benötigtem Volumen angesetzt. Bei 100 ml besteht diese aus 47,25 g Guanidiniumthiozyanat (Endkonzentration 4M), 2,5 ml Na Citrat und 0,5 g Laurylsarcosyl-Na-Salz.

Zur RNA-Isolation wurde die genannte Gewebemenge direkt aus flüssigem Stickstoff in ein 14 ml Polypropylen-Röhrchen mit 2 ml Guanidiniumpuffer-Isothiocyanat-Lösung (4M Guanidinium-Isothiocyanat), 25mM Natriumcitrat pH 7, 0,5% Natrium-Sarcosyl, 0.1 M Mercaptoethanol eingewogen und mit Hilfe des Ultra-Turrax T25 homogenisiert. Zum Homogenat wurden 0,3 ml 2M Natriumacetatlösung (pH 4) hinzupipettiert, gut geschüttelt und 15 min. auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben mit einer Großraumzentrifuge für 40 min. bei 10000 rpm und 4°C abzentrifugiert und die obere Phase in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Durch Zugabe von 3 ml Isopropanol wurde die RNA über Nacht bei – 20°C präzipitiert. Am nächsten Tag wurde die RNA bei 10000 rpm und 4°C für 15 min. in der Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert und das entstandene Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 200 µl Guanidinium-Isothiocyanat-Lösung gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt.

Es erfolgte die Zugabe von 500 µl Isopropanol, wodurch die RNA nach 3 h bei -20°C präzipitiert und danach durch Zentrifugation bei 4°C und 14000 rpm pelletiert wurde. Das Pellet wurde im Folgenden zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, vakuum-getrocknet und in 100 µl Aqua dest. für 10 min. bei 65°C im Schüttelinukbator gelöst.

2.3.1.1 Photometrische Konzentrationsmessung

Material

Präzisionsküvetten aus Quarzglas, Hellma, MAGV Laborgeräte
Photometer Ultraspec Plus, LKB Biochrom, Pharmacia Biosystems

Methode

Die RNA-Konzentration wurde durch Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine OD₂₆₀ von 1,0 entspricht einer RNA-Menge von 40 µg/ml. Die Reinheit der RNA-Präparation lässt sich über die Ratio OD₂₆₀/OD₂₈₀ ermitteln, die einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 einnehmen sollte. Zur Stabilisierung erfolgte die Zugabe von 2,5 Vol. Ethanol, und die RNA wurde bei -80°C gelagert.

Nach der photometrischen Messung wurde mit folgender Formel die auf das Gel aufzutragende Menge errechnet:

$$\frac{\text{Extinktion (260nm)} \times \text{Verdünnung in Küvette} \times 40}{1000} \\ = \mu\text{g RNA} / \mu\text{l H}_2\text{O}$$

2.3.2 Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen (Blotten)

2.3.2.1 Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese

Material

- Agarose (Seakem LE, Biozym, Hameln)
- 10 x MOPS-Puffer (0,2 M MOPS [Roth, Karlsruhe], 50 mM Natriumacetat, 10mM EDTA, pH7)
- Aqua dest.
- Erlenmeyerkolben
- Formaldehyd (37%, Merck, Darmstadt, Endkonzentration:0,66 M)
- Probenpuffer (750 µl deionisiertes Formamid [Gibco BRL, Eggenstein], 150 µl 10 x MOPS-Puffer, 240 µl Formaldehyd, 100 µl Glyzerin, 8 mg Bromphenolblau auf 1,5 ml mit Aqua dest)
- Ethidiumbromid (1mg/ml)

- RNA-Molekulargewichtsmarker, Promega
 - Fragmentgrößen (kb): 6583, 4981, 3638, 2604, 1908, 1383, 955, 623, 281
- Elektrophoresekammer

Methode

Die RNA wie auch die DNA wandert aufgrund ihres negativ geladenen Zucker-Phosphat-Gerüsts im elektrischen Feld, was die Auftrennung der RNA ihrer Größe nach im denaturierenden Formaldehydgel ermöglicht⁴⁵. Je kleiner das aufzutrennende Fragment ist, um so hochprozentiger muss das Gel sein. In diesem Fall wurde ein 1%iges Gel benutzt. Dazu wurden 2 g Agarose und 200 µl A. dest. in einen Erlmeyerkolben im Mikrowellenherd aufgeköcht und vollständig gelöst. Nachdem die Agaroselösung auf 50°C abgekühlt war, wurden 5,2 ml Formaldehyd dazugegeben, die Lösung in eine vorbereitete Gelkammer gegossen und ein Probenkamm eingesetzt, nachdem diese mit „RNase Away“ gereinigt worden war.

Es wurden nun, nach erfolgter RNA-Konzentrationsmessung, 15 µg RNA in einem sterilen Eppendorfgefäß vakuum-getrocknet und in 12 µl Probenpuffer und 1 µl Ethidiumbromid gelöst. Die Denaturierung der RNA-Proben erfolgte durch 15-minütige Inkubation bei 65°C. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Ebenso wurde der Probenpuffer behandelt, der auch auf das Gel aufgetragen wurde, um auch für diesen gleiche Laufeigenschaften im Gel zu ermöglichen. Die Gelelektrophorese wurde je nach verwendeter Elektrophoresekammer bei 60-100 V mit 1x MOPS-Puffer durchgeführt. Jedes Gel wurde, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu testen, mindestens einmal wiederholt, geblottet und anschließend bei Northern-Blot-Hybridisierungen eingesetzt (siehe folgende Kapitel).

Vor dem Blotten wurde das Gel noch mittels einer Polaroid-Kamera fotografiert.

2.3.2.2 Kapillar-Blot

Material

- 10 x SSC (1,5 M NaCl, 0,15 M Tri-Na-Citrat [Merck], pH 7,0 mit HCL einstellen)
- Nylonmembran (Hybond N), Amersham
- Whatman3MM-Papier
- Papiertücher, Filterpapier
- 2 flache Schale
- auf Schalen passende Brücke
- Glasplatte
- Gewicht
- Transluminator (Herolab, UVT 2035)
- UV-Stratalinker 1800 (Stratagene, Heidelberg)

Methode

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für jeweils 10 min. in A. dest. sowie 20 x SSC zur Entfernung des Formaldehyds gewaschen.

Bei dieser Art von Blot handelt es sich um einen Kapillar-Blot, der mit Hilfe der Kapillarkräfte Nukleinsäuren, in diesem Fall die RNA, von dem Gel auf die Membran transferiert.

Für den Kapillar-Blot wurde eine ca. 8 cm hohe Schicht aus saugfähigen Papiertüchern, die mindestens die Größe des zu blottenden Gels hatten, auf einer Glasplatte gestapelt. Die Glasplatte verband zwei einander gegenüberliegende mit 10 x SSC gefüllte Pufferreservoir. Dem Gel angepasst wurden in gleicher Größe drei Lagen Whatman3MM-Papier und eine Nylonmembran zugeschnitten und auf die Papiertücher gelegt, nachdem alles in A. dest. und später in 10 x SSC getränkt wurde. Auf diese Nylonmembran wurde das Gel möglichst ohne Luftblasen platziert. Danach wurde der Teil des MM-Papier, der nicht in Kontakt mit dem Gel stand, mit Frischhaltefolie abgedeckt, um zu verhindern, dass der Puffer aus dem Reservoir direkt in die Papiertücher läuft.

Anschließend wurden zwei in 10 x SSC getränkte Streifen 3MM-Papier auf das Gel gelegt, welche groß genug waren, um das Gel vollständig zu bedecken und an den Seiten in beide Pufferreservoir reichten. Zum Schluss wurde eine Glasplatte auf den Stapel gelegt und mit einem Gewicht beschwert.

Hierbei ist zu beachten, dass der ausgeübte Druck auf das Gel nicht zu stark ist, da ansonsten die Struktur des Gels zerstört und die Poren gestaucht würden. Ist dies der Fall, wird der Transfer der RNA auf die Membran reduziert oder sogar verhindert. Um die Kapillarkräfte optimal zu verstärken, wurde ein Gewicht von ca. $1\text{g}/\text{cm}^2$ auf die Glasplatte aufgelegt. Der Transfer erfolgte mit diesem Aufbau innerhalb eines Zeitraums von 12-18 Stunden.

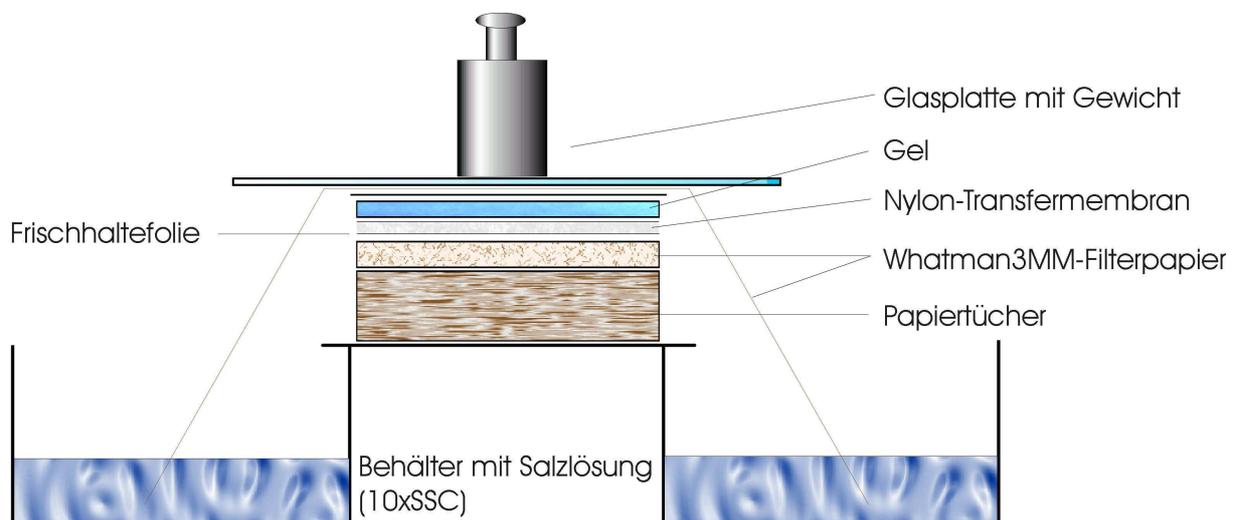


Abb. 6: Schematischer Aufbau eines Kapillarblots für den RNA-Transfer auf die Nylonmembran.

Nach dem Blotten wurden das Gel und die Membran auf dem Transilluminator auf den vollständigen Transfer, besonders der hochmolekularen RNA, untersucht. Die Nylonmembran wurde kurz in 2 x SSC gespült und an der Luft getrocknet. Die Fixierung der RNA aus der Membran erfolgte durch UV-Licht mit einem UV-Crosslinker bei 120 mJ/cm². Die Positionen der 28S und 18S rRNA wurden unter UV-Licht mit einem Bleistift auf der Membran markiert. Die Lagerung der Membran erfolgte im Dunklen zwischen zwei Lagen Whatman 3MM-Papier.

2.4. Northern-Blot-Hybridisierung

2.4.1 Isolation von Hybridisierungssonden (cDNA)

2.4.1.1 Insertpräparation und Fragmentisolation

Material

- Aktinin 1-Sonde: - PCR-Produkt, Plasmid # 263, Exp. Kardiologie, Bad Nauheim
- Vektor: pGEM-T Easy, Promega
- schneidendes Enzym: Eco R1, Promega
- Puffer: Multicore 10x Puffer, Promega
- Bovine Serum Albumin-Acetylated (BSA), Promega
- H₂O
- Aktinin 2-Sonde: - PCR-Produkt, Plasmid # 81590, J. Ventre, NIH, USA
- Vektor: pBluescript, SR
- schneidendes Enzym: Eco R1, Promega
- Puffer: Multicore 10x Puffer, Promega
- Bovine Serum Albumin-Acetylated (BSA), Promega
- H₂O
- Aktinin 3-Sonde: - PCR-Produkt, Plasmid # 37, Exp. Kardiologie, Bad Nauheim
- Vektor: pGEM-T Easy, Promega
- schneidendes Enzym: Eco R1, Promega
- Puffer: Multicore 10x Puffer, Promega
- Bovine Serum Albumin-Acetylated (BSA), Promega
- H₂O
- Aktinin 4-Sonde: - PCR-Produkt, Plasmid # 4 überlassen von T. Yamada, Tokyo, Japan
- Vektor: pBK-CMV, Stratagene
- schneidendes Enzym: Eco R1, Promega
- Puffer: Multicore 10x Puffer, Promega
- Bovine Serum Albumin-Acetylated (BSA), Promega
- H₂O
- 18 S: - PCR-Produkt, Plasmid # 180, Exp. Kardiologie, Bad Nauheim
- Vektor: pUC830
- schneidendes Enzym: Eco R1/ Bam H1, Promega
- Puffer: Multicore 10x Puffer, Promega
- Bovine Serum Albumin-Acetylated (BSA), Promega
- H₂O

- Gelvorbereitung: - 10 X TBE (1.0M Tris, 0.9M Bohr-Säure, 0.01M EDTA), Gibco BRL
 - Agarose, Seakem GTG, BMA
 - Ethidiumbromid 10mg/ml
 - Elektrophoresekammer und Kamm
- Fragmentisierung: - Skalpell
 - Ultraclean 15 DNA-Purification Kit, MO Bio Lab., Dianova

Methode

Nachdem das passende Pipettierschema für die einzelnen Vektoren zusammengestellt worden war, wurden die verschiedenen Reagentien der einzelnen Sonden in einer bestimmten Reihenfolge zusammengegeben. Für die oben genannten Vektoren (Aktinin-1, -2, -4 und 18S) waren die Ansätze äquivalent.

Es war darauf zu achten, dass jeweils ein dem Gewicht des Geldstückes entsprechender Ansatz erstellt wurde.

Bsp. (gerechnet auf 100µl):

- Wasser	= 74,5 µl
- Puffer	= 10,0 µl
- BSA	= 1,0 µl
- Plasmid	= 11,5 µl (entsprechend der Konz.)
- Enzyme	= 3,0 µl

Wichtig hierbei war, dass die Enzyme erst zum Schluss hinzugegeben wurden.

Der Ansatz wurde dann für einige Sekunden in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und anschließend für 2h bei 37°C inkubiert.

Währenddessen wurden 40 ml 1 x TBE und 0,4 g Agarose in einem Mikrowellenherd bis zum Kochen erhitzt. Auf ca. 60 °C abgekühlt wurden 3 µl Ethidiumbromid direkt in die Gellösung gegeben und die Lösung in die Form ausgegossen.

Nach der Inkubationszeit pipettierte man den kompletten Ansatz mit 20 µl DNA-Ladepuffer in die Tasche des Gels. Die Gelelektrophorese wurde bei 80-90 V für 30 min. durchgeführt.

Im Anschluss wurde der Insert-Gelstreifen unter einer UV-Lampe aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA nach dem Genclean-Protokoll von „BIO101“ aufgereinigt.

Entsprechend dem Gewicht des Gelstücks (0,1g ≈ 100µl) wurde das 4,5fache Volumen an NaI und ½ Volumen an TBE-Modifier hinzugegeben, was die DNA von der Agarose trennen und diese auflösen sollte. Um die DNA zu eluieren, wurden 7 µl der Eluationslösung hinzugegeben und kurz abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde dann dreimal mit einer Waschlösung gewaschen und anschließend in 30 µl Wasser aufgenommen.

2.4.2 Kommerzielle Oligonukleotide

Diese zur Northern-Blot -Hybridisierung benutzten Oligonukleotide wurden mittels eines Sequenzvergleichs in einer öffentlich zugänglichen Datenbank ausgesucht und zur Herstellung bei *MWG-Biotech (Ebersberg)* in Auftrag gegeben.

Hierzu wurden die von den Proteinen bekannten mRNA auf Stellen untersucht, die diese von anderen mRNAs zu einem möglichst hohen Prozentsatz unterscheidbar machte. Diese Stellen, meist ca. 20 Nukleotide lang, wurden dann als Antisense-Nukleotide zur Hybridisierung eingesetzt. Zur Kontrolle wurden ebenso die Sense-Nukleotide benutzt⁴⁶.

Tab.4: Isoformen-spezifische Oligonukleotide

Bezeichnung (Nr. in der Genbank)	Sequenz (5-3')	Position in mRNA	Schmelz temperatur
α-Aktinin-1(sense) (# NM001102.2)			
# A1	CATTATGATTCTCAGCAAACCAAC	(118-141)	57,6°C
# A2	TACCACGTCAATATGGCGGGC	(1854-1875)	64,0°C
# A3	GATATTGGCAACGACCCC	(2452-2469)	56,0°C
α-Aktinin-1(antisense) (# NM001102.2)			
# antiA1	GTTGGTTTGCTGAGAATCATAATG	(118-141)	57,6°C
# antiA2	GCCCGCCATATTGACGTGGTA	(1854-1875)	64,0°C
# antiA3	GGGGTCGTTGCCAATATC	(2452-2469)	56,0°C
α-Aktinin-2(antisense) (# M86406)			
# antiB1	CTGATTCTGATGTTGTAGCTCTGAA TC	(1928-1954)	61,9°C
α-Aktinin-3(antisense) (# M86407)			
# antiC1	CTTCCGCTTTTATTGCATTCTGATG GGATGAG	(2878-2909)	66,9°C
α-Aktinin-4(antisense) (# M95178)			
# antiD1	GCGACTATGTGTGTCAGAGAGCCGA	(1521-1541)	64,2°C
18S (# AF508121)	CGGAACTACGACGGTATCTG	(1316-1336)	67,6°C

2.4.3 Radioaktive Markierung der Sonden

2.4.3.1 Markierung von cDNA mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$

Material

- Sonde (ACTN 1,2,4 cDNA)
- Steriles Wasser
- Rediprime II-random prime labelling kit, *Amersham Pharmacia Biotech*
- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$
- Thermoblock 37°C
- Thermoblock 95°C
- Whatman DE81-Papier
- 0,5 M KH_2PO_4 (*Merck, Darmstadt*)

Methode

Das Prinzip dieser Markierung ist das „random priming“ (Feinberg und Vogelstein, 1983). Es beruht darauf, dass Hexanukleotide verschiedenster Zusammensetzung mit dem zu markierenden DNA-Fragment hybridisieren und dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I als Start dienen. Die Polymerase synthetisiert einen komplementären Strang zur Zielsequenz, wobei radioaktiv markierte Nukleotide miteingebaut werden, in diesem Fall das $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$. Zur Markierung der cDNA-Proben, die durch Einbau radioaktiver Desoxynukleotide während der DNA-Neusynthese erfolgt, wurde das „rediprime II-Kit“ von *Amersham* verwendet.

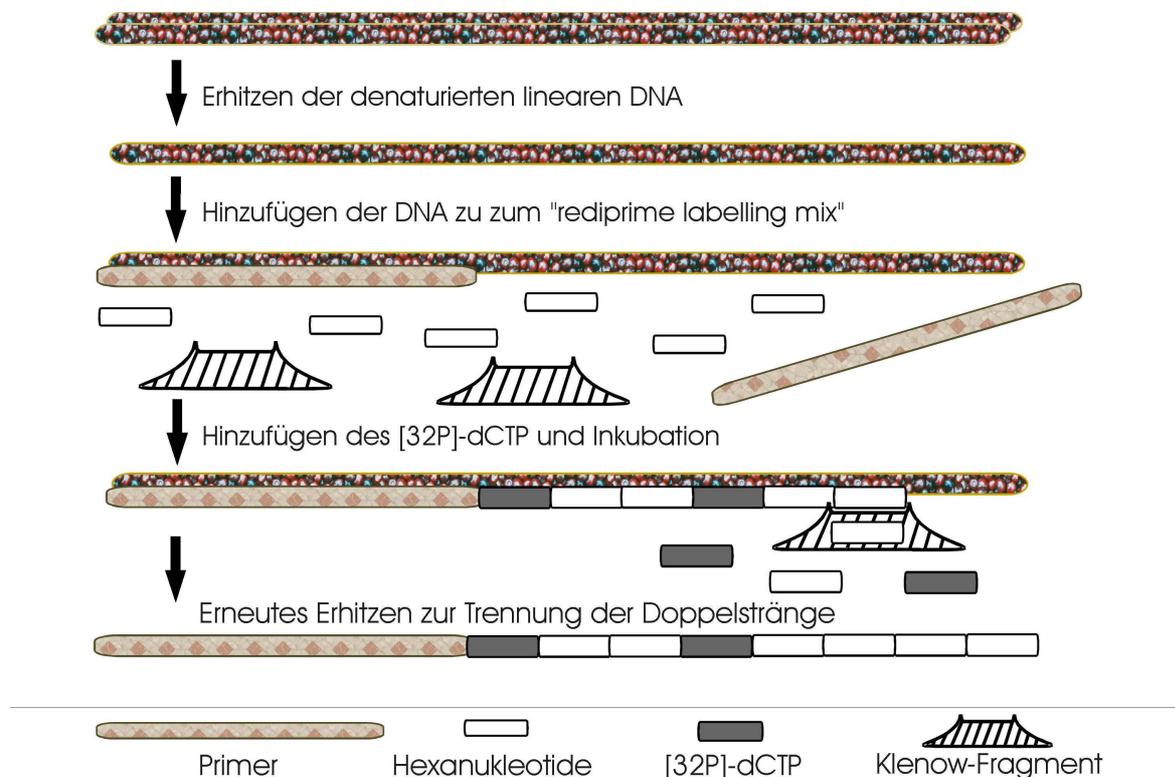


Abb. 7: Prinzip des „Random Priming“ nach Weinberg und Vogelstein (abgeändert nach Invitrogen-NuPage-Protokoll)

Die cDNA-Sonde wurde mit sterilem Wasser auf eine Konzentration von 50 ng verdünnt (meist 1 µl cDNA + 45 µl Wasser), 5 min. bei 95°C denaturiert, also einzelsträngig gemacht, und auf Eis abgekühlt. Zu dem Ansatz wurden nun 4 µl [α -³²P]dCTP hinzugegeben und dieser für 10 min. bei 37°C inkubiert.

Um die Reaktion zu beenden und die Doppelstränge zu trennen wurde die Probe erneut auf 95°C für ca. 5 min. erhitzt und bis zur Hybridisierung auf Eis gestellt.

Zur Quantifizierung der Markierungsreaktion, d.h. zur Messung der Menge der inkorporierten Nukleotide, wurde 1 µl des Ansatzes auf ein Ende eines 10 cm langen Streifens Whatman DE81-Papier getropft, welches im Gegensatz zu nicht inkorporierten Nukleotiden bindet. Der Papierstreifen wurde zwischen zwei Objektträger geklemmt und in eine Pufferwanne mit 0,5 M KH₂PO₄ als Laufpuffer gehängt. Die nicht inkorporierten Nukleotide wanderten mit der Laufmittelfront, während die DNA an ihrer Auftragsstelle zurückblieb. Nach Beendigung der Papierchromatographie wurde der Papierstreifen unter Rotlicht getrocknet und in einem Szintillationröhrchen mittels Cerenkow-Strahlung gemessen. In der Regel wurden 70-90% der eingesetzten Radioaktivität inkorporiert mit einer spezifischen Aktivität von etwa 10⁸ cpm/µg DNA.

2.4.3.2 Hybridisierung der Membran bei [α -³²P]dCTP-Markierung

Material

- Hybridisierungslösung:
 - 5 ml deionisiertes Formamid 50%
 - 2 ml Dextransulfat 10%
 - 0,5 ml SDS 10%
 - 2 ml 5M NaCl
 - steriles Wasser
 - 400 µl denaturierte Heringsperma-DNA, *Merck*
- Hybridisierungsröhre
- Hybridisierungsofen (42°C), *Bachhofer*

Methode

Die geblottete Nylonmembran wurde nun samt der Prähybridisierungslösung, welche der oben angegebenen Hybridisierungslösung entspricht, in eine Hybridisierungsröhre gegeben, entstandene Blasen weggedrückt und inkubierte bei gleichmäßiger Rotation in einem entsprechenden Ofen bei 42°C für mindestens 4h. Das Volumen an einzusetzender Prä / Hybridisierungslösung errechnete sich nach folgender Gleichung:

$$\text{ml Hybridisierungslösung} = 0,2 \times \text{Fläche der Membran (cm}^2\text{)}$$

Nukleotide, die nicht spezifisch gebunden haben, werden durch das in der Hybridisierungslösung enthaltene SDS weggespült. Das Formamid erhöht durch Aufbrechen der Wasserstoffbrücken der RNA die Stringenz, wodurch bei relativ niedriger Temperatur von 42°C hybridisiert werden konnte. Nach ca. 4 h wurde die radioaktiv markierte Sonde zugegeben. Bei 42°C ließ man die Membran dann zwischen 16 und 24 h hybridisieren⁴⁷.

2.4.3.3 Markierung von Oligonukleotiden mit [γ - ^{32}P]ATP

Material

- 1 μl von jeweiligem Oligonukleotid (10pmol/ μl) siehe 2.5.2
- 5 μl 10 x T₄-Polynukleotidkinase-Puffer, *Promega*
- 2 μl T₄ Polynukleotidkinase, *Promega*
- 36 μl steriles Wasser
- 6 μl [γ - ^{32}P]ATP
- 20 μl EDTA
- Chroma Spin-Kit, *Clontech*

Methode

Die meistgenutzte Reaktion bei der Markierung von Oligonukleotiden ist die 5'-End-Markierung mit einer Polynukleotidkinase. Das Enzym katalysiert hierbei den Transfer von einem γ -Phosphat-Molekül des Ribonukleosid 5'-triphosphates auf die 5'-hydroxyl-Gruppe des Oligonukleotids, wobei das [γ - ^{32}P]ATP das Phosphat-Molekül zur Verfügung stellt.

Die oben aufgeführten Materialien wurden zusammen in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert. Die Sonde, hier das Oligonukleotid, wurde mit einer Konzentration von 10 pmol/ μl eingesetzt. Es wurde außerdem darauf geachtet, dass die Polynukleotidkinase erst kurz vor Auftragung der Radioaktivität zugegeben wurde. Dieser Ansatz inkubierte anschließend für 30 min. bei 37°C. Beendet wurde die Reaktion dann durch Zugabe von 20 μl EDTA.

Um den Ansatz nun von Kontaminationen, wie Salzen, Polysacchariden und freien Nukleotiden, zu reinigen, wurde dieser durch eine Gelsäule zentrifugiert.

Das Prinzip basiert auf der Gelfiltrationschromatographie, bei der störende Moleküle durch die in der Gelsäure vorhandenen Harze selektiv zurückgehalten werden, abhängig von der Molekülgröße.

Moleküle, größer als die eigentliche Porengröße, werden von den Harzen ausgeschlossen und schnell durch das Gelbett geführt, während man die Säule kurze Zeit zentrifugiert. Kleinere Moleküle hingegen werden zurückgehalten.

2.4.3.4 Hybridisierung der Membran bei [γ - ^{32}P]ATP-Markierung

Material

- Hybridisierungslösung: 10 ml ExpressHyb Hybridisation Solution, *Clontech*
- Hybridisierungsröhre
- Hybridisierungsofen, 42°C

Methode

Auch hier wurde die benutzte Nylon Membran nun mit dem kommerziellen Puffer, der sowohl als Prähybridisierungslösung als auch zur Hybridisierung benutzt wurde, zusammen in eine Röhre gegeben. In dem Hybridisierungsofen inkubierte die Membran bei gleichmäßiger Rotation ca. 30 min. Danach wurde die gereinigte Sonde aufgetragen und ebenfalls bei 42°C für 1 h inkubiert.

2.4.4 Stringentes Waschen der Membran

Material

- Waschlösung I: - 1 x SSC
- 0,1 % SDS
- Waschlösung II: - 0,1 x SSC
- 0,1 % SDS
- Waschlösung III: - 0,01 x SSC
- 0,1 % SDS
- Schüttelwasserbad, SW-20C, Julabo
- Folie zum Einschweißen
- Röntgenfilm X-Omat AR, Kodak
- Filmkassette
- Verstärkerfolie
- -80°C-Tiefkühlschrank

Methode

Die Membran wurde folgenden stringenten Waschungen unterworfen:

1 x 5 min. bei Raumtemperatur mit Waschlösung I, 2 x 10 min. bei 40°C ebenfalls mit Waschlösung I und je nach Stärke des Hintergrundsignals, in seltenen Fällen mit der zweiten Waschlösung. Die feuchte Membran wurde in Frischhaltefolie eingewickelt, in eine Röntgenkassette gelegt, der Röntgenfilm aufgelegt und bei -80 °C, je nach verwendeter Sonde und Waschvorgang, zwischen 2 h-20 h, manchmal sogar bis zu einer Woche, exponiert.

War die Quantifizierung des Signals abgeschlossen, konnte die Membran dehybridisiert werden. Hierzu wurde die Waschlösung III bis zum Kochen erhitzt und direkt auf die Membran gegeben, was nötig war, um die Membran mehrmals hintereinander zu hybridisieren. Aus Kontrollzwecken erfolgte zum Schluß die Hybridisierung mit einer 18S cDNA-Probe.

2.4.5 Quantifizierung

Material

- PhosphorImager, *Molecular Dynamics, Freiburg*
- ImageQuant Software

Methode

Durch das Auflegen eines Röntgenfilms auf die hybridisierte Membran kam es wegen der ausgehenden Strahlung (α - und γ -Strahlung) zu einer Schwärzung des Films. Nach der Hybridisierung wurden die, durch die Schwärzung entstandenen Signale mit Hilfe des PhosphorImagers unter Gebrauch der dazugehörigen Software quantifiziert. Zur Auswertung kamen nur die Folien mit derselben Expositionszeit. Die Ergebnisse wurden normiert, um eventuelle unterschiedlich geladene Mengen an RNA zu berücksichtigen. Dazu wurden die Werte für jedes Hybridisierungssignal durch die des entsprechenden 18S rRNA Signals dividiert. In allen Fällen, sowohl im Western-, als auch im Northern-Blot, wurde die Membranen mindestens dreimal mit derselben Sonde, beziehungsweise demselben Antikörper inkubiert. Der Mittelwert der Daten, die für die Proben des linken Ventrikel der Kontrollherzen ermittelt wurden, wurde als 100% standardisiert.

2.5 Polymerasekettenreaktion

In unserem Fall wurde die PCR eingesetzt, um die Oligonukleotidsonden in ihrer Spezifität zu verifizieren. Als Ausgangsmatrize zur Herstellung der cDNA diente die schon vorhandene, aus dem Myokard gewonnene RNA. Die bekannten Oligonukleotide kamen als Primer zum Einsatz, um Anfang und Ende des definierten, zu vervielfältigenden Abschnitts festzulegen.

2.5.1 Reverse Transkriptase

Material

- 4 μ l 10 x Puffer RT (Reverse Transkriptase), *Qiagen*
- 4 μ l dNTP Mix, *Qiagen*
- 4 μ l Oligo-dT Primer (10 μ M), *Qiagen*
- 2 μ l RNase-Inhibitor(10 U/ μ l), *Promega*
- 2 μ l Omniscript Reverse Transcriptase, *Quiagen*
- 7 μ l steriles Wasser
- RNA-Matrize (aus genanntem Myokard gewonnene RNA), siehe Kap.2.4
- Inkubator

Methode

Als Vorlage diente das Protokoll „Omniscript Reverse Transcriptase“ von Qiagen. Hierzu wurden die oben genannten Reagenzien zu einem Gesamtvolumen von 40 µl zusammen pipettiert und der Ansatz bei 37°C für 60 min. inkubiert. Im Anschluss wurde dieser nochmals für 5 min. bei 93°C inkubiert um die Reaktion zu beenden. Die so gewonnene cDNA konnte nun als DNA-Vorlage für die PCR-Reaktion eingesetzt werden. Die cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.5.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Material

- PCR-Eppendorfgefäße
- 25 µl Taq-PCR Master Mix, *Quiagen*
- 18 µl steriles Wasser
- 2 µl cDNA
- 2,5 µl Primer A (#A1, #A2)
- 2,5 µl Primer B (#AntiA2, #AntiA3)
- Temperaturwechselgerät für PCR „*iCycler*“, *BIORAD*
- QIAquick PCR Purification Kit, *QIAGEN*

Methode

Bei dieser Methode nutzt man bestimmte Eigenschaften der DNA-Replikation. Die DNA-Polymerase bedient sich der Einzelstrang-DNA als Matrize für die Synthese eines neuen, komplementären Stranges^{48,49}. Außerdem benötigt die DNA-Polymerase ein kurzes Stück, um die Synthese zu beginnen, einen Primer.

In unserem Fall sollte ein bestimmter Bereich amplifiziert werden. So wurden zwei Oligonukleotidprimer, welche die Startpunkte vorgaben, eingesetzt, um bestimmte Produkte zu erlangen⁴⁶.

Folgende Primerkombinationen wurden eingesetzt:

ACTN1: # A1- antiA2 (118→1875)
 # A1- antiA3 (118→2469)
 # A2- antiA3 (1854→2469)

Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 5 µl.

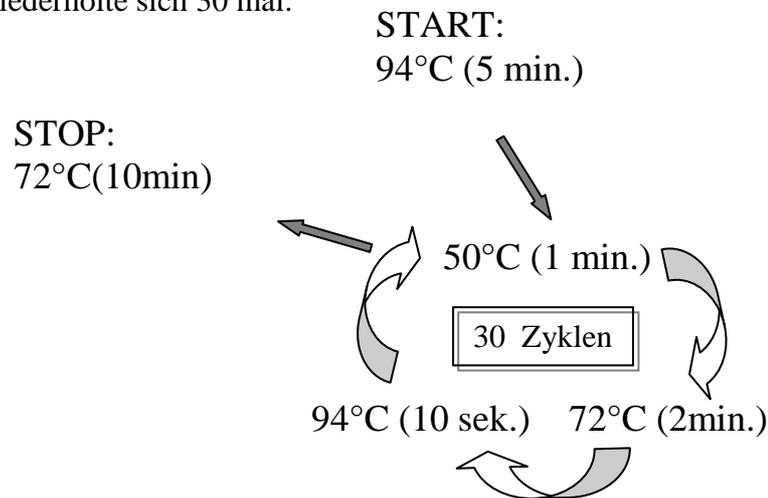
Der PCR-Zyklus wurde folgendermaßen gestaltet. Zuerst wurde das Reaktionsgemisch für 5 min. auf 94°C erhitzt, um die DNA zu denaturieren und um eine einzelsträngige Matrize für die Primer und die DNA-Polymerase zu bekommen. Nun begann der erste Zyklus. Die Temperatur wurde nun für 1 min. auf 50°C gesenkt, damit die Primer an die komplementäre Sequenz der DNA-Moleküle binden konnten, die so genannte *annealing*-Temperatur. Diese Temperatur bestimmt entscheidend über die Spezifität einer PCR. Dabei bilden sich die mit Primern verbundenen Matrizen für die DNA-Polymerase.

Im nächsten Schritt erhöhte man die Temperatur für 2 min. auf 72°C, welches die optimale Temperatur der hitzestabilen Taq-Polymerase ist, wobei nun die DNA-Synthese ablaufen konnte.

Am Ende wurde die Temperatur wiederum auf 94°C erhöht, jedoch nur für 10 Sekunden, so dass die kurzen Stücke doppelsträngiger DNA voneinander getrennt wurden. Diese Einzelstränge wurden nun in einem weiteren Zyklus wieder zu Matrizen.

Der Zyklus wurde dann durch Absenkung der Temperatur auf 72°C für eine Dauer von 10 Minuten gestoppt.

Der ganze Zyklus wiederholte sich 30 mal.



Das Programm wurde von einem dem *Thermal Cycler* übernommen, dessen Heizblöcke so programmiert werden konnten, dass die Zeit- und Temperaturzyklen für eine PCR automatisch abliefen.

Am Ende wurden die PCR-Produkte mit dem Quiaquick PCR Purification Kit aufgereinigt, welches eine direkte Reinigung von doppel- oder einzelsträngigen PCR-Produkten aus der Amplifikationsreaktion ermöglicht.

2.5.3 Ligation

Ziel der Ligation im Rahmen einer Klonierung war, die durch die PCR neu gewonnene DNA-Sequenz in einen bakteriellen Vektor zu integrieren, um sie später zu verifizieren. Diese Vektoren stammen von bakteriellen Plasmiden ab, welche mit Hilfe von speziellen Restriktionsenzymen geschnitten werden. Sie dienen als Transportvehikel zur Übertragung eines bestimmten DNA-Stranges in die DNA einer Empfängerzelle, wo dieser eingebaut und durch wiederholte Teilung vermehrt wird.

Die Ziel-DNA-Sequenz, die in einer PCR-Reaktion aus chromosomaler DNA hergestellt und nun als Insert in den Vektor integriert wurde, wird mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten, so dass komplementäre Enden an Vektor und Ziel-DNA entstehen. So ist es nun möglich den Vektor und das Ziel-DNA-Stück miteinander zu verbinden. Dieser Vorgang, die Ligation, wird durch die T4-DNA-Ligase katalysiert.

Material

- 5 µl 2 x Rapid Ligation Buffer, *PROMEGA*
- 1 µl pGEM-T-Easy-Vektor, *PROMEGA*
- 1 µl T4 DNA Ligase, *PROMEGA*
- 3 µl PCR-Produkt

Methode

Das p GEM-T-Easy-Protokoll (PROMEGA) diente als Vorlage. Die pGEM-T-Easy-Vektoren sind geeignete Systeme zum Klonieren von PCR-Produkten. An beide Enden des Vektors wird ein 3-terminales Thymidin angehängt, welches die Effektivität der Ligation von PCR-Produkten in Plasmide erhöht, da die Rezirkularisation des Vektors verhindert und ein Überhang für die PCR-Produkte geschaffen wird.

Die Ligation wurde in einem Mengenverhältnis (Molarverhältnis) Vektor zu Fragment von 1:3 durchgeführt. Bei einem Gesamtvolumen von 10 µl wurde der Ansatz bei 4°C über Nacht inkubiert, um die höchstmögliche Anzahl an Transformanten zu erlangen⁵⁰.

2.5.4 Transformation

Material

- LB-Platten mit Ampicillin
- 4 µl IPTG
- 40 µl X-Gal (Brom-chlor-indolyl-β-galactosid)
- 2 µl der Ligationreaktion
- 50 µl JM 109 High Efficiency Competent Cells, Promega
- 900 µl LB-Medium (Luria-Bertani-Medium):
 - 10 g/l Pepton, aus Caseintryptisch verdaut, *ROTH*
 - 5 g/l Hefeextrakt, *DIFCO*
 - 5 g/l NaCl
 - Sterilisieren (Autoklavieren)
- Thermostat, *ROTH*
- Ofen, *Heraeus*

Methode

Auch hier wurde das Protokoll von PROMEGA als Arbeitsvorlage genutzt.

Eine erfolgreiche Klonierung des Inserts in den Vektoren unterbricht normalerweise die kodierende Sequenz der β-Galaktosidase. Somit können rekombinante Klone, die keine aktive β-Galaktosidase produzieren, durch die sogenannte Blau-Weiß-Selektion identifiziert werden. Dafür wurden die LB-Ampicillin-Platten mit X-Gal und IPTG ausgestrichen und bei 37°C in einem Ofen inkubiert. X-Gal wird nun durch eine aktive β-Galaktosidase gespalten, wodurch eine Blaufärbung hervorgerufen wird, und nicht PCR-Produkt tragende Klone (blau) von tragenden (weiß) unterschieden werden können.

Zur Kultivierung von Kolonien wurden 2 µl der Ligations-Reaktion zusammen mit 50 µl 109 hochkompetenten Zellen in einem Eppendorfgefäß für 20 min. auf Eis inkubiert. Danach setzt man die Zellen 50 Sekunden einer Temperatur von 42°C aus. Anschließend wurden sie wieder für 2 min. auf Eis inkubiert.

Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium (ohne Ampicillin) wurde der Ansatz für 5 min. in einen 37°C warmen Inkubator gestellt. Die vorbereiteten Platten wurden nun mit 100 µl dieses Ansatzes ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.5.5 Plasmidpräparation

Die zu vervielfältigende DNA-Sequenz wird in die Plasmide eingefügt, die über ein Gen mit einer Antibiotikaresistenz verfügen. Im Folgenden werden diese Plasmide in Bakterien eingebracht, die auf einem mit dem entsprechenden Antibiotikum behandelten Nährmedium wachsen. Hier werden also Bakterien selektiert, die das Plasmid mit der Information für die Resistenz und damit auch das gewünschte Gen enthalten.

Material

- LB-Medium mit Ampicillin
- Gezüchtete Bakterienkolonien
- 5 ml Kulturröhrchen
- Bakterienschüttler
- Plasmid-Purification-Kit, *Pomega*

Methode

In 3 ml autoklaviertes LB-Medium, versetzt mit Ampicillin (150 mg/ml), wurden einige der auf den Platten gewachsenen Kolonien in Kulturröhrchen gegeben. Diesen Ansatz ließ man über Nacht bei 37°C und 250 rpm schütteln.

Mit diesem Ansatz wurde im Folgenden eine Mini-Präparation von Plasmid-DNA durchgeführt, welche sich an dem Protokoll für Mini-Präparation von *Pomega* orientierte. Dazu wurden zunächst 2 ml des Ansatzes in ein Eppendorfgefäß gegeben und für 2 min. bei 14000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 200 µl Zell-Resuspensionspuffer aufgelöst. Dazu pipettierte man 200 µl Lysepuffer und 200 µl Neutralisierungspuffer und zentrifugierte den Ansatz 5 min. bei 10000 rpm, wodurch die Bakterienzellen aufgeschlossen wurden und nach der alkalischen Lyse eine Fällung der Proteine erfolgte.

Das entstandene klare Lysat wurde zusammen mit 1 ml eines in Lösung gebrachten Salzes unter Vakuumbedingungen durch eine Säule eluiert, wodurch sich die DNA von festen Zellbestandteilen trennen konnte.

Im folgenden Schritt wurden noch 2 ml Waschlösung auf die Säule gegeben, um die DNA vollständig von möglichen Restbestandteilen zu reinigen. Die in dem Filter der Säule verbliebene DNA wurde von diesem durch Zugabe von 30 µl erwärmtem Wasser gelöst und in einem Eppendorfgefäß bei 4°C aufbewahrt.

2.5.6 Restriktionsverdau

Material

- Restriktionsendonukleasen, *Pomega*: - *Eco RI*
- Puffer: Multicore 10 x Puffer, *Pomega*
- BSA, *Pomega*
- Steriles Wasser
- DNA-Ladepuffer
- TBE
- Agarose
- 37°C Thermoblock

Methode

Das Prinzip des Restriktionverdaus ist die Erkennung einer spezifischen Schnittstelle in der DNA durch die Endonuklease. Das eingesetzte Enzym hatte folgende Palindromerkennungsstelle:



Die entsprechende Menge an Plasmid-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym unter Zugabe von Multicore 10 x Puffer 3h bei 37 °C verdaut. Mit DNA-Ladepuffer wurde die Reaktion abgestoppt und die Proben auf ein 1 %iges Agarosegel zur Auftrennung aufgetragen.

2.5.7 Automatische DNA-Sequenzierung mit Hilfe des „A.L.F.“

Material

- ALFexpress-Sequenzierautomat, *Pharmacia*
- „ALF-Manager“-Software Version
- „AutoRead-DNA-Sequencing-Kit“, *Pharmacia*
- Oligonukleotide, *Pharmacia*
- Sequenzgel: - 6 % Polyacrylamid
- 7 M Harnstoff
- PC/GENE-Software (IntelleGenetics Inc.)

Methode

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte nach der Didesoxymethode (Sanger, 1977) unter Zuhilfenahme des „AutoRead-DNA-Sequencing-Kits“.

Als Primer wurden 5`-Fluorescein markierte Oligonukleotide verwendet. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem Sequenzgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe des A.L.F-Sequenzierautomaten detektiert. Prozessierung, Speicherung und Ausgabe der Sequenzdaten erfolgte unter Verwendung des Programms „ALF-Manager“. Die Sequenzanalyse wurde mit Hilfe des Programms PC/GENE, als auch über das Internet mittels Datenabgleich öffentlicher Datenbanken und der CELERA-Datenbank, durchgeführt.

2.6 Proteinextraktion und Analyse

Die Untersuchungstechnik des Western-Blots wurde in unserem Fall, mit gleicher Absicht wie der Northern-Blot auf RNA-Ebene, zur Analyse und Identifizierung des Proteins α -Aktinin und seiner Isoformen auf Protein-Ebene eingesetzt. Hierzu kamen spezifische Antikörper zur Detektion zum Einsatz.

2.6.1 Proteinextraktion aus Gewebe und Bestimmung der Konzentration

Material

- 0,1g Myokard
- RIPA-Puffer: - 10 mM Tris HCl pH 7.4
 - 0.15 M NaCl
 - 1 % Na-Desoxycholat
 - 1 % Triton X 100
 - 0,1 % SDS
 - 1 mM Na-Orthovanadat
- Phenylmethansulfonylfluorid [$C_6H_5CH_2SO_2F$], Fluka AG, CH
- Isopropanol
- Eis
- Ultraschall-Homogenisator „Sonifier“, BRANSON, Schwäbisch Gmünd
- BIORAD-Reagentien: - Reagens A (alkalische Kupferatratlösung)
 - Reagens B (Folin-Reagens)
 - Reagens C
- Albumin Standard (Bovine Serum Albumin-BSA), PIERCE, Rockford, Illinois
- Titerplatte
- Photometer Biomek 1000, Beckmann

Methode

Auch hier wurde dieselben Myokardproben benutzt wie bei der Northern-Blot-Analyse. Der Puffer, in dem das Gewebe zerkleinert wurde, setzte sich folgendermaßen zusammen: 17,4 mg PMSF wurden in 1 ml Isopropanol gelöst. Davon pipettierte man 5,7 μ l in 1 ml RIPA-Puffer. In diesem Ansatz wurden anschließend die Gewebeprobe mit einem Sonicator zerkleinert. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass die Proben immer wieder auf Eis abgekühlt werden sollten. Die fertigen Proben wurden dann bei $-20^{\circ}C$ aufbewahrt.

Um eine gleichmäßige Beladung des Gels zu garantieren, wurden alle Proben einer Konzentrationsmessung unterzogen. Hierzu wurden das BIORAD-Protokoll und die dazugehörigen Reagenzien angewandt. Alle Messungen bezogen sich auf eine frisch angesetzte Konzentrationsreihe, bestehend aus BSA (2 μ g/ μ l), welche kurz vor der Messung angesetzt wurde.

Die folgende Tabelle zeigt die Verdünnung der BSA-Standardreihe, an der später die Konzentrationsmessung ausgerichtet wurde. Mit den Daten dieser Messung wurde eine Eichkurve erstellt. (siehe Abb.8)

Tab. 5: BSA-Standardreihe

	Standard-BSA	RIPA-Puffer	Konz. (μg)
0	-	100 μl	-
1	10 μl	90 μl	0,200
2	20 μl	80 μl	0,400
3	30 μl	70 μl	0,600
4	40 μl	60 μl	1,800
5	50 μl	50 μl	1,000
6	60 μl	40 μl	1,200
7	70 μl	30 μl	1,400

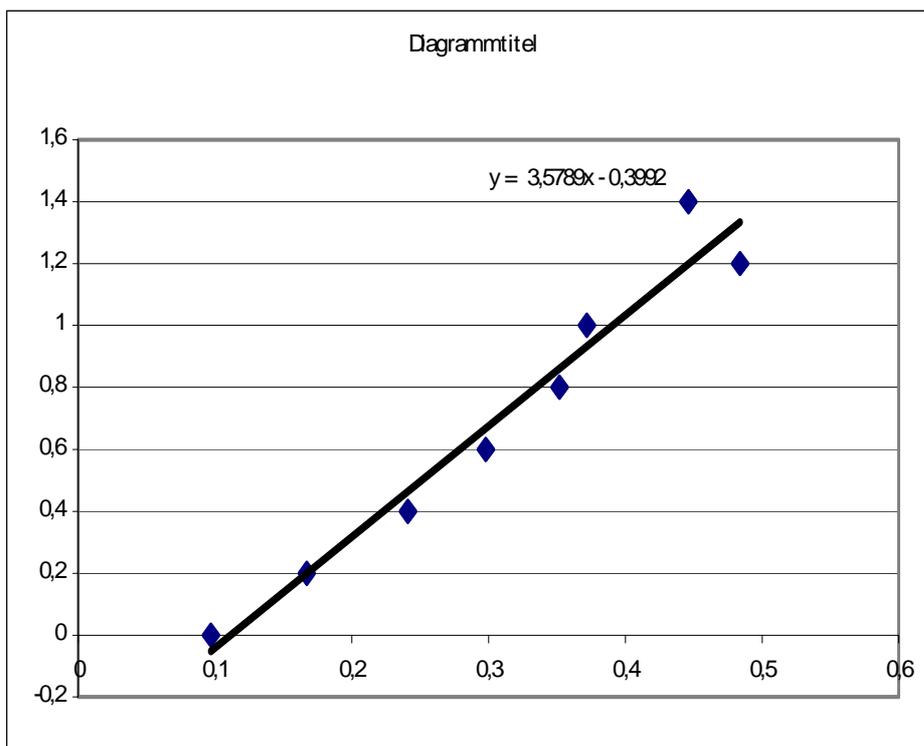


Abb.8: Die sich aus der Konzentrationsmessung ergebende Eichkurve, welche die Abweichung der Proben von der Standardverdünnung sichtbar macht.

Die Proben selbst wurden in einer Verdünnung von 1/5 und 1/10 auf die Titerplatte aufgetragen. Zu jeder Probe wurden dann folgende Mengen an BIORAD-Reagenzien pipettiert: 25 μl des Reagenzes A, 200 μl Reagenz B und je nach Anzahl der Proben, was vorher ausgerechnet wurde, 20 μl Reagenz S pro ml Reagenz A.

Die Titerplatte wurde dann für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss bei 690 nm in einem Photometer gemessen.

Die BIO-Rad Protein Konzentrationmessung ist eine farbintensitätsabhängige Analyse, die die Absorption des bei der Messung verwendeten Lichtspektrums beeinflusst. Die Analyse beruht auf einer Reaktion der Proteine mit einer alkalischen Kupferratrlösung und einem Folinreagent. Die Reaktion zwischen dem Protein und dem Kupfer im alkalischen Medium einerseits und die nachträgliche Reduktion des Folin-Reagenz andererseits führen zu der Farbgebung. Die maximale Absorption liegt nach ca. 15 min. bei 750 nm, die minimale bei 405 nm. Diese Färbung wird zum Schluss in Bezug zu dem Standard gesetzt.

2.6.2 Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western Blot)

Material

- Elektrophoresekammer, NOVEX
- NuPAGE 4-12 % Bis-Tris-Gels, NOVEX
- Steriles Wasser
- NuPAGE Reducing Agent (0.5M DDT in flüssiger Form) 1,5 µl
- NuPAGE 4 x LDS-Ladepuffer
- MultiMark Multi-Colored Protein-Marker (kDa), NOVEX
- 800 ml 1 x NuPAGE Running-Buffer (MES)
- 500 µl NuPAGE Running-Buffer-Antioxidant / 200 ml Run. Buffer
- XCell-Blot Modul
- Nitrocellulose-Membran
- Whatman3MM-Papier
- Schwämme
- NuPAGE Transferpuffer
- Methanol
- Netzgerät
- Ponceau-Färbelösung: - 0,3 % Ponceau S, Sigma
- 3 % Trichloressigsäure

Methode

Vor dem eigentlichen Western Blot wird ein Proteingemisch mit Hilfe einer Gel-Elektrophoresetechnik in einer Trägermatrix entsprechend ihrer Größe oder Ladung aufgetrennt. Hierbei migrieren die zu untersuchenden Proteine zuerst innerhalb des halbfesten Trägermaterials (in der Regel ein Polyacrylamid-Gel), so dass sich ein charakteristisches Muster unterschiedlich großer Proteinbanden ergibt. Beim Western Blot selber werden die aufgetrennte Proteingemische aus der Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Membran (Nitrozellulose), transferiert. An der Membranoberfläche bleiben diese aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften.

Nach der Konzentrationsbestimmung der Proben wurden diese zusammen mit je 1,5 µl Reducing Agent, Ladepuffer und sterilem Wasser mit einem Gesamtvolumen von 15 µl, 10 min. bei 70°C inkubiert. Daraufhin wurde das in der Elektrophoresekammer vorbereitete Gel mit den Proben beladen, wobei eine Spur des Gels mit einem standardisierten Molekulargewichts-Marker geladen wurde. Die innere Kammer wurde mit Antioxidanz behandeltem Laufpuffer gefüllt, die äußere mit dem normalen 1 x Laufpuffer. Die nun folgende Elektrophorese wurde bei 200 V über 1 h durchgeführt.

Um den Transfer auf die Nitrocellulose-Membran zu beginnen, wurde ein sogenanntes Membran-Gel „Sandwich“ aufgebaut (siehe Abbildung) und jede Lage in mit Ethanol versetztem Transferpuffer getränkt. Beim Aufbau des Blots war auf eventuelle Blasenbildung zu achten, die dann beseitigt werden mussten. Die Transferkammer wurde mit dem mit Ethanol behandelten Puffer aufgefüllt, die äußere Kammer hingegen mit Aqua dest. Der Transfer dauerte rund 2 h bei einer Spannung von 30 V.

Um später eine Aussage über die Größe der Proteine zu machen, wurde die Membran etwa 1 min. mit der Ponceau-Lösung gefärbt und mit destilliertem Wasser wieder entfärbt, bis die Banden des Molekularstandards sichtbar wurden. Die erscheinenden Banden wurden mit einem Bleistift markiert.

Anschließend konnte direkt eine Immundetektion erfolgen. Ansonsten wurde die Membran getrocknet in einer Frischhaltefolie aufbewahrt.

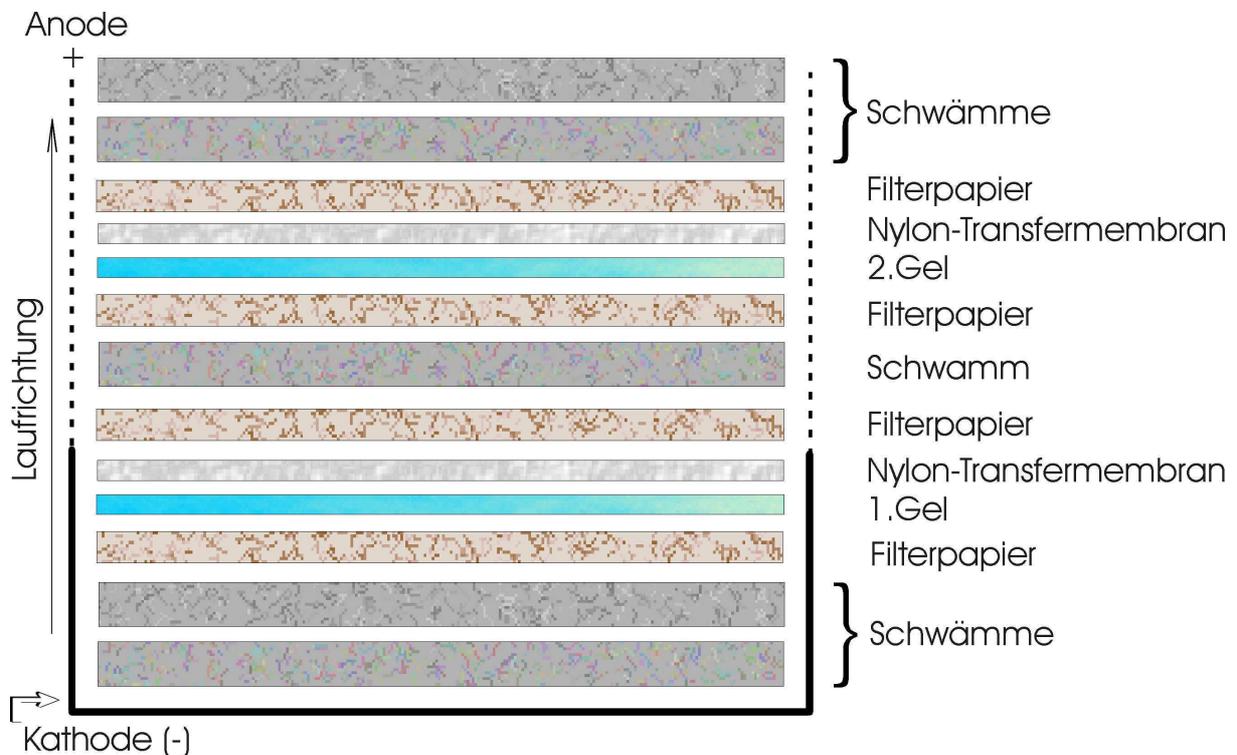


Abb. 9: Aufbau eines sogenannten Membran-Gel „Sandwich“ zur Durchführung eines Westernblots zwecks Proteintransfer, gemäß „Bis-Tris Gel Instruction Booklet der Firma Invitrogen.

2.7 Western-Blot-Analyse

2.7.1. Antikörper

Primäre Antikörper:

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene monoklonale Antikörper verwendet. Zusätzlich wurde später noch GAPDH als Referenz-Antikörper eingesetzt.

Tab. 6: Primäre Antikörper des Western-Blots

Antikörper	Art	Wirt	Antigen	Klon	Konz.	Firma
α -Aktinin-1 (# A-5044)	monoklonal	Maus	Milchdrüse nepithel der Kuh	BM-75.2	1:2000	Sigma
α -Aktinin-2 (#A-7811)	monoklonal	Maus	Kaninchen- muskel	EA 53	1:2000	Sigma
α -Aktinin-4 (Geschenk von Dr. T. Yamada)	monoklonal	Maus	Kaninchen- muskel	NCC-LU- 632	1:2000	National Cancer Center Research, Tokyo
GAPDH (# 5G4)	monoklonal	Maus	Kaninchen- muskel	6C5	1:2000	HyTest

Sekundäre Antikörper:

Tab. 7: Sekundäre Antikörper des Western-Blots

Antikörper	Art	Wirt	Konz.	Firma
Rabbit-anti- mouse Ig HRP	polyklonal	Kaninchen	1:10000	DAKO

Die primären Antikörper wurden jeweils in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt, d.h. 2,5 μ l Antikörper auf 5 ml Reaktionpuffer. Der sekundäre Antikörper wurde mit 1:10000 eingesetzt.

2.7.2 Immundetektion

Material

- BSA (Bovine Serum Albumin) kristallisiert, fettsäurefrei, Sigma
- TBS-T: - 2,42 g Tris-aminomethan, Roth, Karlsruhe
 - 8 g Na Chlorid , Roth
 - 1M Salzsäure zum Titrieren des pH-Wertes (7.6)
 - Tween 20, Roth
 - gelöst in 1l destilliertem Wasser

- 50 ml Falcongefäß
- Rollenmischer für Falconröhren, Merck
- Primärer Antikörper (EA 53, BM-75.2, NCC-LU-632, GAPDH)
- Sekundärer Antikörper
- ECL Western-Blot Detektionreagentien, Amersham Pharmazia Biotech
- ECL Hyperfilm, Amersham Pharmazia Biotech
- Frischhaltefolie
- Röntgenkassette
- Waschpuffer: - 8,28 ml Mercaptoethanol
- 200 ml Na-Duodecylsulfat
- 62,5 ml Tris HCl (pH 6.7)
- gelöst in 1l destilliertem Wasser

Methode

Die Behandlung der Membran bis hin zur Detektion wurde, etwas abgewandelt, dem Amersham-ECL-Protokoll entnommen.

Um von Beginn an unspezifische Bindungen zu unterdrücken, wurde die Membran mit 0,125 g fettfreiem BSA, welches in 5 ml TBS-T gelöst wurde, in einem Falcon-Gefäß für ca. 20 h bei 4°C geblockt. Danach folgte die erste Waschprozedur mit TBS-T, um das Blockreagenz abzuwaschen (1 x 15 min., 2 x 5 min.). Der erste Antikörper, mit einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt, inkubierte ebenfalls bei 4°C über einen Zeitraum von 20 h, wonach wieder die- selbe Waschprozedur folgte. Der zweite Antikörper wurde nur für 30 min. aufgetragen, mit nachfolgender, unveränderter Waschprozedur. Alle aufgeführten Vorgänge wurden auf einem Rollmischer durchgeführt.

Die Membran wurde nun dem ECL-Substrat für 1 min. ausgesetzt. Das ECL-Western-Blot-System ist eine lichtausstrahlende, nicht radioaktive Methode zum Detektieren von spezifischen Antigenen, die direkt oder indirekt an HRP-markierten (horseradish peroxidase-labeled) Antikörper binden.

Danach wurde die Membran in Frischhaltefolie eingepackt, in eine Röntgenkassette gelegt und ein ECL-Film für 2-20 Sekunden, je nach Signalintensität, exponiert.

2.7.3 Quantifizierung der Signale

Die Quantifizierung erfolgte wieder mit dem PhosphorImager und der dazugehörigen Software, wie unter 2.4.5 beschrieben. Hier wurden die einzelnen Proben jedoch nur in Bezug zu den Kontrollgeweben gesetzt.

2.8 Immunhistochemie und konfokale Mikroskopie

2.8.1 Mikrotomie

Material

- Tissue-Tec (Fa. Miles Inc.)
- Schneidegerät (Kryostat 1720 digital, Leitz)
- Glasobjektträger
- Gelatine

Methode

Nachdem die Proben mit Tissue-Tec auf Aluminiumzylindern aufgeblickt worden waren, wurden mit einem Kryostat Gefrierschnitte von 4µm Dicke angefertigt. Die Schneidetemperatur lag zwischen -20°C und -25°C. Die Schnitte wurden mit Gelatine beschichteten Objektträgern aufgenommen, um ein Ablösen der Schnitte während der Inkubationschritte zu verhindern.

2.8.2 Immunhistochemie

Mit Hilfe von Fluorescein-markierten Antikörpern können Strukturen (Antigen) der Zellen sichtbar gemacht werden, da sie im Fluoreszenzmikroskop mit Licht einer spezifischen Wellenlänge (Quecksilber-Dampf-Lampe oder Laserlicht) zum Leuchten angeregt werden. In dieser Studie wurden indirekte Methoden durchgeführt, d.h. der primäre Antikörper, der an das Antigen bindet, ist unkonjugiert. Er wird durch einen sekundären, gegen ihn gerichteten und konjugierten Antikörper nachgewiesen. Dieser zweite Antikörper ist entweder biotiniert oder direkt mit einem Farbstoff gekoppelt. Im ersten Fall wurde ein weiterer Schritt mit einem Detektionsantikörper (Streptavidin) notwendig, der dann an den zweiten Antikörper bindet. Zusätzlich wurde eine indirekte, orientierende Färbung mit Phalloidin durchgeführt, die zugleich eine Doppelfärbung darstellt, da neben dem eigentlichen Protein eine F-Aktin-Färbung (rot) sichtbar wird (siehe Abb. 37, S71).

Material

Primäre Antikörper

Hier kamen dieselben Antikörper wie im Western-Blot zum Einsatz. (siehe S. 32)

Sekundäre Antikörper

Es wurden verschiedene Sekundärantikörper verwendet:

Tab. 8: Sekundäre Antikörper

Name	Wirt	Konz.	Firma
Biotin-conjugated donkey anti-mouse	Esel	1:100	Dianova
FITC-conjugated anti-mouse	Esel	1:100	Dianova

Detektionssystem bei der Anwendung biotinylierter Sekundärantikörper

Tab. 9: Detektionsantikörper

Name	Konz.	Firma
Cy-2 conjugated Streptavidin	1:100	Rockland

Bei Cy-2 handelt es sich um ein rotfluoreszierendes Carbocyanin. Es ist auf Grund seines sehr hohen Extinktionskoeffizienten sehr leuchtintensiv. Von Vorteil ist seine Langzeitstabilität. Die Konjugation von Cy-2 an Streptavidin, das eine hohe Affinität zum Biotin des Sekundärantikörpers besitzt, führt zu einer intensiven Verstärkung des Signals durch Mehrfachbindung.

Puffer

PBS, pH 7,4:

Für die Stammlösung wurden 397,4 g NaCl, 10g KCL, 10 g H_2PO_4 und 88,75 g Na_2HPO_4 in 5 l A.dest. aufgelöst. Die gebrauchsfertige, auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellten Lösung bestand aus 500 ml der Stammlösung und 4500 ml A. dest.

4% PFA, pH 7,4:

40 g Paraformaldehyd (Merck), 3 Plätzchen Natriumhydroxyd (Merck) wurden in einem Liter PBS (pH 7,4) aufgelöst und mit 1 N HCl auf pH 7,4 eingestellt.

Inkubationpuffer:

0,05% BSA und 0,005% Triton-X in PBS pH 7,4

Mowiol:

Das schwer lösliche Mowiol (Hoechst) wurde bis zu 16 Stunden in PBS gerührt. Anschließend wurde es bei 12000 rpm abzentrifugiert und der Überstand im Kühlschrank bei 8°C gelagert. Es diente als Einschließmedium für die Präparate.

Methode

Bei diesen Experimenten wurde die indirekte Avidin-Biotin-Methode durchgeführt, die, wie bereits erwähnt, zugleich eine Doppelfärbung mit dem eingesetzten Phalloidin darstellt. Avidin kann durch Streptavidin, ein Protein von *Streptomyces avidinii*, ersetzt werden. Bei der hier vorgestellten Methode ist der sekundäre Antikörper biotinyliert.

Färbeprotokoll

Die Objektträger wurden während der Inkubationszeiten in einer feuchten Kammer aufbewahrt, um ein Verdunsten der Lösungen und ein Ausbleichen zu verhindern. Schritte Nr. 9b, 11 und 12 wurden bei der indirekten Avidin-Biotin-Methode zusätzlich durchgeführt.

Tab. 10: Färbeprotokoll

Nr.	Arbeitsschritte	Reagenzien	Temp.	Zeit
1	Fixierung	4% PFA	RT	5 min.
2	Spülen	PBS	RT	3 x 3 min.
3	Permeabilisierung	0,05 % Triton-X	RT	25 min.
4	Spülen	PBS	RT	3 x 3 min.
5	Blockierung	0,1 % BSA	RT	15 min.
6	Spülen	PBS	RT	3 x 3 min.
7	Inkubation	1. Antikörper	4°C	18 h
8	Spülen	PBS	RT	3 x 3 min.
9a	Inkubation	2. Antikörper (biotiniliert)	RT	3 h
9b	Zusammen mit 9a	Phalloidin (1:1000)		
10	Spülen	PBS	RT	3 x 3 min.
11	Inkubation	Streptavidin/FITC	RT	2 h
12	Spülen	PBS	RT	3 x 3 min.
13	Eindecken	Mowiol	RT	

Fixierung mit 4% PFA (Paraformaldehyd)

Aldehydfixierung führt zu einer Quervernetzung von Amino-, Amido- und anderen Gruppen. Sie bewirkt eine gute Strukturhaltung.

Permeabilisierung mit 0,05% Triton-X

Bei Triton-X handelt es sich um ein Detergenz, das eine Durchlässigkeit der Zellmembran bewirkt. Dies ist Voraussetzung für eine effiziente Diffusion der Antikörper in die Zelle bei der anschließenden Färbung. Außerdem werden hydrophobe Interaktionen zwischen Antikörpern und Zellen verhindert.

Herabsetzung der unspezifischen Bindung mit 0,1% BSA

BSA wird eingesetzt, um freie reaktive Gruppen abzusättigen und dadurch ein klares Ergebnis ohne unspezifische Hintergrundreaktionen (Background) zu erhalten.

Inkubation mit dem Primärantikörper

Die primären Antikörper wurden mit dem sogenannten Inkubationspuffer verdünnt und die histologischen Schnitte mit je 100 µl dieser Lösung beschichtet.

Inkubation mit dem Sekundärantikörper

Die sekundären Antikörper wurden mit PBS pH 7,4 auf die gewünschte Konzentration verdünnt und die Präparate mit je 100 µl überschichtet. Bei einer Doppelfärbung wurde TRITC-konjugiertes Phalloidin zusammen mit dem Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet.

Eindeckeln der Präparate

Ein mit Mowiol bestrichenes Deckgläschen wurde auf den noch feuchten Objektträger gelegt und leicht angedrückt, so dass mögliche Luftblasen zum Rand entweichen konnten. Die Objektträger wurden im Kühlschrank bei 4°C für mindestens 12 h aufbewahrt. Das Mowiol kann hierbei auspolymerisieren, und die Präparate werden vor dem Ausbleichen geschützt.

2.8.3 Konfokale Lasermikroskopie und Bildverarbeitung

Material

Konfokale Lasermikroskope

In diesem Fall kamen zwei verschiedene konfokale Lasermikroskope der Firma Leica zum Einsatz, das ältere Modell LEICA TCS 4D, das einen Argon-Krypton-Mischgaslaser besitzt, und die neuere Version LEICA TCS SP, die mit drei unterschiedlichen Lasern – Argon-, Krypton- und Helium-Neonlaser- ausgestattet ist.

Beim eigentlichen Mikroskop handelt es sich um ein Fluoreszenzmikroskop (Leica DM-RB), mit dem die Präparate in Auflichttechnik untersucht werden können. Dabei wird Licht einer 100 Watt Quecksilber-Dampf-Lampe durch Filter spezifischer Wellenlängenbereiche von oben kommend auf das Präparat geleitet. Nachdem das gewünschte Objekt eingestellt wurde, wird auf Laserlicht umgeschaltet. Das Laserlicht wird hierbei nicht durch Filter geleitet, sondern in einem Prisma aufgetrennt und in einer anschließenden Lochblende auf den gewünschten Wellenlängenbereich eingegrenzt. Außerdem haben die Laser verschiedene Spektren, so dass schon durch Auswahl eines bestimmten Lasers das Spektrum eingeschränkt werden kann. Die Hauptspektren der Laser betragen 488 nm (Krypton), 458 nm (Argon) und 568-633 nm (Helium-Neon).

Bei den Objektiven handelte es sich um ein 20x Objektiv `HC PL APO 20x/0.70 IMM CORR` und um ein 40x Objektiv `HCX PL APO 40x/1.25-0.75 OIL` (von Leica)

Die Wellenlängen der Anregungsbereiche der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe betragen wie folgt: FITC 494 nm, TRITC 554 nm, Cy-3 550 nm.

Computereinheit zur Bildverarbeitung

Die konfokalen Datensätze wurden zur anschließenden Bildverarbeitung auf eine Silicon Graphics Indy-Workstation übertragen. Diese Computereinheit ist mit zwei Programmen zur digitalen Bildverarbeitung, Imaris (Datenanalyse) und Selima (Datenarchivierung), ausgestattet. Die erstellten Bilder wurden mit einem Tintenstrahldrucker (Epson) ausgedruckt.

Methoden

Erklärung des konfokalen Prinzips

In einem "normalen" Lichtmikroskop ist das Bild eine Überlagerung aus einer scharfen Abbildung der Punkte im Fokus und einer unscharfen Abbildung der Punkte außerhalb. In einem Konfokalmikroskop dagegen passiert das vom Präparat ausgehende Licht (reflektiertes, transmittiertes oder auch Fluoreszenzlicht) eine Lochblende. Dadurch wird das Licht von außerhalb der Fokusebene ausgeblendet und erreicht nicht den Detektor. Das Ergebnis ist eine deutliche Reduzierung des Streulichts. Die effektive Auflösung ist dadurch auch ohne Zunahme der Vergrößerung viel höher als in einem herkömmlichen Lichtmikroskop. Aus diesem Grund ermöglicht dieses konfokale Prinzip zum Beispiel die Untersuchung kleiner Details von Zellen in Gewebeschnitten.

Die meisten Konfokalmikroskope sind Laser-Rastermikroskope. Bei diesen wird ein Laser-Brennfleck sehr schnell zeilenweise in einer Objektebene über das Präparat bewegt. Das Licht aus dem Brennfleck, also bestimmte Wellenlängen, angeregt von einem entsprechenden Laser, wird auf eine kleine Lochblende abgebildet, hinter der sich ein lichtempfindlicher Empfänger befindet. Aus dem Empfängersignal wird dann zeilenweise im Computer ein (Schnitt-)Bild zusammengesetzt.

2.9 Fixierung und Einbettung der Gewebeproben zur Auswertung mit dem Elektronenmikroskop

Material

- Puffer/Waschlösungen: - 3% Glutaraldehyd (pH 7,4/400mosmol)
- 0,1 M Cacodylatpuffer mit 7,5%iger Saccharose
- 1,6% Veronalacetatpuffer
- Propylenoxid
- Epon Kunstharz
- Ultramikrotom, LKB Bromma 8800 Ultratome III
- Elektronenmikroskop, Philips Typ EM 300

Methoden

Die Biopsien, die für das Elektronenmikroskop bestimmt waren, wurden für 4 Stunden in 3%iges, 4°C kaltes Glutaraldehyd mit physiologischem pH von 7,4 und einer Osmolarität von 400 mosmol gegeben.

Daraufhin wurden sie mehrmals in 0,1 M Cacodylatpuffer mit 7,5% Saccharose gewaschen und 2 Stunden in 1,6% OsO₄ in Veronalacetatpuffer postfixiert. Nach nochmaligem Waschen, aber dieses Mal in Veronalacetatpuffer, schloss sich die Dehydrierung der Gewebeproben in einer aufsteigenden Alkoholreihe an.

Abschließend wurden die Proben zweimal mit Propylenoxid behandelt und in Epon eingebettet.

Nach Aushärtung des Kunststoffes (3 Tage bei 50°C) konnte das Gewebe geschnitten werden. Mit einem LKB Bromma 8800 Ultratome III (Ultramikrotom) wurden Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 50nm angefertigt. Diese Schnitte wurden auf ein Kupfergrid aufgefangen und mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert.

2.10 Auswertung am Elektronenmikroskop

Bei der Auswertung am Elektronenmikroskop galt das Hauptaugenmerk akkumulativen Veränderungen des endoplasmatischen Retikulums bzw. subzellulären Organellen in DCM erkrankten Kardiomyozyten, sowie strukturellen Veränderungen der Zellorganellen.

Bei dem Elektronenmikroskop handelte es sich um ein Gerät der Firma Philips, Typ EM 300, das mit einem 35 mm Rollfilm bestückt war.

III. Ergebnisse

3.1 Analyse des Northern-Blots

3.1.1 Allgemeine Angaben zu den Versuchen

Bei der für die Northern-Blot-Analyse verwendeten Membran wurden alle Spuren gleichmäßig mit 15 µg der zu untersuchenden RNA beladen. Zur Kontrolle gegenüber den an dilatativer Kardiomyopathie (DCM) erkrankten Patienten wurden drei Spuren mit RNA von gesundem Myokard belegt. Um nun zusätzlich die Spezifität der einzelnen Oligonukleotide und cDNA's zu verifizieren, wurden darüber hinaus 4 Spuren mit RNA aus glatter Muskulatur, gewonnen aus der Arteria thoracica interna, aufgetragen. Diese Membran wurde jeweils dreimal mit der entsprechenden Sonde (cDNA und Oligonukleotide) hybridisiert, um die Signifikanz zu erhöhen und eventuelle Kreuzreaktionen erkennen zu können. Zum Größenvergleich der Signale wurde ein Molekulargewichtsmarker mit aufgetragen. Abb. 10 zeigt das Agarosegel mit der Beladung der aufgetrennten RNA.

Der folgende Ladeplan der Membran bezieht sich auf alle weiteren gezeigten Bilder der Northern-Blot –Analyse.

Ladeplan:

Spur	Gewebe
1-3	Kontrolle gesunde Herzen
4-17	Patienten DCM
18-21	Kontrolle glatte Muskulatur

Als Ladekontrolle und Referenzsignal für die spätere Auswertung der Banden der einzelnen Hybridisierungen diente eine 18S rRNA Oligonukleotidsonde⁵¹.

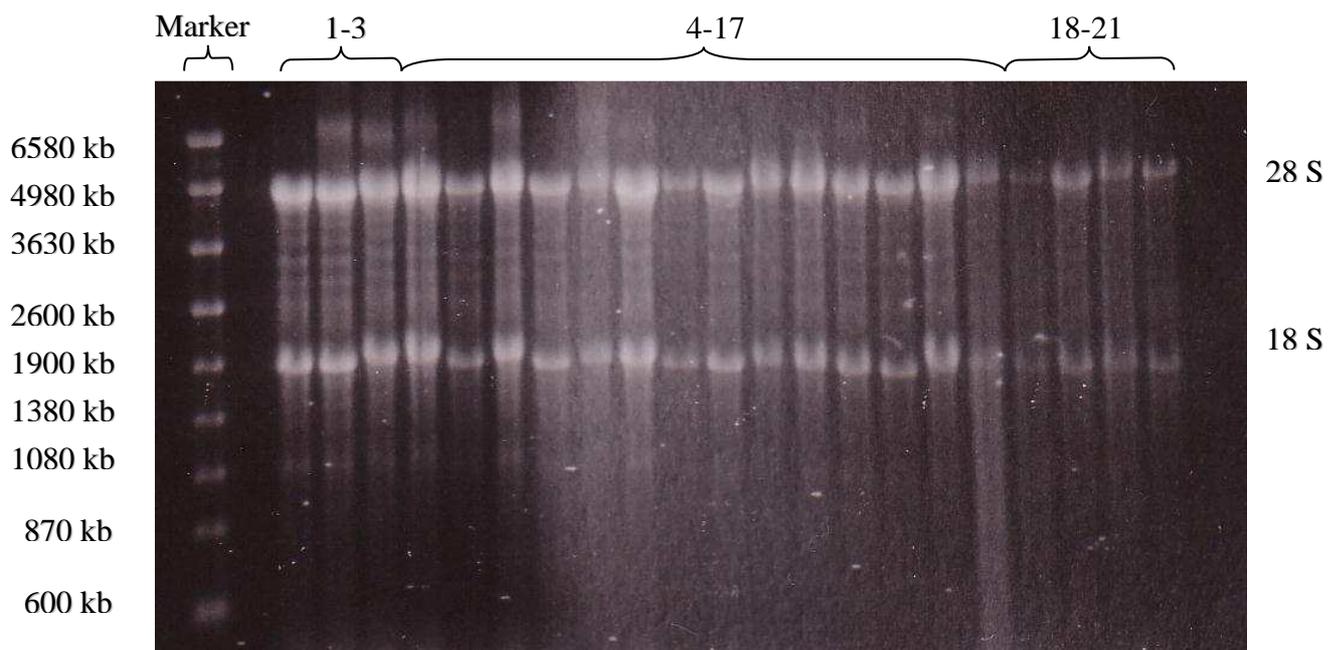


Abb. 10: Agarosegel mit beladenen Spuren und einem entsprechenden Molekulargewichtsmarker.

3.1.2 Northern-Blot-Analyse mit cDNA-Sonden

Zu Beginn der Northern-Blot Hybridisierungen wurden zunächst drei verschiedene cDNA-Sonden, passend zu den einzelnen Aktinin-Isoformen, ausgesucht und zur Detektion nacheinander radioaktiv markiert auf die Membran gegeben. Aus der Literatur^{29,30} und der EST Database (blast search) war die Größe der mRNA der Aktinin-Isoformen bekannt, welche in einem Bereich zwischen 3,0-3,5 kb liegt.

Um Kreuzhybridisierungen mit nicht-spezifischen Basen auszuschließen, wurde beim Waschen der Membran auf hohe Stringenz geachtet, was eine Waschtemperatur nahe dem Schmelzpunkt der Sonde und einen niedrigen Salzgehalt der Waschlösung beinhaltete. Alle aufgeführten Bilder sind repräsentativ und zeigen dieselbe Membran mit dem zur Ladekontrolle dienenden ribosomalen 18S Signal⁵¹. Es wurde jedoch in allen Fällen, bei gleichbleibender Signalintensität der Banden, exemplarisch nur eine Hybridisierung der jeweiligen Sonde abgebildet.

3.1.2.1 α -Aktinin-1 cDNA-Sonde

Bei der hier aufgetragenen, radioaktiv markierten Sonde handelt es sich um eine cDNA-Sonde, welche spezifisch für die nicht sarkomerische Form des α -Aktinin ist. Die Exposition des Röntgenfilms betrug, wie in allen anderen Fällen, 15h.

Das Signal für α -Aktinin liegt, wie erwartet, auf der Höhe von 3.5 kb, was aus der Literatur und der EST Database bekannt ist. Aufgrund der Signalintensität lässt sich jedoch hier kein Unterschied zwischen den Patienten und den Kontrollen erkennen. Die Signale für die glatte Muskulatur lassen, trotz der etwas schwächeren Beladung der Spuren 8-21, auf die Spezifität der Sonde schließen, welche die Isoform (ACTN1) der glatten Muskulatur detektieren soll. Außerdem lagen keine Kreuzhybridisierungen vor.

Deutlich zu erkennen ist eine Zweispaltung des Signals, was auf die hohe Homologie zwischen den Isoformen hinweist. Da diese bei über 80% liegt, können die einzelnen Isoformen wahrscheinlich durch cDNA-Sonden nur bedingt getrennt detektiert werden. Dennoch kann die Spezifität der Sonden anhand der aufgezeigten Signale deutlich gemacht werden. Darüber hinaus könnte auch ein differenzielles Spleißen einer Isoform vorliegen, die dann zu einem derart aufgetrennten Signal führt.

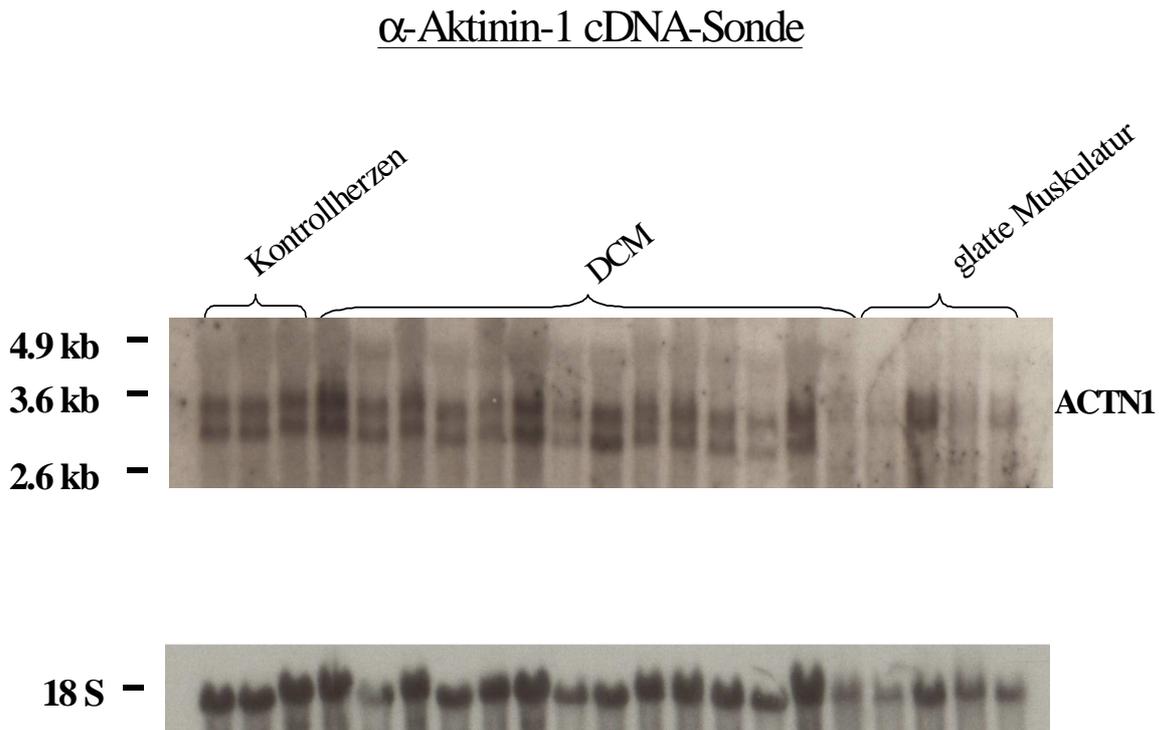


Abb. 11.: Expression von α -Aktinin-1 mRNA in humanem Myokard nach Northern-Blot-Hybridisierungen. Totale RNA aus humanem linksventrikulärem Myokard wurde zur Northern-Blot-Hybridisierung eingesetzt und anschließend 15h exponiert. Zur Anwendung kam eine α -Aktinin-1 cDNA-Sonde. Die Größenangabe der Transkripte erfolgte in Kilobasenpaaren, und die konstante Auftragung der RNA-Proben wurde durch Hybridisierung mit einem 18S Oligonukleotid beurteilt.

Auch bei etwas schwächerer Beladung der Kontrollgewebe (glatte Muskulatur) lässt sich das eindeutige Signal als sondenspezifisch erkennen. Signifikante Unterschiede der Signalintensität des gesunden als auch des erkrankten Myokards lassen sich nicht erkennen.

3.1.2.2 α -Aktinin-2 cDNA-Sonde

Bei dieser cDNA-Sonde handelt es sich um die sarkomerische Isoform von α -Aktinin. Auch hier lag die Expositionsdauer bei 15h.

Bei genauer Betrachtung lässt sich ein nahezu identisches, ebenfalls zweigespaltenes Signal auf der Höhe von 3.5kb beobachten, wie es zuvor bei der α -Aktinin-1 cDNA-Sonde zu erkennen war.

Ebenso wie bei der α -Aktinin-1 cDNA-Sonde ist kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen zu erkennen. Deutlich ist hier aber die Isoformen-spezifische Anlagerung an die mRNA der Herzgewebe. Die Sonde zeigt keine Signale in den Kontrollen der glatten Muskulatur.

3.1.2.3 α -Aktinin-3 cDNA-Sonde

Auch nach mehrmaligen Versuchen der Hybridisierung mit der α -Aktinin-3 cDNA-Sonde konnte kein Signal detektiert werden. Selbst nach mehrtägiger Exposition und zurückhaltenden Waschungen unter nicht stringenten Bedingungen, sowie erneuter Präparation und Versuchen anderer Arbeitsgruppen mit dieser Sonde gelang keine erfolgreiche Hybridisierung.

3.1.2.4 α -Aktinin-4 cDNA-Sonde

Diese Sonde, spezifisch für nicht muskuläres α -Aktinin (ACTN4), zeigt nur sehr schwache Signale, welche sehr unregelmäßig sind. Wegen dieser nicht eindeutigen und nicht differenziellen Aussagekraft nach einer Exposition von 15h, wurde der Röntgenfilm, länger als sonst üblich, 48h exponiert, was jedoch die Intensität der Banden nicht verbesserte.

Wie bei den beiden vorherigen Sonden liegt das Signal auf der Höhe von ca. 3,5kb. Doch lässt sich hier, wenn auch nur sehr schwach, eine Teilung des zuvor einbandigen Signals beobachten.

Eine Ausnahme bilden hier die Spuren der glatten Muskulatur mit einem deutlich begrenzten Signal. Diesem Phänomen liegt ebenfalls die hohe Homologie der einzelnen Isoformen zu Grunde, insbesondere der hohen Homologie zu α -Aktinin-1.

Jedoch muss man auch hier von einer gewissen Spezifität sprechen, da insgesamt kein eindeutiges Signal zu detektieren war, obwohl gerade bei α -Aktinin-4 wie auch bei α -Aktinin-1 drei weitere Isoformen hätten detektiert werden können. (siehe Tabelle 2 , S. 7)

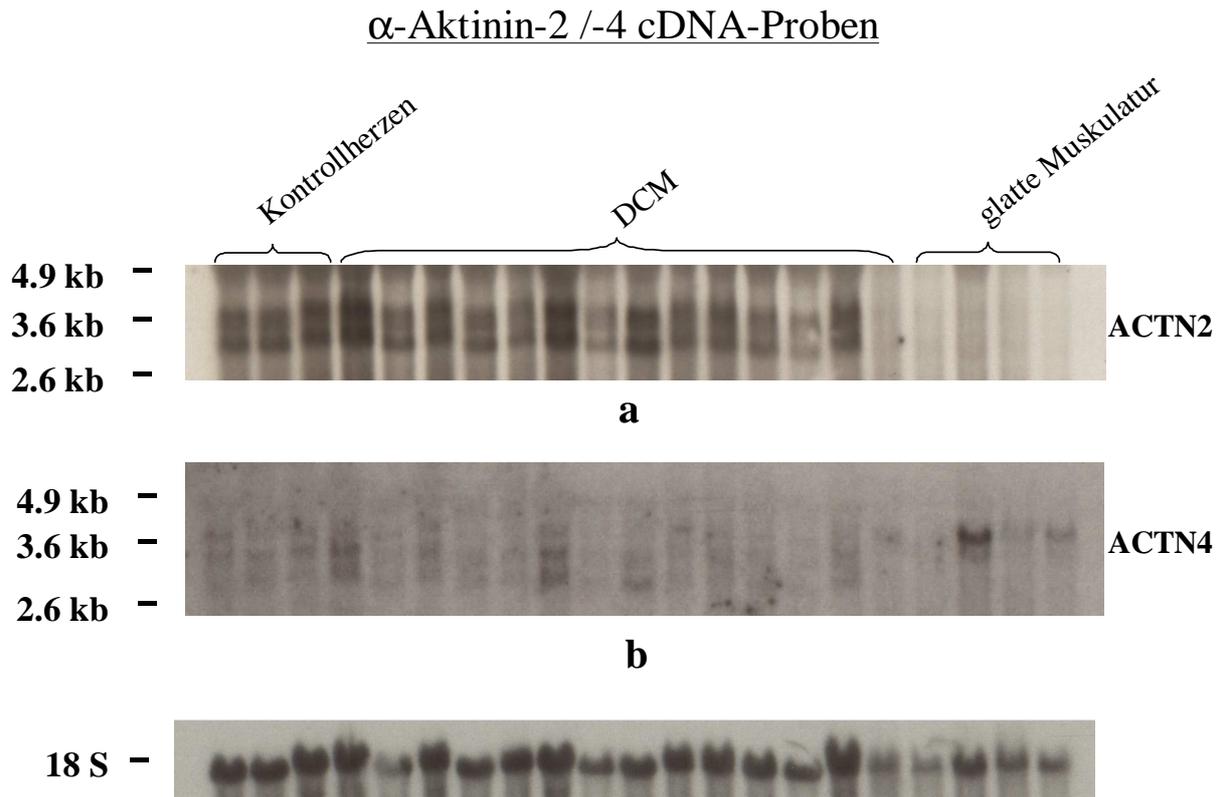


Abb. 12a.: Expression von α -Aktinin-2 mRNA in humanem Myokard nach Northern-Blot-Hybridisierungen.

Totale RNA aus humanem linksventrikulärem Myokard wurde zur Northern-Blot-Hybridisierung eingesetzt und anschließend 15h exponiert. Zur Anwendung kam in diesem Fall eine α -Aktinin-2 cDNA-Sonde.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Myokardgeweben ist nicht erkennbar. Von Bedeutung sind jedoch hier die signalfreien Spuren der glatten Muskulatur, welche die Spezifität der Sonde unterstreichen.

Abb. 12b.: Expression von α -Aktinin-4 mRNA in humanem Myokard nach Northern-Blot-Hybridisierungen.

Zum Einsatz kam hier die α -Aktinin-4 cDNA-Sonde, welche vereinzelt ein schwaches dreigeteiltes Signal aufweist, aber keine Aussage hinsichtlich einer Signifikanz zwischen den Geweben zulässt. In diesem Fall zeigt aber die Signalschwäche eine gewisse Spezifität der Sonde, da mit Ausnahme der glatten Muskulatur, kein Gewebe eine klare Bande aufweist, was der hohen Homologie zu α -Aktinin-1 entspricht.

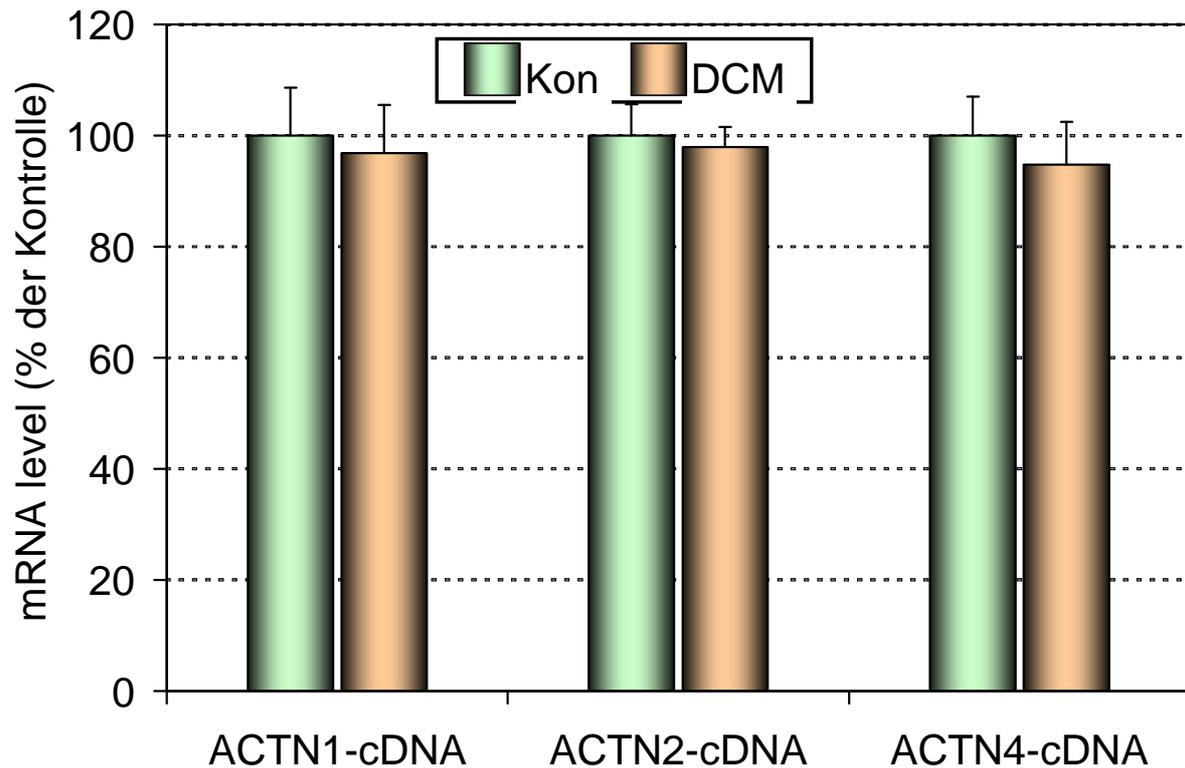


Abb. 13: Die quantitative Analyse der Expression von α -Aktinin-Isoformen im Northern-Blot mittels cDNA-Sonden zeigt keinen signifikanten Unterschied in der Signalstärke der erwarteten 3,5 kb Bande. Die auf S. 40 erwähnte Membran wurde je dreimal mit der gleichen Sonde hybridisiert, um Anwendungsfehler auszuschließen. Die Resultate sind als Mittelwerte \pm SD angegeben.

3.2 Northern-Blot-Analyse mit Oligonukleotiden

Da mit den Ergebnissen der cDNA-Sonden-Hybridisierung, aufgrund der hohen Homologie der einzelnen cDNA-Proben, keine Aussagen über die differentielle Expression der α -Aktinin-Isoformen zu treffen waren, wurden nun spezifische Antisense-Oligonukleotide aus den für die Isoformen eigenen mRNAs ausgesucht und als Sonden verwandt. Jedes Oligonukleotid wurde aus der kodierenden Region der jeweiligen bekannten mRNA entnommen.

In Verbindung mit der Verwendung von RNA Sequenzen für die Entwicklung von Oligonukleotidsonden tauchten in diesem Fall mehrere Probleme auf. Die Oligonukleotidsonde musste sehr spezifisch für die einzelnen Aktinin-Isoformen sein. Außerdem sollte die Minimallänge der Oligonukleotide bei mindestens 20 Basenpaaren liegen. Wegen der hohen Homologie der mRNAs war die Auswahl der Bereiche, in denen spezifische Sequenzen von mehr als 20 Basenpaaren zu finden waren, sehr begrenzt. Trotz allem konnten einige für die Isoformen spezifische Oligonukleotide gefunden werden, die alle aus dem kodierenden Bereich stammten.

Auch bei den Oligonukleotiden wurde auf hohe Stringenz geachtet, um unspezifische Banden zu vermeiden.

Die Spezifität der Oligonukleotide wurde in bestimmten Zeitabständen durch das Programm BLAST SEARCH mit den vorhandenen Gen-Bibliotheken verglichen, wobei die Ergebnisse immer eine 100%ige Übereinstimmung mit den jeweiligen Isoformen ergab.

Die Negativkontrollen durch die Sense-Oligonukleotide der entsprechenden Isoformen ergaben alle das erwartete Ergebnis ohne Anzeichen einer Bande und wurde hier nicht abgebildet.

3.2.1 Hybridisierung mit α -Aktinin-1-Antisense-Oligonukleotiden

In diesem Fall standen uns für die α -Aktinin-1 Isoform (nicht sarkomerisch) drei Antisense-Oligonukleotide zur Verfügung („antiA1/-A2/-A3“), welche aus verschiedenen Bereichen der mRNA und jeweils aus der kodierenden Region stammten. A1, A2 und A3 bezeichnen hier die Sense-Oligonukleotide der selben mRNA. Abb. 14 zeigt die Position der Oligonukleotide auf der mRNA.

Wie im Fall der cDNA-Sonden, lag auch hier die Expositiondauer des Röntgenfilms bei 15h.

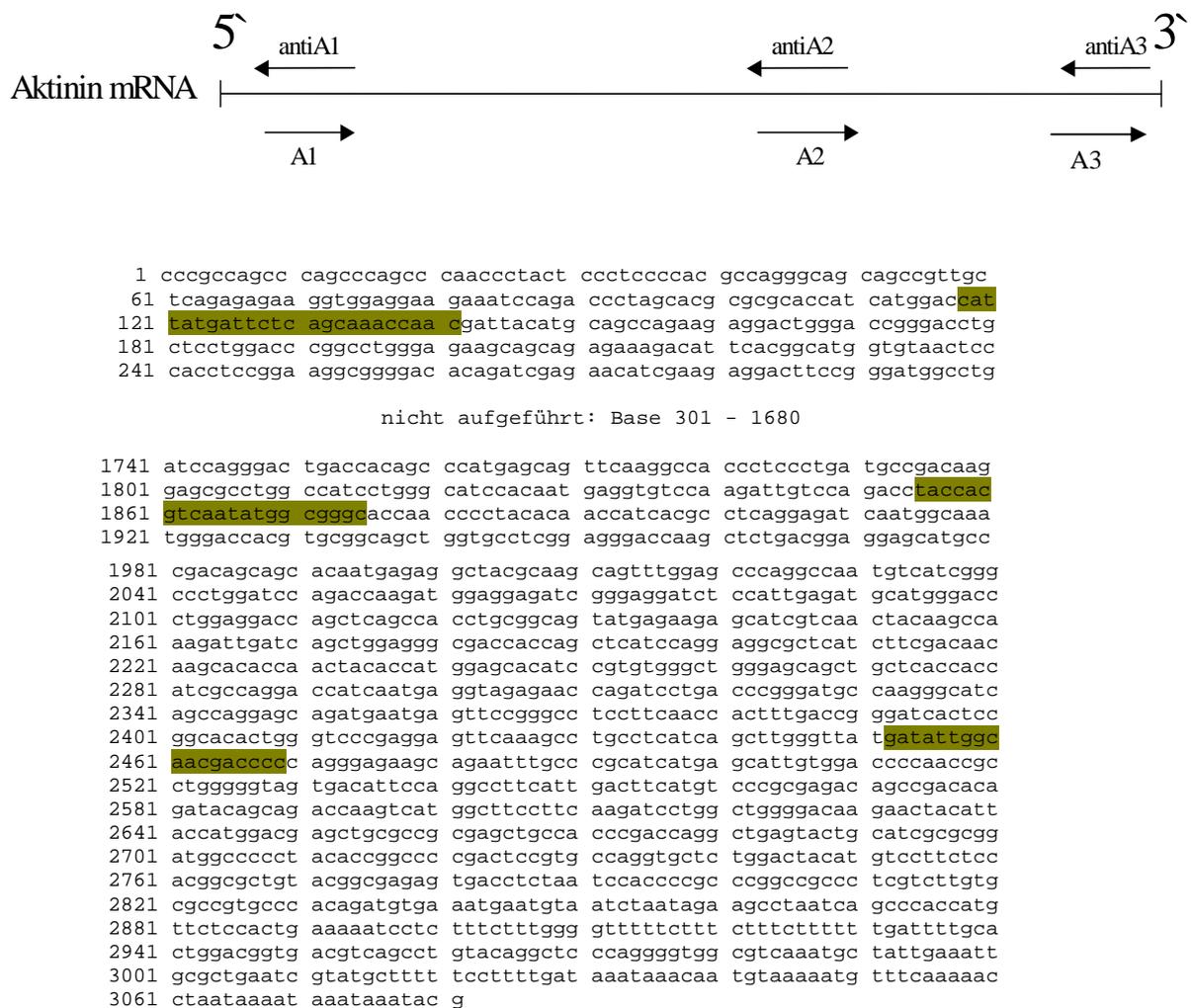


Abb. 14: Position der drei α -Aktinin-1 Oligonukleotide innerhalb der mRNA von α -Aktinin-1. Es sind hauptsächlich die signifikanten Bereiche der mRNA, sowie deren 5`und 3`-Ende dargestellt. Die nicht kodierenden Basenpaare 301-1680 wurden aus der Darstellung entfernt.

Sonde „antiA1“ (α -Aktinin-1; nicht sarkomerisch)

Wie schon zuvor beschrieben, war aus der Literatur die Größe der mRNA bekannt, und so wurde das Signal wiederum auf der Höhe von 3,5kb erwartet. Die erste, in der folgenden Abbildung gezeigte Sonde (antiA1) stammt aus dem Anfangsbereich der kodierenden Sequenz der mRNA.

Wie auf der Abb. 15 a zu sehen ist, wird dieses Signal auch auf der entsprechenden Höhe detektiert, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen Kontrollherzen und Patienten. Die Spezifität des Oligonukleotids zeigt sich durch die Banden in den Kontrollen der glatten Muskulatur auch wenn diese etwas schwächer ausgeprägt sind.

Darüber hinaus ist jedoch auch ein spezifisches, vorher nicht erwartetes Signal von 1,9kb zu erkennen, was von demselben Oligonukleotid detektiert wurde, nachdem die Membran mit niedrig stringenten Bedingungen gewaschen wurde.

Die Waschttemperatur lag hier 15°C unterhalb der Schmelztemperatur des Oligonukleotids bei 42°C und wurde zu Beginn mit Waschlösung I (siehe Material und Methoden) behandelt, welche einen etwas höheren Salzgehalt aufwies.

Aus diesem Grund wurde im Folgenden die Membran, nach erneuter Hybridisierung, stringenten Waschkonditionen unterzogen, wobei die Waschttemperatur nun sogar kurzzeitig 2°C über der Schmelztemperatur des Oligonukleotids bei 59°C lag und eine Waschlösung mit sehr niedrigem Salzgehalt verwandt wurde.

Abb. 15 b zeigt die Membran nach der stringenten Waschprozedur. Als sehr spezifisch und deutlich detektierbar ist die Bande auf Höhe von 1,9kb zu erkennen, wobei die Signale in den glatten Muskulatur-Kontrollen nicht mehr sichtbar waren.

Oligonukleotid „antiA1“ (ACTN 1)

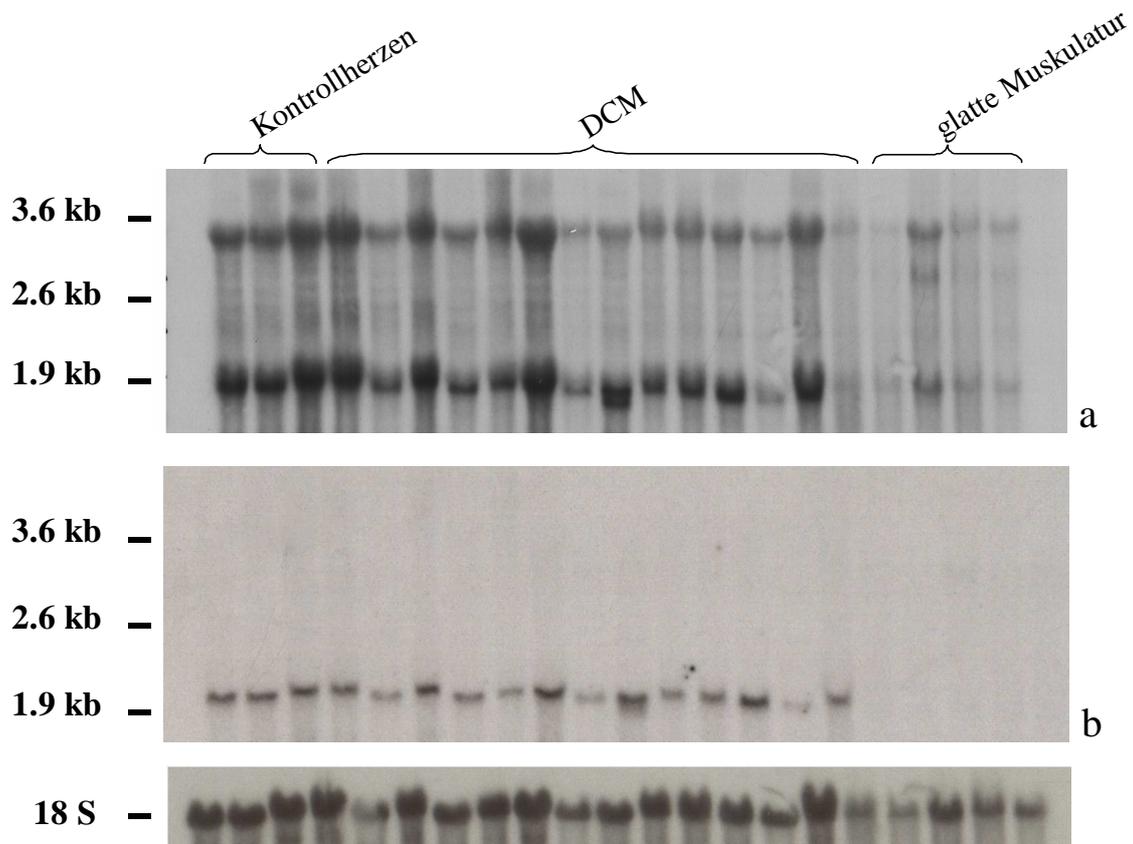


Abb. 15: Expression von α -Aktinin- mRNA in humanem Myokard nach Northern-Blot-Hybridisierungen.

Totale RNA aus humanem linksventrikulärem Myokard wurde zur Northern-Blot-Hybridisierung eingesetzt und anschließend 15h exponiert. Zur Anwendung kam ein α -Aktinin-1 „antisense“-Oligonukleotid aus dem Anfangsbereich der kodierenden Region der mRNA.

Abb.a zeigt die Membran nach leicht-stringenten Waschbedingungen.

Abb.b zeigt dieselbe Membran nach einer hoch stringenten Waschprozedur.

Die Größenangabe der Transkripte erfolgte in Kilobasenpaaren, und die konstante Auftragung der RNA-Proben wurde durch Hybridisierung mit einem 18S Oligonukleotid beurteilt.

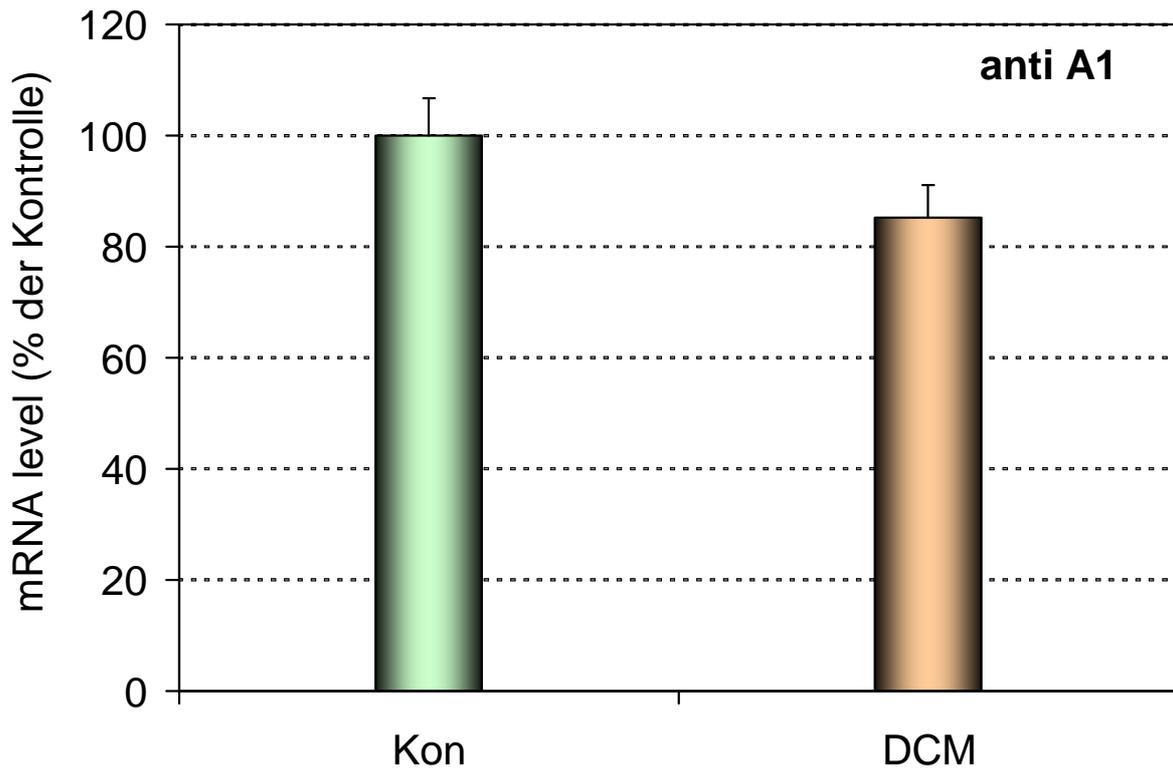


Abb. 16: Die quantitative Analyse der Expression von α -Aktinin-Isoformen im Northern-Blot, mittels eines „antisense“-Oligonukleotids („antiA1“) der mRNA, zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollherzen und Patienten in der Signalstärke der erwarteten 3,5 kb Bande. Das gleiche Ergebnis stellte sich bei Quantifizierung des 1,9 kb großen Signals dar. Die Resultate sind als Mittelwerte \pm SD angegeben.

Sonde „antiA2“ (α -Aktinin-1; nicht sarkomerisch)

Auch bei diesem Oligonukleotid, welches aus der Mitte der kodierenden mRNA stammt (siehe Abb. 14), wurde die Membran nach demselben Verfahren gewaschen.

Die Waschttemperatur lag beim ersten Waschgang bei 49°C, also wieder 15°C unterhalb der Schmelztemperatur. Im Gegensatz zu der Sonde „antiA1“ war das erwartete Signal von 3,5 kb schon nach dem ersten Waschgang nicht mehr zu sehen, das 1,9 kb Signal aber wieder deutlich zu detektieren.

Ebenso wie im ersten Fall wurde die Membran nach erneuter Hybridisierung stringenten Waschkonditionen mit einer Temperatur von 65°C unterzogen, also 1°C über der Schmelztemperatur.

Die erwartete 3,5 kb Bande war, selbst nach einer Expositionsdauer von ca. 20 Stunden, nicht mehr aufzufinden. Dagegen war die 1,9 kb Bande in sehr signifikantem Maße sichtbar. Ein Unterschied zwischen Patienten und Kontrollherzen war jedoch nicht zu erkennen.

Die Signale auf den Kontrollspuren der glatten Muskulatur beweisen die Spezifität des Oligonukleotids.

Sonde „antiA3“ (α -Aktinin-1; nicht sarkomerisch)

Das dritte Oligonukleotid, ebenso spezifisch für α -Aktinin-1, ist am Ende des kodierenden Bereiches der mRNA positioniert. (siehe Abb. 14) Alle Vorgehensweisen in Bezug auf die Waschkonditionen entsprachen denen der ersten Sonde (antiA1), da die Schmelztemperatur nahezu identisch war.

In diesem Fall war das eigentlich erwartete Signal schon nach dem ersten Waschgang kaum noch nachweisbar. Das 1,9 kb große Signal aber konnte auch wieder nach stringenten Konditionen eindeutig und sehr spezifisch detektiert werden.

Auch mit dem letzten Oligonukleotid waren keine Unterschiede der Genexpression in Patienten und Kontrollen aufzufinden.

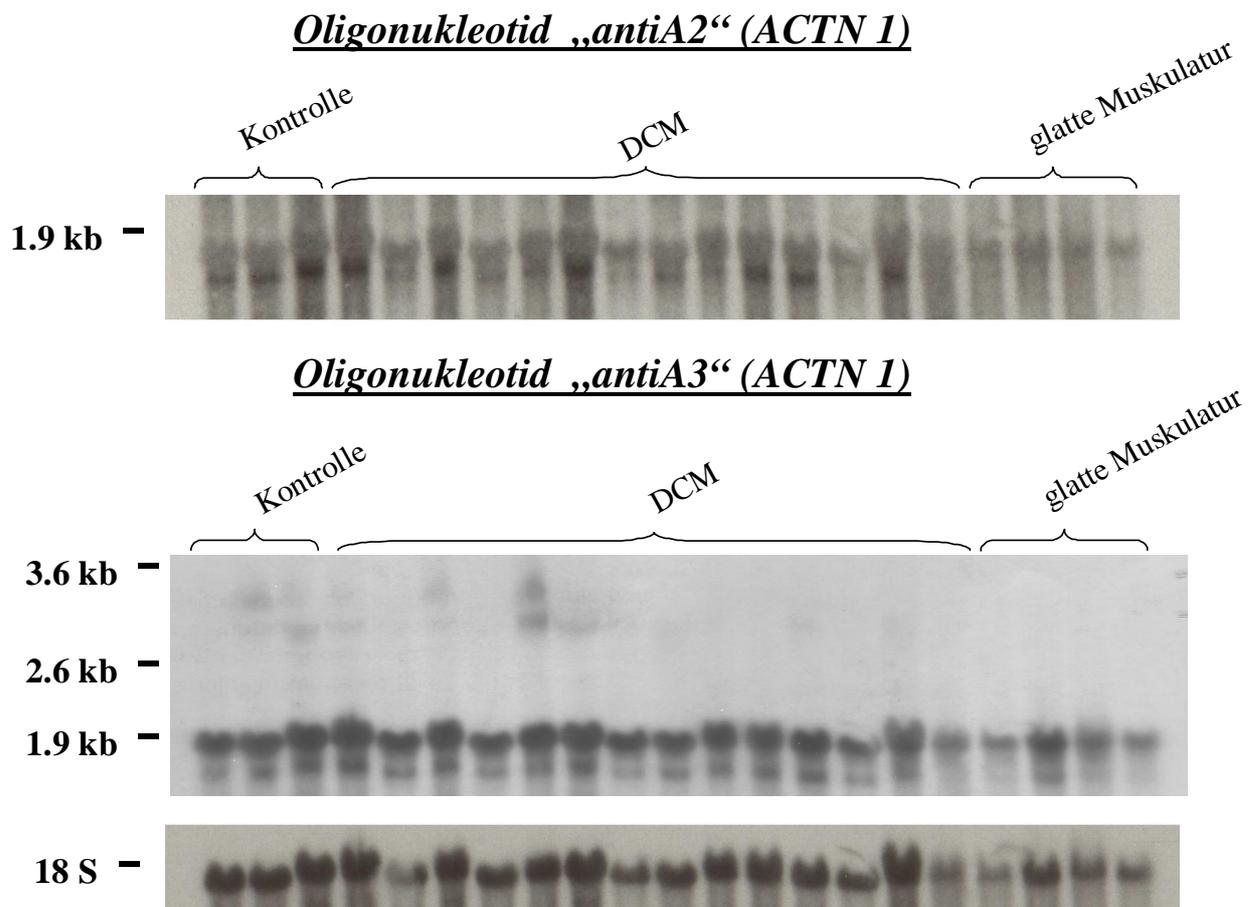


Abb. 17: Expression von α -Aktinin-1 mRNA in humanem Myokard nach Northern-Blot-Hybridisierungen

Totale RNA aus humanem linksventrikulärem Myokard wurde zur Northern-Blot-Hybridisierung eingesetzt und anschließend 15h exponiert. Zur Anwendung kam ein α -Aktinin-1 „antisense“-Oligonukleotid aus dem Mittel (antiA2) - und Endbereich (antiA3) der kodierenden Region der mRNA. Die Größenangabe der Transkripte erfolgte in Kilobasenpaaren und die konstante Auftragung der RNA-Proben wurde durch Hybridisierung mit einem 18S Oligonukleotid beurteilt.

Die erwarteten 3,5 kb großen Signale konnten im ersten Fall nicht mehr detektiert werden. Bei der Sonde „antiA3“ zeigt sich jedoch andeutungsweise ein unscharfes Signal in Höhe von 3,5 kb. Deutlich sichtbar sind aber die unerwartet detektierbaren 1,9 kb großen Signale.

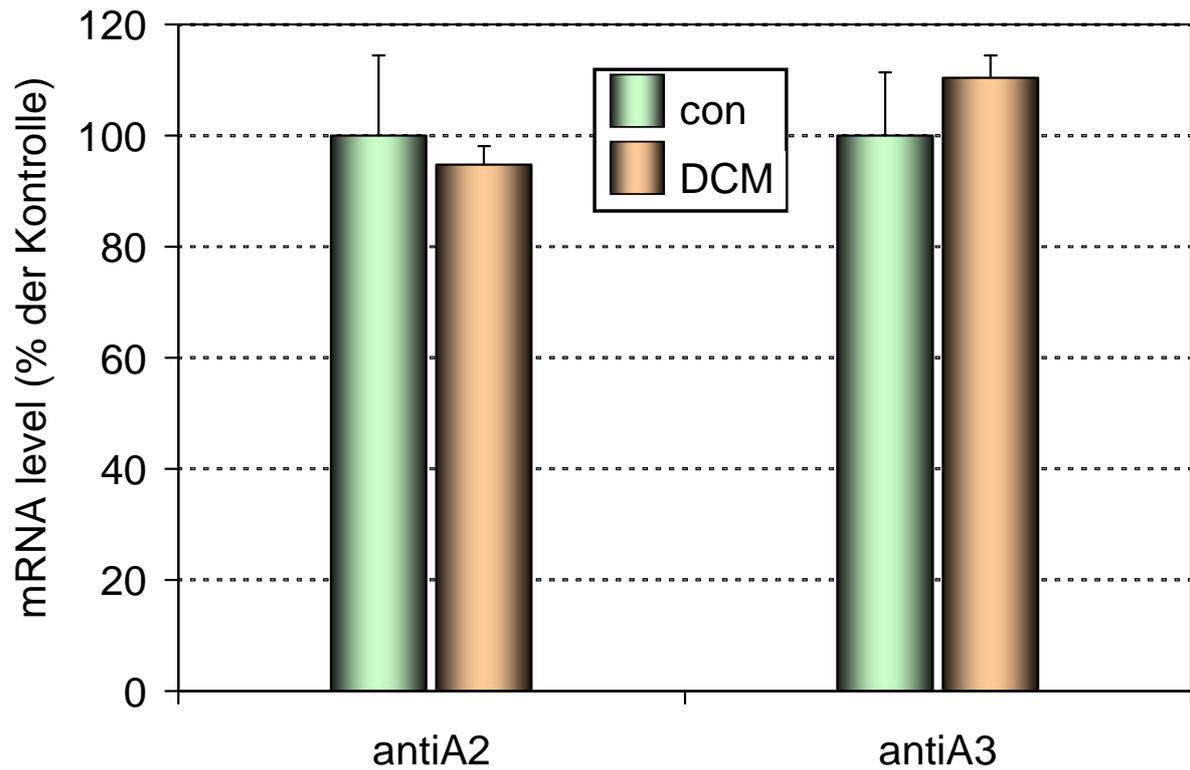


Abb. 18: Die quantitative Analyse der Expression von α -Aktinin-Isoformen im Northern-Blot, mittels „antisense“-Oligonukleotiden (antiA2 und antiA3) der mRNA, zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollherzen und Patienten in der Signalstärke der erwarteten 3,5 kb, als auch der unerwarteten 1,9 kb Bande. Gezeigt wird hier die quantitative Analyse des 3,5 kb großen Signals. Die Resultate sind als Mittelwerte \pm SD angegeben.

3.2.2 Hybridisierung mit α -Aktinin-2-Antisense-Oligonukleotide „antiB1“

Für die Hybridisierung mit sarkomerischen α -Aktinin-2 Oligonukleotiden waren die Auswahlmöglichkeiten zur Verwendung verschiedener Sonden aus unterschiedlichen Teilbereichen sehr beschränkt. Da eine sehr große Homologie zu der α -Aktinin-3 Sequenz vorliegt, konnten wir nur eine spezifische Sonde aus dem kodierenden Bereich der mRNA entnehmen und gewährleisten, dass diese in der Lage war, nur diese eine Isoform zu detektieren. Nur ein Oligonukleotid war innerhalb der mRNA spezifisch genug.

Die Expositionsdauer betrug wie in den Fällen zuvor ca. 15 Stunden.

In diesem Fall wurde das erwartete Signal von 3,5 kb deutlich detektiert, jedoch ohne einen signifikanten Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen aufzuzeigen. Auffällig ist, dass auch bei einem Oligonukleotid die Zweiteilung des Signals auftrat, was schon bei der cDNA-Hybridisierung sichtbar wurde.

Bei den glatten Muskulatur-Kontrollen war kein Signal zu detektieren, was für die Spezifität des Oligonukleotids spricht.

Auch bei dieser Dehybridisierung wurde mit stringenten Waschkonditionen bis zur Schmelztemperatur des Oligonukleotids gearbeitet, um unspezifische Banden zu vermeiden.

```

1 ggaactccgc ttcgcccag acccagcgc cagcgtgtc gcccgagagg agcccgcgca
61 aggtcacccc gcgcccgcg cccgcccgc gccgcctccg tgggtccggt tgccagtcag

nicht aufgeführt: Base 121 - 1560

1561 ccatacgcgca ggagctcaat gaactggact atcacgacgc tgtgaatgtc aatgatcggg
1621 gccagaaaat ttgtgaccag tgggaccgac tgggaacgct tactcagaag aggagagaag
1681 ccctagagag aatggagaaa ttgctagaaa ccattgatca gcttcacctg gagtttgcca
1741 agagggctgc tcctttcaac aattggatgg agggcctat ggaggatctg caagatatgt
1801 tcattgtcca cagcattgag gagatccaga gtctgatcac tgcgcatgag cagttcaagg
1861 ccacgctgcc cgagggcgac ggagagcggc agtccatcat ggccatccag aacgaggtgg
1921 agaaggtgat tcagagctac aacatcagaa tcagctcaag caaccctgac agcactgtca
1981 ccatggatga gctccggacc aagtgggaca aggtgaagca actcgtgccc atccgcatc
2041 aatccctgca ggaggagctg gctcgcacg atgctaacga gcgtctgagg cgcagtttg
2101 ctgcccgaag caatgccatt gggccctgga tccagaacaa gatggaggag attgcccgga
2161 gctccatcca gatcacagga gccttggag accagatgaa ccagctgag cagtatgagc
2221 acaacatcat caactataag aacaacatcg acaagctgga gggagacat cagctcatcc
2281 aggagggcct tgtctttgac aacaagcaca cgaactacac gatggagcac attcgtgttg
2341 gatgggagct gctgctgaca accatcgcca gaacatcaa tgaggtggag actcagatcc

```

Abb. 19: Position des Oligonukleotids „antiB1“ innerhalb der mRNA von α -Aktinin-2. Auch hier sind hauptsächlich die signifikanten Bereiche der mRNA, sowie deren 5`und 3`-Ende dargestellt. Die nicht kodierenden Basenpaare 121-1560, sowie die restlichen Basen bis 4181 wurden aus der Darstellung entfernt.

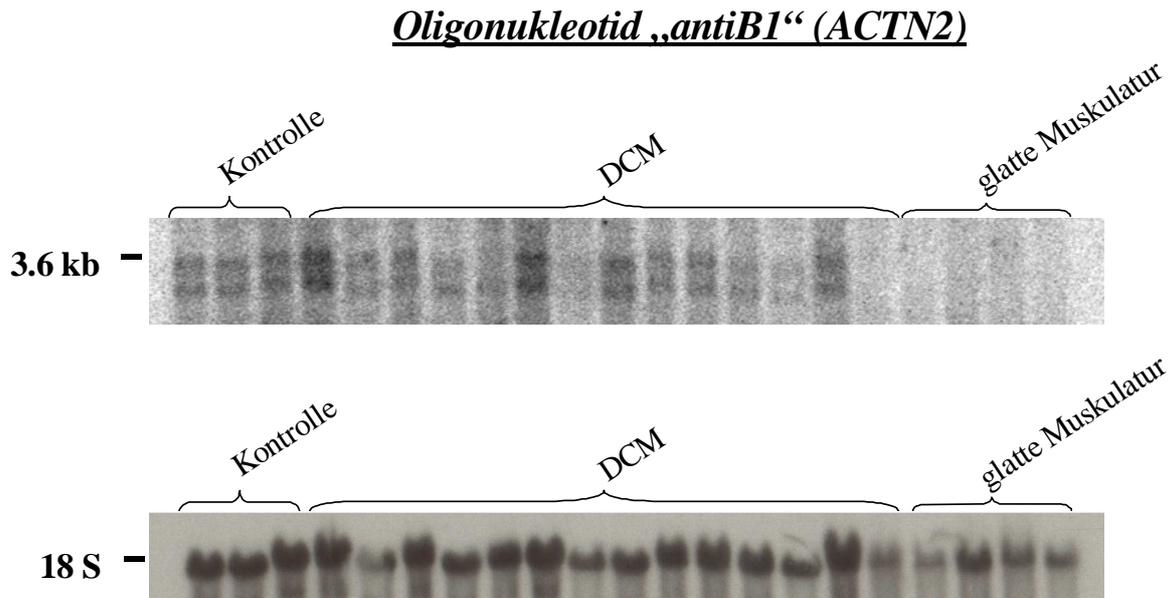


Abb. 20: Expression von α -Aktinin-2 mRNA in humanem Myokard nach Northern-Blot-Hybridisierungen

Totale RNA aus humanem linksventrikulärem Myokard wurde zur Northern-Blot-Hybridisierung eingesetzt und anschließend 15 h exponiert. Zur Anwendung kam ein α -Aktinin-2 „antisense“-Oligonukleotid aus dem Anfangsbereich der kodierenden Region der mRNA.

Die Größenangabe der Transkripte erfolgte in Kilobasenpaaren und die konstante Auftragung der RNA-Proben wurde durch Hybridisierung mit einem 18S Oligonukleotid beurteilt.

Wie auch bei der α -Aktinin-2 cDNA-Probe, zeigt sich beim Oligonukleotid ein geteiltes Signal ohne Signifikanzunterschiede zwischen den zu vergleichenden Geweben. Erkennbar ist aber die Spezifität aufgrund der fehlenden Signale der glatten Muskulatur.

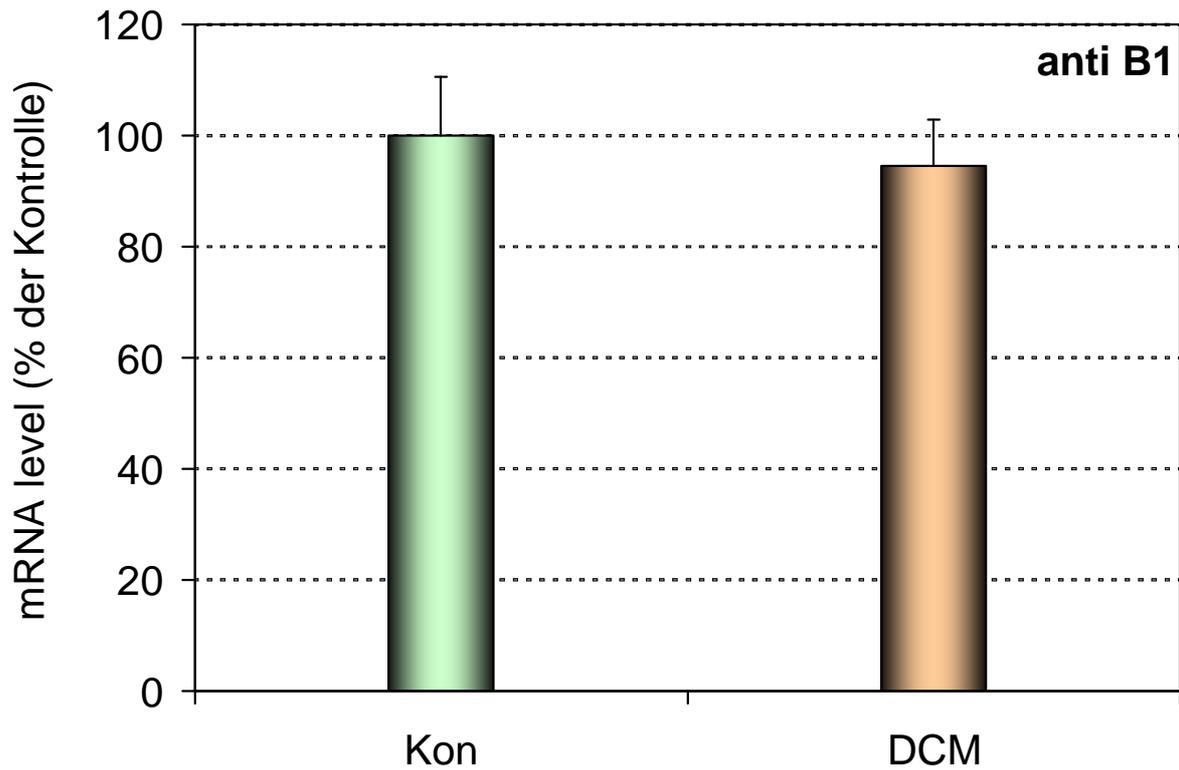


Abb. 21: Die quantitative Analyse bei der Expression von α -Aktinin-Isoformen im Northern-Blot, mittels einem „antisense“-Oligonukleotid (antiB1) der mRNA, zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollherzen und Patienten in der Signalstärke der erwarteten 3,5 kb Bande. Die Resultate sind als Mittelwerte \pm SD angegeben.

3.2.3 Hybridisierung mit α -Aktinin-3 und -4-Antisense-Oligonukleotiden „antiC1/ antiD1“

Auf dieselbe, bei den vorherigen Oligonukleotiden beschriebene Weise wurden auch für diese Isoformen spezifische Oligonukleotide aus den kodierenden Bereichen der mRNA entnommen. Auch hier war die Auswahl durch die hohe Homologie auf jeweils ein Oligonukleotid beschränkt. Mit diesen Sonden konnten jedoch in beiden Fällen nach mehrmaliger Hybridisierung und unterschiedlichen Waschkonditionen, keine Signale verifiziert werden.

```

1 gccaggagacc cgatcgagat gatgatgggt atgcagcccg agggctctggg ggccgggggag
61 gggcgctttg cgggcgccgg cgggggcccg gagtacatgg aacaggagga ggactggggac
121 cgcgacctgc tgctggacc ggctggggag aagcagcagc ggaaaacctt cactgcctgg
181 tgcactcac acctgcgcaa ggcaggcacc cagatcgaga acatcgagga agatttccgc
241 aatggcctca aactcatgct gctcctggag gtcatttcag gtgagaggct gcctaggcca
301 gataaaggca agatgcgctt ccacaaaatc gccaacgtta acaaggccct ggacttcatt

nicht aufgeführt: Base 361 - 2340

2341 aagcggaatg ggatgatgga gctgatgac ttccgagctt gcctcatctc catgggctat
2401 gacctggggg aagtggagt tgctcgcac atgaccatgg tggaccccaa cgcagctggg
2461 gtggtgacct tccaggcctt catagacttc atgaccggag agacagccga gactgacacg
2521 actgagcaag ttgtagcttc cttcaagatc ttggcaggag acaagaacta catcaccccc
2581 gaggagctgc ggcgcgagct cctgccaag caggccgag actgcatccg ccgtatgggt
2641 cctacaagg gatccggggc cccggctgga gccctggact acgtggcctt ctccagtgc
2701 ctctatggg agagcgacct ttgaccccaa ccactgaggt tctctatgca agatggagag
2761 aggatgcacc ctgtggctga tcccatcct ccctcggagc aagggcctaa gagaaaagcc
2821 agccaagtgc ttctgaataa agatcctct ctgggtcaca gccatatcca tgccatcctc
2881 atcccatcag aatgcaataa aagcgggaag

```

Abb. 22: Position des Oligonukleotids „antiC1“ innerhalb der mRNA von α -Aktinin-3. Dargestellt sind hauptsächlich die signifikanten Bereiche der mRNA, sowie deren 5`und 3`-Ende. Die nicht kodierenden Basenpaare 361-2340 wurden aus der Darstellung entfernt.

```

901 ctgaaactgc cgccaaccgg atctgtaagg tgctggctgt caaccaagag aactgcagca
961 cctcgatgga ggactacgag aagctggcca gcgacctcct ggagtggatc cggcgacca
1021 tcccctggct ggaggaccgt gtgcccctaa agactatcca ggagatgcag cagaagctgg
1081 aggacttccg cgactaccgg cgtgtgcaca agccgcccga ggtgcaggag aagtgccagc
1141 tggagatcaa cttcaacagc gtgcagacca agctgcgcct cagcaaccgg cccgccttca
1201 tgccctccga gggcaagatg gtctcggaca tcaacaatgg ctggcagcac ttggagcagg
1261 ctgagaagg ctacgaggag tggctgctga atgagattcg caggctggag cggctcgacc
1321 acctggcaga gaagttccgg cagaaagcct ccatccacga ggocctggact gacgggaagg
1381 aagccatgct gaagcaccgg gactacgaga cggccacact atcggacatc aaagccctca
1441 ttcgcaagca cgaggccttc gagagcgacc tggctgcgca ccaggaccgc gtggagcaga
1501 tcgcccctc cgcccaggag ctcaacgagc tggattacta cgactcccac aatgtcaaca
1561 cccggtgcc gaagatctgt gaccagtggg acgcccctcg ctctctgaca catagtgcga
1621 gggaaagcct ggagaaaaca gagaagcagc tggaggccat catcgaccag ctgcaacctg
1681 aatacgccaa gcccgcgcc ccttcaaca actggatgga gagcgccatg gaggacctc
1741 aggacatggt catcgtccat accatcgagg agattgaggg cctgatctca gccatgacc

```

Abb. 23: Position des Oligonukleotids „antiD1“ innerhalb der mRNA von α -Aktinin-4. Die Abbildung zeigt nur den relevanten Abschnitt der Sequenz. Es fehlen die Basen 1-900, sowie die Basen 1801-3474.

3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)-Analyse

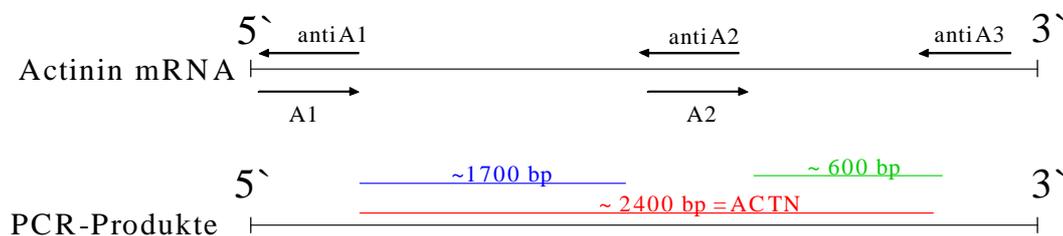
Um die spezifischen Eigenschaften der im Northern-Blot benutzten Oligonukleotide und, darüber hinaus, das Phänomen der 1,9 kb Bande zu analysieren, wurde eine PCR-Analyse vorgenommen.

Das Prinzip hierbei beruht auf einer enzymatischen Vermehrung eines DNA Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Voraussetzung für den Einsatz von PCR-Methoden ist also eine Information über die Nukleotidsequenzen beiderseits des DNA- oder RNA-Abschnitts und die Verfügbarkeit von geeigneten Oligonukleotiden⁴⁴.

In unserem Fall wurden für die PCR die aus der Northern-Blot Analyse bekannten α -Aktinin-1 spezifischen Oligonukleotide verwandt, da deren Lage innerhalb der RNA und auch die Nukleotidsequenz der restlichen Abschnitte der mRNA bekannt waren.

Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene Paare von Oligonukleotiden benutzt, bei denen folgende Produkte erwartet wurden: Ein 2,4 kb, ein 1,7 kb und ein 0,6 kb großes Fagment.

- 1) A1 - antiA2 ~ 1700 bp
- 2) A1 - antiA3 ~ 2400 bp
- 3) A2 - antiA3 ~ 600 bp



*Abb. 24: Benutzte α -Aktinin-1 Oligonukleotidpaare und deren erwartete Produkte
Für die Primär-Strang-cDNA-Synthese kam isolierte RNA sowohl von Patienten als auch von Kontrollherzen zur Anwendung.
Der genaue Ablauf wurde unter „Material und Methode“ beschrieben.*

Die folgende Abbildung zeigt das gelaufene Agarosegel mit den durch die PCR entstandenen Produkten. Anhand der mitgelaufenen Größenmarker ist die Größe der Produkte zu erkennen. Mit Ausnahme des 1,7 kb großen Signals waren sowohl bei den Patienten als auch bei den Kontrollherzen die Produkte der Größe 2,4 kb und 0,6 kb deutlich auffindbar. Trotz der hier nicht sichtbaren 1,7 kb-Signale konnte ein erfolgreicher Sequenzvergleich dieses Produktes erfolgen.

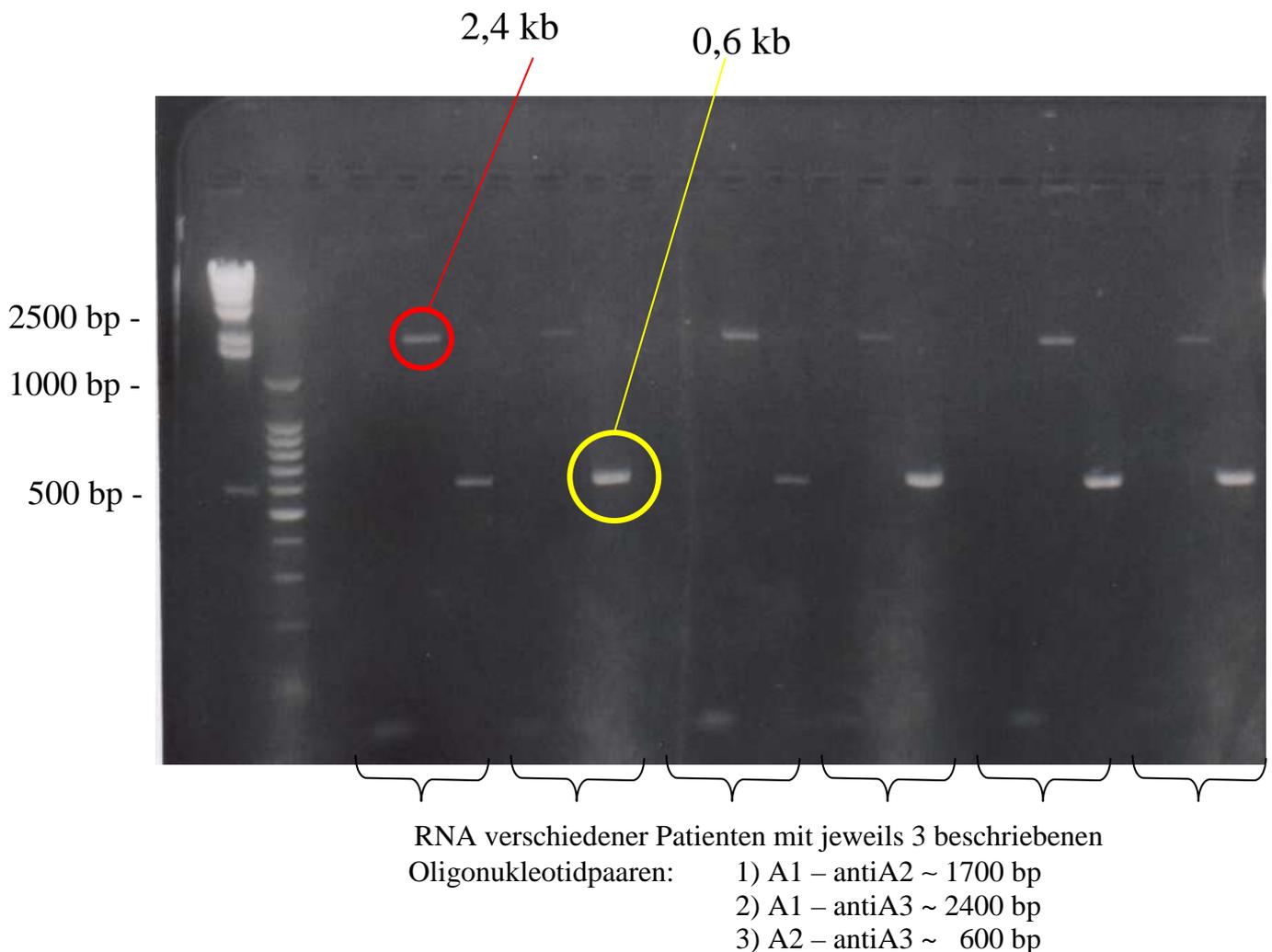


Abb. 25: Das gelaufene Agarosegel zeigt die mittels der Oligonukleotidpaare entstandenen PCR-Produkte, welche anhand der Größenmarker zugeordnet werden können. Das erwartete 1,7 kb große Signal konnte auch nach mehreren Versuchen nicht detektiert werden.

Die klonierten und sequenzierten PCR-Produkte der oben beschriebenen Paare wurden durch Sequenzanalysen mit einer öffentlichen Datenbank, vor allem aber mit der CELERA-Datenbank, wieder als α -Aktinin-1 beziehungsweise als Aktin-bindendes Protein identifiziert, was die Spezifität der Oligonukleotide ein weiteres Mal unterstreicht.

Die folgend Abbildungen zeigt ein Beispiel der Sequenzanalyse des oben genannten Oligonucleotidpaares (a)A1 – antiA3. Alle weiteren Sequenzanalysen und Identifikationsnummern der Datenbank wurden in der darauf folgenden Tabelle zusammengefasst.

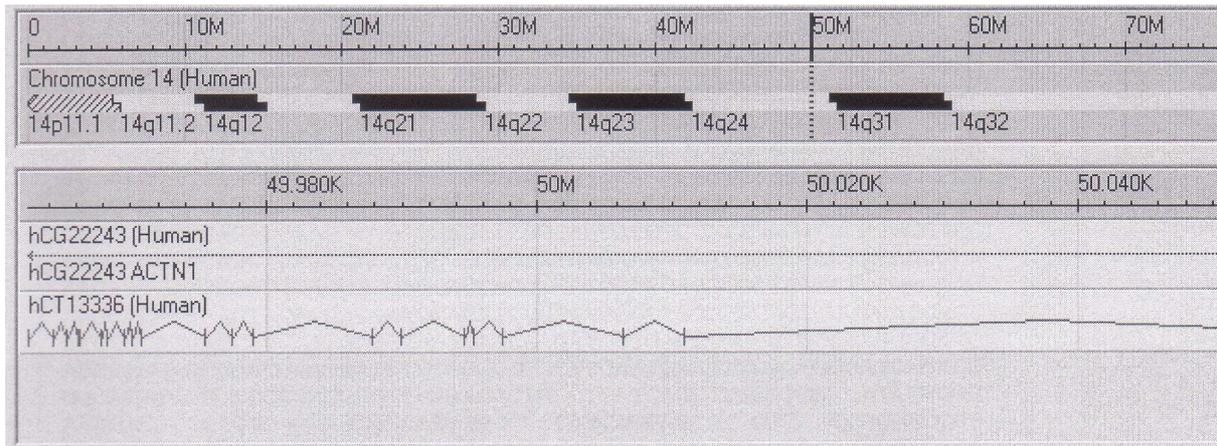


Abb. 26: Die Abbildung zeigt den Sequenzvergleich des klonierten und sequenzierten PCR-Produktes „A1-antiA3“ mit einer öffentlichen Datenbank, sowie der CELERA-Datenbank. Aufgeführt sind sowohl das zugehörige Chromosom, als auch die übereinstimmenden Nukleotide der verglichenen PCR-Produkte mit der mRNA des Proteins.

Oligonukleotidpaare	Identifikationsnummern der Datenbanken		
	Gen	Protein	mRNA
A1 – antiA2	hCG24617	hCP41740	hCT15735
A1 – antiA3	hCG22242	hCP39738	hCT13336
A2 – antiA3	hCG38994	hCP50024	hCT30241

Tab. 11: Die oben aufgeführte Tabelle zeigt die Identifikationsnummern, unter denen die identifizierten Proteine, hier α -Aktinin, und deren mRNA's, in der Datenbank aufgeführt werden. Diese Nummern beziehen sich auf die CELERA-Datenbank.

Da die „annealing-Temperatur“ wie üblich nur ca. 5°C unterhalb der Schmelztemperatur der Oligonukleotide lag und wir keinen Anhalt für das Phänomen der 1,9 kb-Bande erhielten, welche im Northern-Blot detektiert wurde, führten wir eine weitere PCR mit sehr niedrig stringenten Bedingungen durch.

Hierbei wurden die „annealing-Temperaturen“ bis auf 15°C unterhalb der Schmelztemperatur angesetzt, um die Anzahl der möglichen unspezifischen Banden zu erhöhen, unter denen womöglich auch die 1,9 kb-Bande zu finden gewesen wäre.

In Abb.27 sind die Banden in Reihenfolge der abnehmenden Temperatur wieder eindeutig zu erkennen. Wieder sind mit Ausnahme des 1,7 kb Produktes die zwei anderen erwarteten Produkte zu detektieren. Doch trotz der niedrig stringenten Bedingungen, selbst bei 15°C unterhalb der Schmelztemperatur, tauchten keine weiteren unspezifischen Banden auf. Normalerweise treten unter diesen Umständen selbst bei einigen spezifischen Analysen mehrfach nicht spezifische Banden auf, und dieses schon bei Unterschreitung der Schmelztemperatur von nur 5°C. Dies spricht für die hochspezifischen Eigenschaften der benutzten Oligonukleotide.

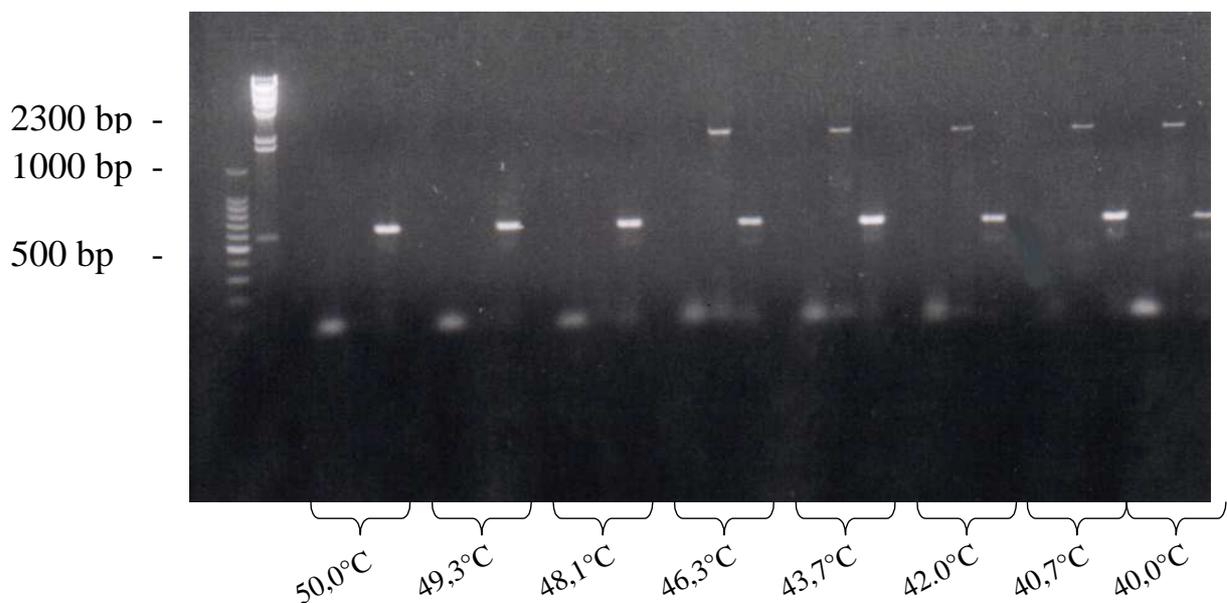


Abb. 27: Eine Serie von abnehmenden Temperaturen zur Unterschreitung der Schmelztemperatur der oben genannten Oligonukleotide während einer PCR zur Sicherstellung der Spezifität der benutzten Oligonukleotidpaare.

Es werden auch hier, wie bei Abb. 25, bei der jeweiligen Temperatur die drei bekannten Oligonukleotidpaare verwendet.

3.4 Analyse des Western-Blot

Da auf der mRNA-Ebene mit dem Northern-Blot keine signifikanten Unterschiede der Genexpression festzustellen waren, wurde im nächsten Schritt die differentielle Expression auf der Protein-Ebene untersucht.

Es wurden wegen der großen Anzahl der Patienten zwei verschiedene Membranen angefertigt. Auf einer Membran wurden jeweils 2 Kontrollherzen, 6 Patienten und zwei Kontrollen für glatte Muskulatur aufgetragen. Die glatten Muskulatur-Kontrollen fungierten, wie auch beim Northern-Blot für die Oligonukleotide, als Spezifitätsnachweis für die Antikörper. Zusätzlich wurde, um die genaue Größe des Proteins bestimmen zu können, neben einem Marker, ein rekombinantes Protein als letzte Spur aufgetragen, welches vom Hersteller als Isoformen-unspezifisches α -Aktinin mit einer Größe von 98 kDa beschrieben wurde (Sigma/A9776).

Bevor die Proteinextrakte auf das Gel aufgetragen wurden, ermittelten wir deren Konzentration mit einer farbabhängigen Konzentrationsmessung.

Im Folgenden wurde jedes Gel mit exakt 50 μ g Proteinextrakt beladen und die Gleichmäßigkeit der Beladung mit der „Ponceau-Färbung“ überprüft.

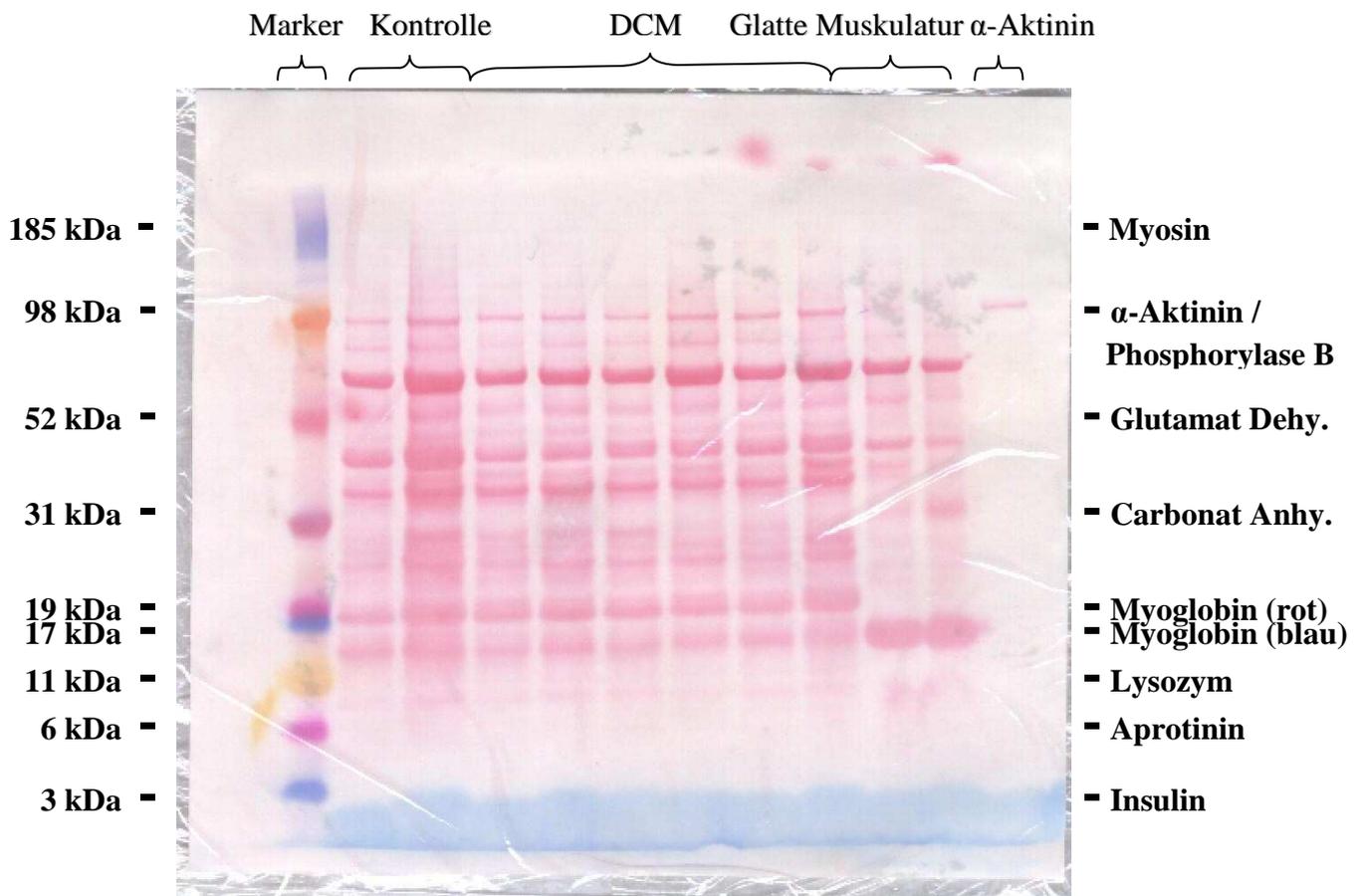


Abb. 28: Die mit dem Ponceau Farbstoff angefärbte Membran zeigt die gleichmäßige Beladung des Gels und diente der Markierung von Molekulargewichtsgrößen (kDa) für die später detektierten Signale. Benutzt wurde hier die Multi-Mark Standard-Färbung für NuPAGE MES-Gele.

Der hier in der Tabelle aufgeführte Ladeplan bezieht sich auf alle gezeigten Western-Blot Abbildungen:

Spur	Gewebe
1-2	Kontrolle gesunde Herzen
3-8	Patienten DCM (insgesamt 12 Patienten)
9-10	Kontrolle glatte Muskulatur
11	Rekombinantes Protein- α -Aktinin

Die Expositionsdauer der ECL-Filme auf der Membran wurde bei jedem Antikörper in drei verschiedenen Zeitabständen gewählt. Meist war ein Signal nach 2-3 Sekunden sichtbar. Um für die Auswertung ein stärkeres, deutlich abgrenzbareres Signal zu erhalten, wurde ein weiterer Film für 10 Sekunden aufgelegt. Zur Sicherstellung, dass auf den Spuren, auf denen nach kurzer Expositionsdauer kein Signal zu sehen war, auch bei extrem langer Aufliegezeit kein Signal mehr zu detektieren sein würde, wurde ein dritter Film für 2 min. aufgelegt. Zur Anwendung kamen die unter Material und Methoden beschriebenen kommerziellen Antikörper, die auch in der Immunhistochemie verwendet wurden. Auf jede Membran wurde zum Schluss ein GAPDH-Antikörper gegeben, dessen Signal als Referenz für die Auswertung diente und zusätzlich die gleichmäßige Beladung des Gels verdeutlichen sollte⁵².

3.4.1 Sarkomerischer α -Aktinin Antikörper (EA-53)

Zur Anwendung kam hier ein monoklonaler Antikörper, welcher die sarkomerische α -Aktinin Isoform auf Proteinebene aufzeigen sollte. Die Abb. 29 zeigt die Membran I und II nach 10 Sekunden Expositionsdauer. Die Signale befinden sich auf derselben Höhe wie das rekombinante α -Aktinin und sind somit von der Molekulargewichtsgröße exakt einzuordnen. Eindeutige Spezifität des Antikörpers beweist auch das fehlende Signal bei den glatten Muskulatur-Kontrollen zwischen den Signalen der Patienten und dem der rekombinanten Proteins. Hier war auch nach 1 min. Expositionszeit kein Signal aufzufinden. Die Banden selbst zeigen aber wieder keine Unterschiede zwischen den Patienten und Kontrollen. Um sicherzustellen, dass es sich bei unseren Banden nicht um Immunglobuline handelt, wurde der zweite Antikörper, als Negativkontrolle, alleine auf die Membranen gegeben. Dieser ist in der Lage, ohne den ersten Antikörper, Immunglobuline zu detektieren. Auch nach 5 min. Exposition waren keine Banden zu erkennen.

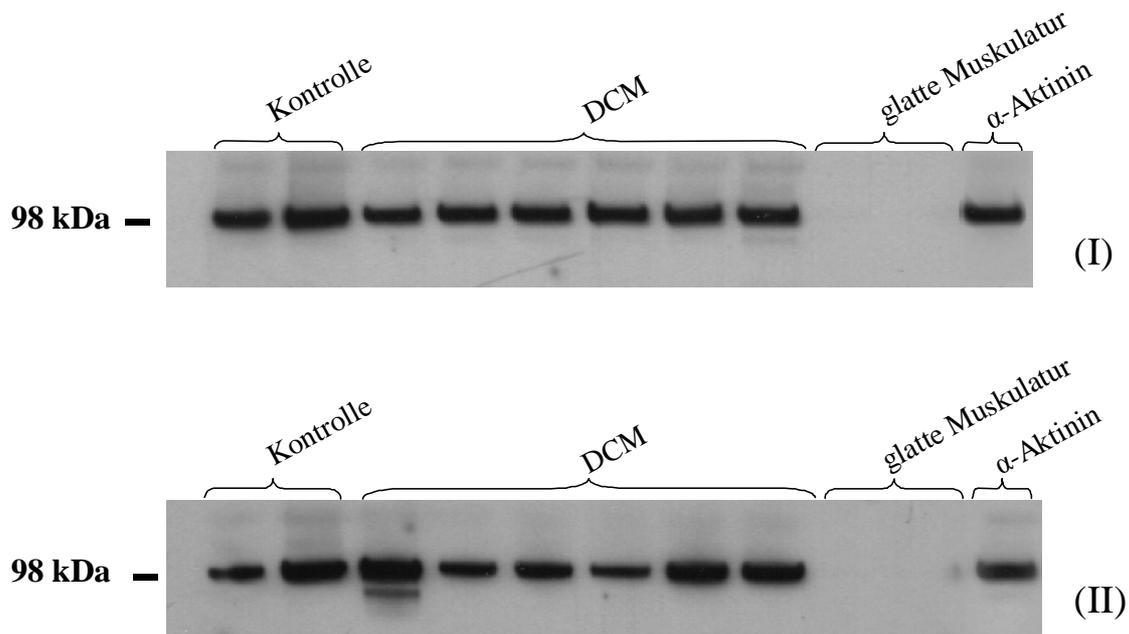
Sarkomerischer α -Aktinin Antikörper (EA-53)

Abb. 29: Western-Blot-Analyse der sarkomerischen Antikörpers bei aufgetragenem Proteinextrakt aus humanem linksventrikulärem Myokard.

Es wurden zwei unterschiedliche Membranen angefertigt (I/II), jede mit Proteinextrakten von 2 Kontroll-Herzen, 12 Patienten, hier 6 auf jeder Membran, 2 glatte-Muskulatur-Kontrollen und einem rekombinanten Protein (α -Aktinin).

Die Abbildung zeigt die Expression des sarkomerischen α -Aktinin Antikörper (EA-53, Sigma) nach einer Expositionszeit von 10 Sekunden.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Myokardproben ist nicht vorhanden, doch zeigt der sarkomerische Antikörper die erwartete Spezifität ohne Kreuzreaktionen mit der glatten Muskulatur.

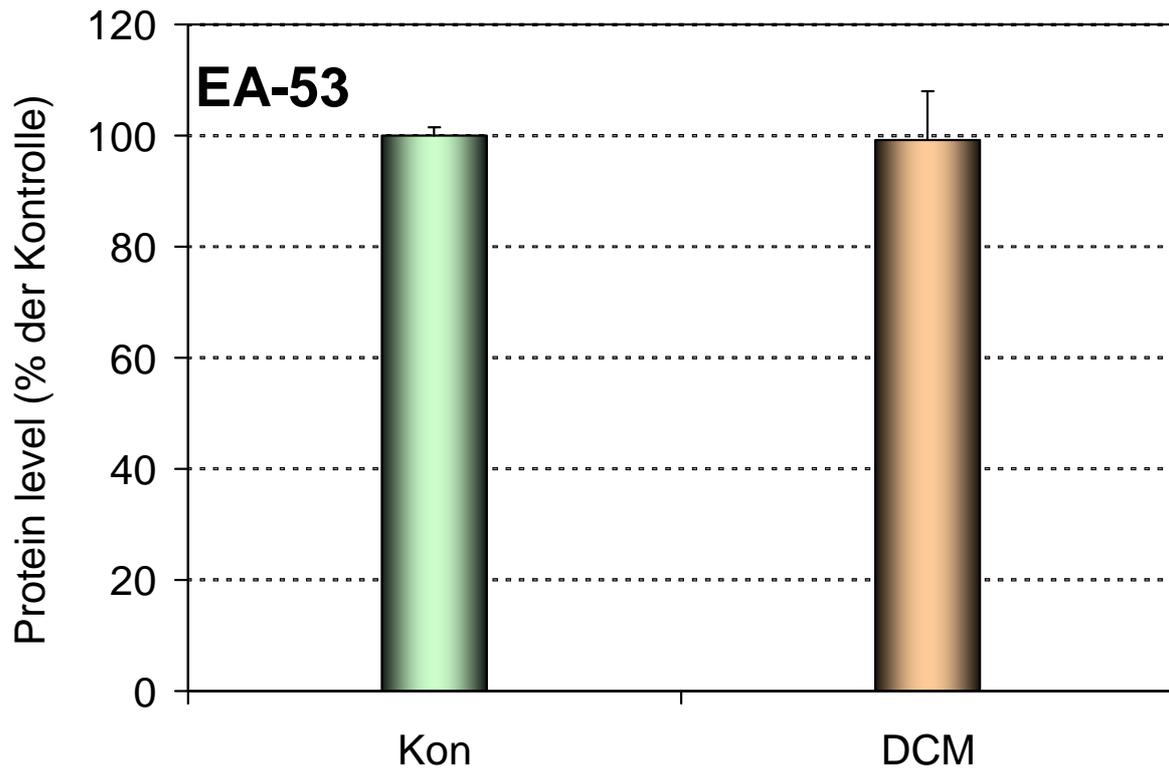


Abb. 30: Die quantitative Analyse der Expression des sarkomerischen α -Aktinin-Antikörpers (EA-53) im Western-Blot zeigt keinen Unterschied zwischen Kontrollherzen und Patienten in der Signalstärke der 98 kDa Bande. Die Resultate sind als Mittelwerte \pm SD angegeben.

3.4.2 Nicht sarkomerischer α -Aktinin Antikörper (BM 75.2)

In diesem Fall handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, welcher in der Lage ist, die nicht sarkomerische α -Aktinin Isoform in glatter Muskulatur zu detektieren.

Beide Membranen (I/II) wurden, wie auch beim sarkomerischen Antikörper, 10 Sekunden exponiert.

Wieder liegt das Signal auf der erwarteten Höhe von 98 kDa, was das rekombinante Protein beweist.

Die sehr starken Banden, die bei den Kontrollen der glatten Muskulatur zu sehen sind, zeigen eindeutig die Spezifität des Antikörpers.

Bei diesem Western-Blot zeigte sich, im Gegensatz zu allen anderen Untersuchungen, ein deutlicher Unterschied bei der Expression der α -Aktinin-1 Isoform zwischen DCM und Kontrollen. Wie man deutlich erkennen kann, zeigt sich bei allen Patienten eine signifikant, hochregulierte Proteinexpression der nicht sarkomerischen α -Aktinin-Isoform im Gegensatz zu den gesunden Kontrollherzen. Jedoch sind auch hier schmale Banden zu erkennen. Da es sich hier um einen nicht sarkomerischen Antikörper handelt, werden auch Zellen der glatten Muskulatur von Gefäßen detektiert.

Die Auswertung zeigt eine hochsignifikante Überexpression dieser nicht sarkomerischen α -Aktinin-1 Isoform.

Nicht sarkomerischer α -Aktinin Antikörper (BM 75.2)

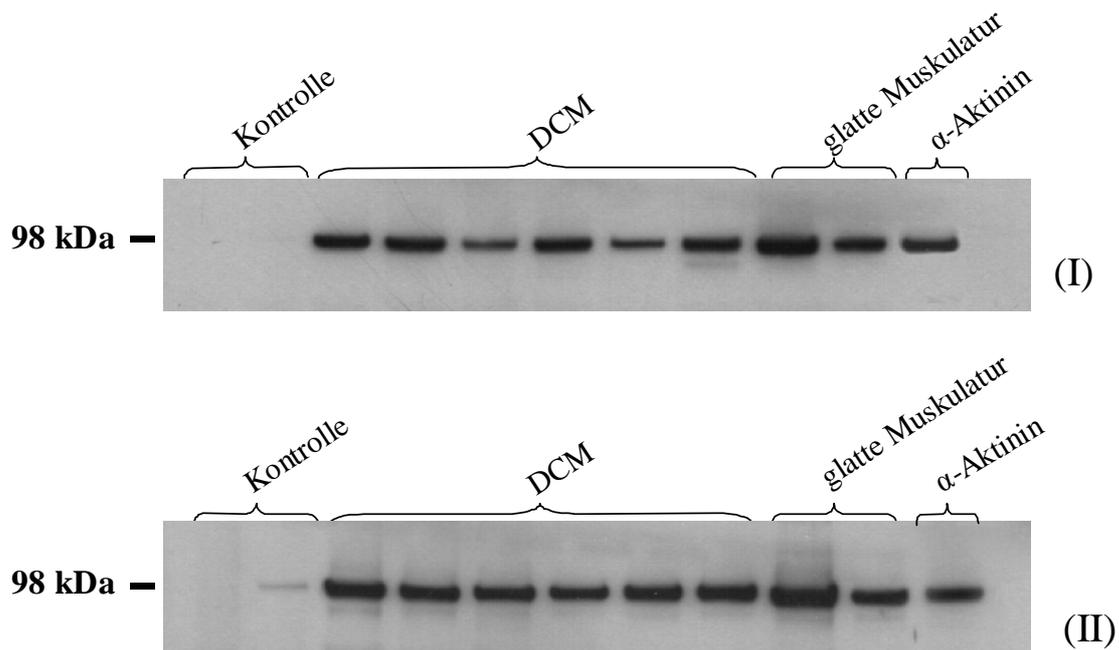


Abb. 31: Western-Blot-Analyse der α -Aktinin-1 Isoform bei aufgetragenem Proteinextrakt aus humanem linksventrikulärem Myokard.

Es wurden zwei unterschiedliche Membranen angefertigt (I/II), jede mit Proteinextrakten von 2 Kontroll-Herzen, 12 Patienten, hier 6 auf jeder Membran, 2 glatte-Muskulatur-Kontrollen und einem rekombinanten Protein (α -Aktinin).

Die Abbildung zeigt die Expression des nicht sarkomerischen α -Aktinin Antikörpers nach einer Expositionszeit von 10 Sekunden. Auffällig ist ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und erkrankten Myokardgeweben. Zur erkennen sind auch schmale Banden der Kontrollen, die auf Detektion der Gefäßmuskulatur zurückzuführen sind.

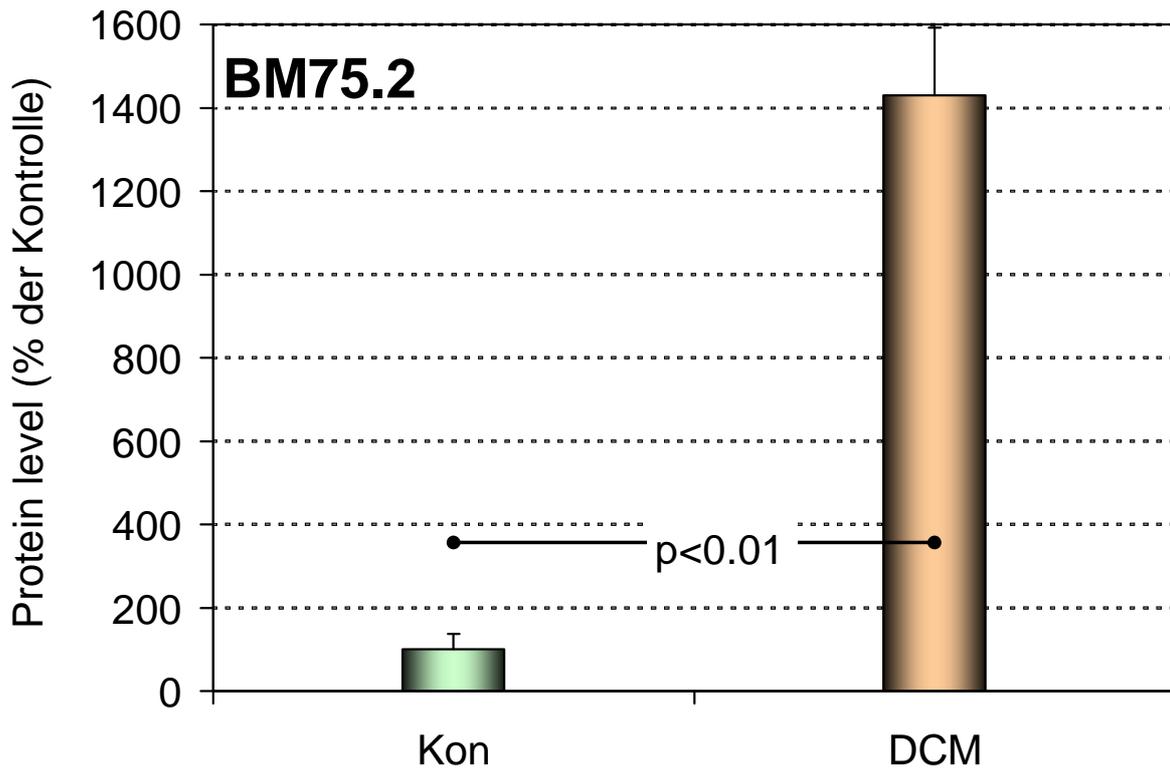


Abb. 32: Die quantitative Analyse der Expression des nicht sarkomerischen α -Aktinin-Antikörpers (BM 75.2) im Western-Blot zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollherzen und Patienten in der Signalstärke der erwarteten 98 kDa Bande mit deutlicher Überexpression bei dem Patientengut. Die Resultate sind als Mittelwerte \pm SD angegeben.

3.4.3 Nicht muskulärer α -Aktinin-4 Antikörper (NCC-LU-632)

Dieser Antikörper wurde uns freundlicherweise von Dr. Tesshi Yamada (National Cancer Center Research Institute, Tokyo) zur Verfügung gestellt. Die japanische Arbeitsgruppe bestätigte seine Spezifität gegenüber der nicht muskulären Isoform des α -Aktinin in einigen Versuchen³⁴.

Trotz der angegebenen Spezifität konnten in den Herzgeweben einige Banden detektiert werden, sogar mit leichten Differenzen zwischen DCM Patienten und Kontrollherzen, die jedoch nicht als signifikant einzustufen waren. Zu erkennen ist auch die deutlich schwächere Bande bei den glatten Muskulatur-Kontrollen, was, in Zusammenhang mit der Ausbildung der Banden in den Herzgeweben der Patienten, zur Annahme der Expression einer weiteren nicht herzspezifischen Isoform führen kann. Die Höhe der Bande und somit die Übereinstimmung mit der richtigen Größe des Proteins wurde wieder durch das rekombinante α -Aktinin bestätigt.

Nicht muskulärer α -Aktinin-4 Antikörper (NCC-LU-632)

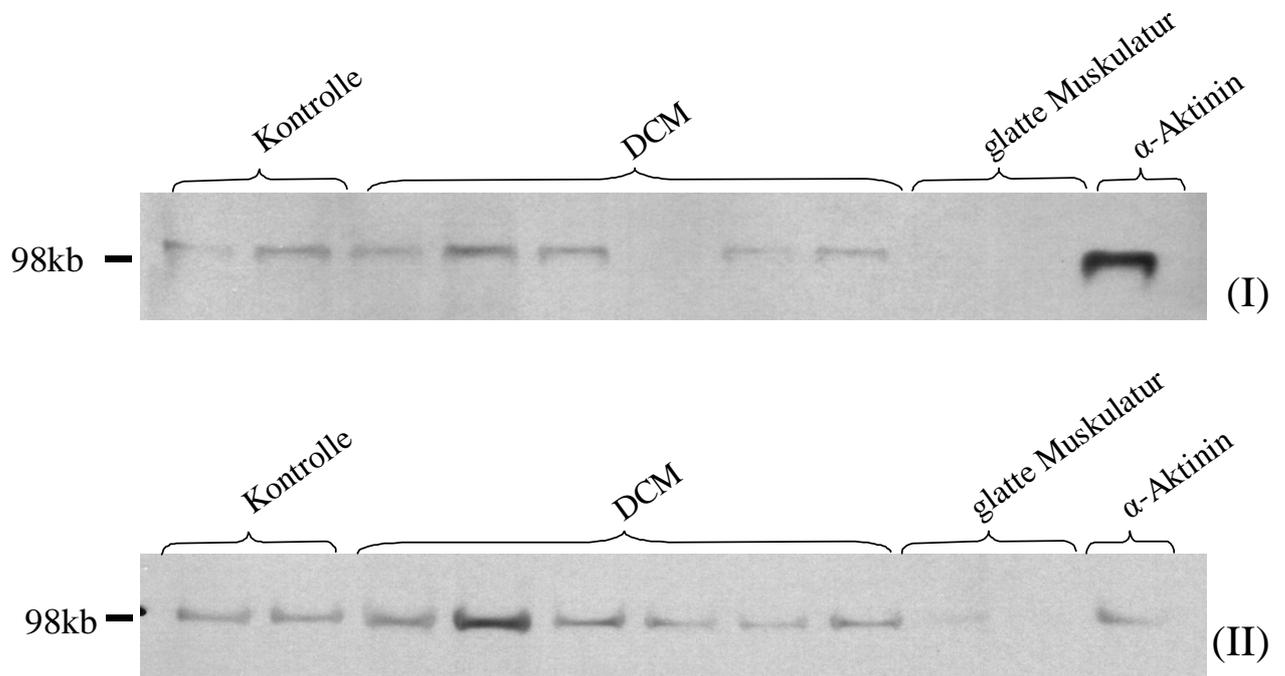


Abb. 33: Western-Blot-Analyse der α -Aktinin-4 Isoform im Proteinextrakt aus humanem linksventrikulärem Myokard.

Es wurden zwei unterschiedliche Membranen angefertigt (I/II), jede mit Proteinextrakten von 2 Kontroll-Herzen, 12 Patienten, hier 6 auf jeder Membran, 2 glatte-Muskulatur-Kontrollen und einem rekombinanten Protein (α -Aktinin).

Die Abbildung zeigt die Expression des Nicht-Muskulatur-spezifischen- α -Aktinin 4 Antikörper nach einer Expositionszeit von 10 Sekunden.

Es lassen sich mehrere unspezifische Signalbanden der einzelnen Gewebe erkennen ohne eindeutige Signifikanzunterschiede. Lediglich bei den Kontrollen der glatten Muskulatur fällt eine deutlich geringere Intensität auf.

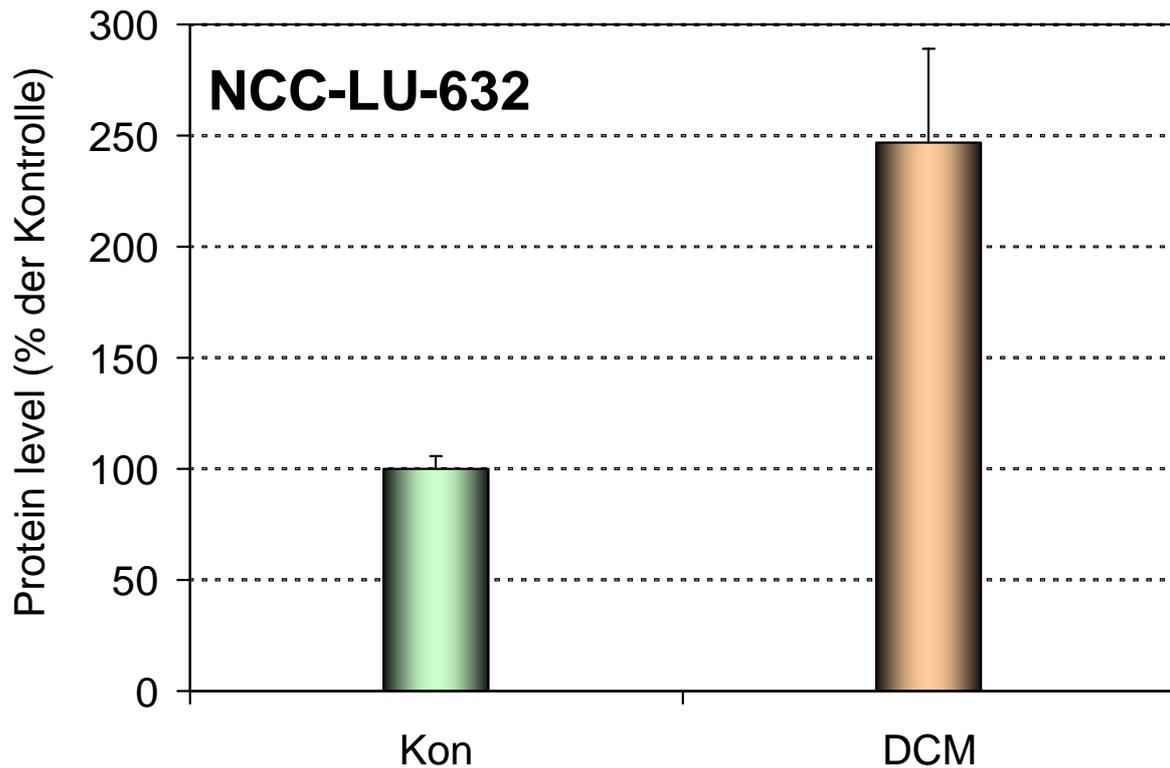


Abb. 34: Die quantitative Analyse der Expression des Nicht-Muskulatur-spezifischen α -Aktinin-Antikörpers (NCC-LU-632) im Western-Blot zeigt einen erkennbaren Unterschied zwischen Kontrollherzen und Patienten in der Signalstärke der erwarteten 98 kDa Bande, welcher aber nicht als signifikant einzustufen ist. Die Resultate sind als Mittelwerte \pm SD angegeben.

3.4.4 Quantifizierung durch den GAPDH-Antikörper

Nachdem alle α -Aktinin-Isoform-Antikörper auf den Membranen untersucht worden waren, war zur Quantifizierung und Normalisierung der Banden ein Antikörper nötig, welcher nahezu in allen Geweben in hohem Maße expremiert wird und eine bekannte Größe besitzt. Hierzu wurde ein Antikörper für GAPDH benutzt, der als Standard für Normalisierungen im Western-Blot gilt⁵².

Abb. 35 zeigt dieselben Membranen mit dem passenden GAPDH-Signal in jeder Spur, mit denen alle anderen Ergebnisse der vorherigen Western-Blot Analysen verglichen wurden.

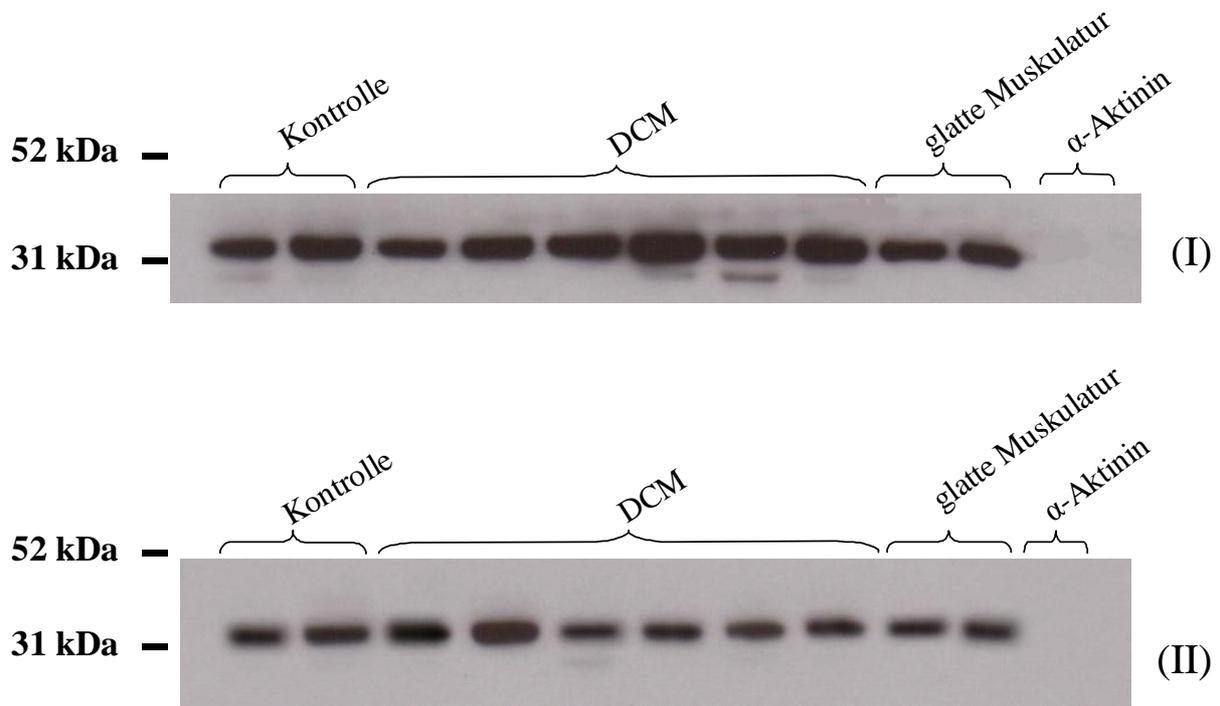
GAPDH Antikörper

Abb. 35: Die Abbildung zeigt die Membranen mit GAPDH-Expression bei ca.36 kDa, welche zur Normalisierung der quantitativen Western-Blot-Analyse als Referenzsignal diente.

3.5 Immunhistochemie

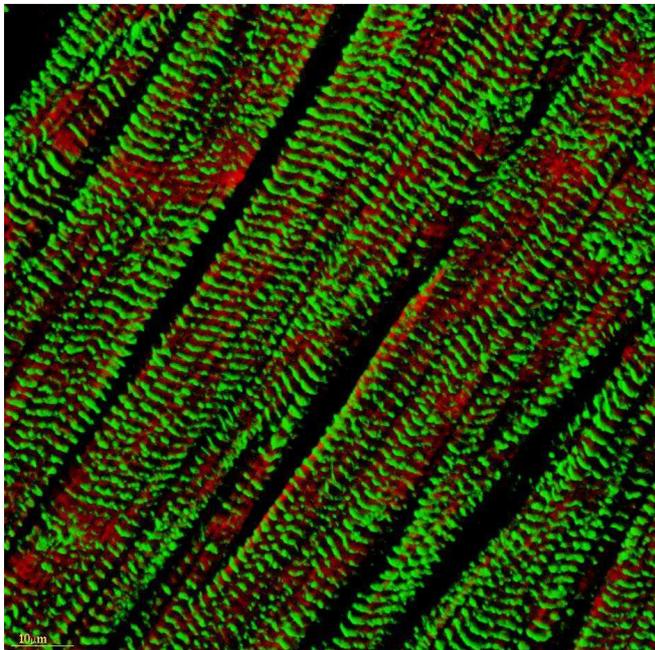
Die hier gezeigten immunhistochemischen Bilder stellen nur einen kleinen Teil der dokumentierten Resultate dar. Sie haben repräsentativen Charakter und geben einen gültigen Mittelwert der vorgefundenen Veränderungen wieder. Die Gewebeschnitte mit den Proteinveränderungen der erkrankten Patienten wurden immer einem Kontrollmyokard gegenübergestellt. Die Bilder wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Stefan Hein angefertigt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

3.5.1 Sarkomerischer α -Aktinin-Antikörper (EA-53)

Als primärer Antikörper kam hier der auch in den Western-Blot-Analysen benutzte, monoklonale, sarkomerische α -Aktinin Antikörper (EA-53) zur Anwendung.

Wie deutlich zu erkennen ist, findet sich bei beiden, sowohl dem Patienten-, als auch dem Kontrollmyokard, die erwartete quergestreifte Markierung des sarkomerischen α -Aktinin-Antikörpers. Im Vergleich zur Kontrolle (a), mit einer gleichmäßig quergestreiften Markierung von sowohl α -Aktinin, wie auch Aktin und wenig Extrazellulärraum, sind in der Kontrolle (b) bei gleicher Vergrößerung nur vier deutlich voneinander abgrenzbare Myozyten zu erkennen. Zu beachten ist die Zelle im rechten Mittelfeld (\downarrow), welche keine Aktinmarkierung mehr aufweist und dabei eine bizarre längs orientierte, teilweise verklumpte α -Aktinin Lokalisation aufweist.

a)



b)

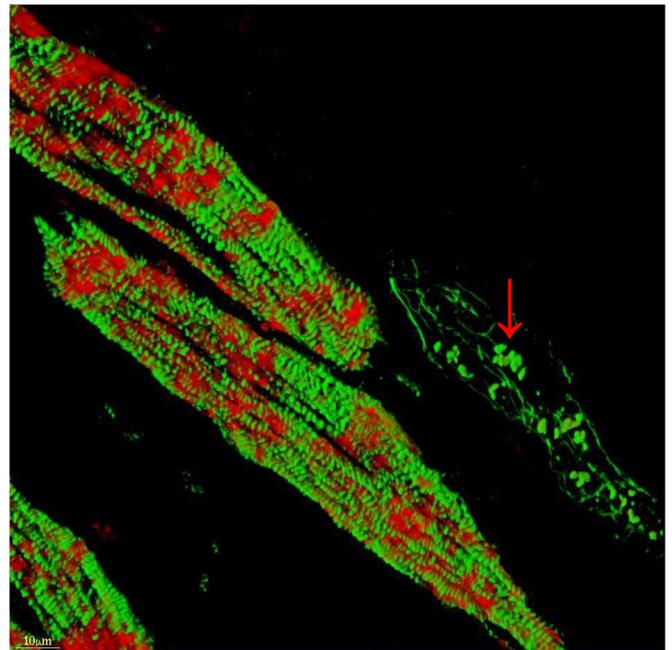


Abb. 36: Die Abbildung zeigt die Gegenüberstellung von gesundem menschlichem Myokard (a) und dilatativer Kardiomyopathie (b) in einer Zweifachmarkierung mit sarkomerischem α -Aktinin (grün), und Aktin-Phalloidin (rot) in humanem LV-Myokard. Auffallend ist die deutlich aufgelockerte Struktur in (b) mit vermehrtem Extrazellulärraum und degeneriertem Kardiomyozyten (\downarrow). Bei gleicher Vergrößerung sind in (b) nur 4 Kardiomyozyten abgrenzbar.

c)

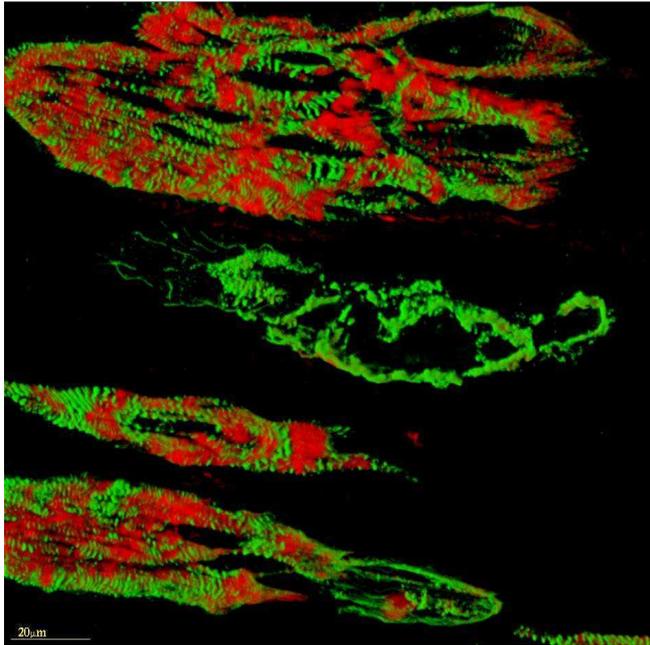


Abb.36c: Die Abbildung zeigt, wie in 36b, ein weiteres Beispiel für mehrere degenerierte Kardiomyozyten aus LV-Myokard bei dilatativer Kardiomyopathie.

3.5.2 Nicht sarkomerischer α -Aktinin-Antikörper (BM-75.2)

Ebenso wie im Western-Blot, wurde auch hier der nicht sarkomerische Antikörper BM-75.2 zur Detektion der α -Aktinin-1 Isoform verwendet.

Als Kontrollpräparat (a) wurde ein Schnitt eines gesunden Myokards mit Gefäßanschnitt gewählt, um die Spezifität des Antikörpers und somit die Detektion von glatter Gefäßmuskulatur zu verdeutlichen.

In der Kontrolle (a) mit einer gleichmäßig gestreiften Markierung von Aktin (rot) und wenig Extrazellulärraum ist in der Bildmitte deutlich der α -Aktinin-1 markierte Gefäßanschnitt (grün) zu erkennen. Im Kardiomyozyten hingegen zeigt sich keine Markierung des Antikörpers.

Den Ergebnissen des Western-Blots entsprechend, zeigt sich hier auf immunhistochemischer Basis im Präparat mit dilatativer Kardiomyopathie (b) allerdings eine deutliche Akkumulation von α -Aktinin-1 positiven Granula im perinukleären Bereich. Weiterhin lässt sich die deutliche Hypertrophie des Kardiomyozyten im Zentrum von (b) erkennen.

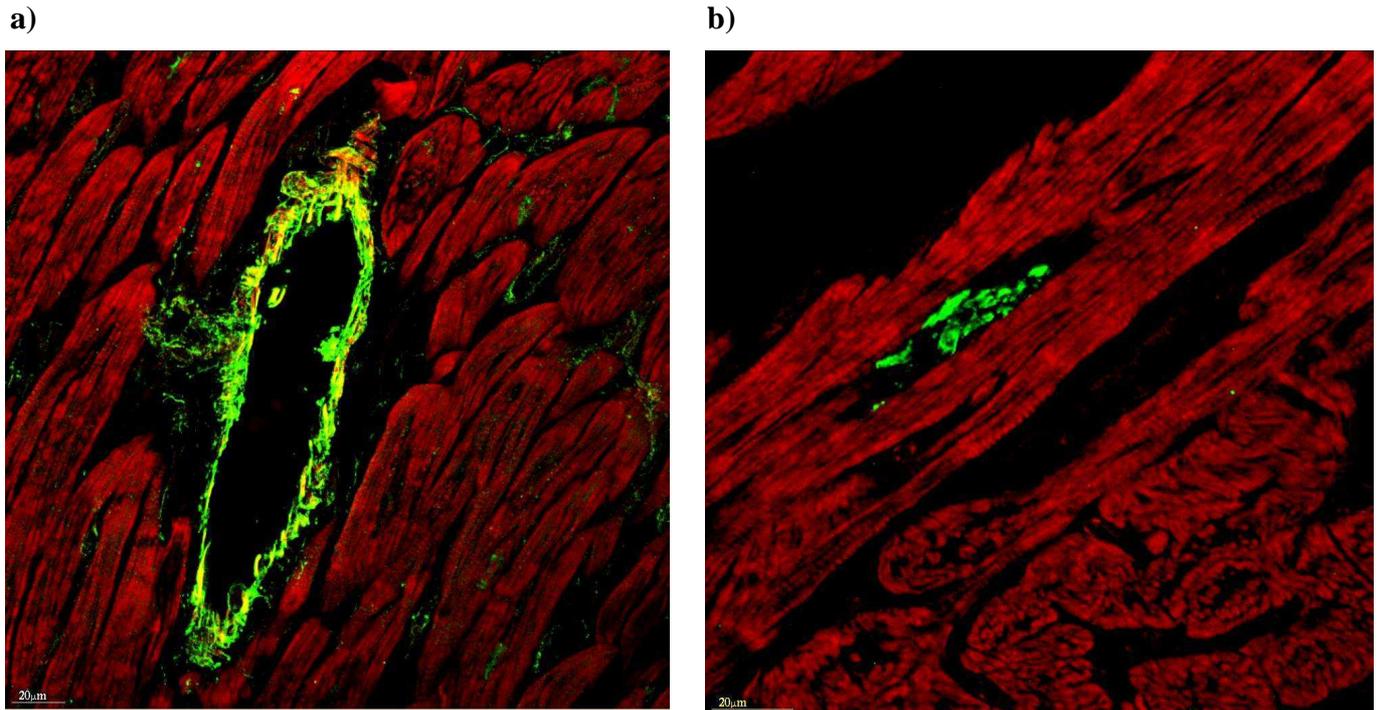


Abb. 37: Die Abbildung zeigt die Gegenüberstellung von gesundem menschlichem Myokard mit Gefäßanschnitt (a) und dilatativer Kardiomyopathie (b) in einer Zweifachmarkierung mit α -Aktinin-1 (grün), und Aktin-Phalloidin (rot) in humanem LV-Myokard. Zu beachten ist die Akkumulation von α -Aktinin-1 im Kardiomyozyten mit DCM (b), sowie die Markierung des Antikörpers in der Gefäßmuskulatur (a), während in beiden Schnitten keine Markierung des sarkomerischen Aktinins zu erkennen ist.

3.5.3 Nicht muskulärer α -Aktinin-4-Antikörper (NCC-LU-632)

Dieser von einer japanischen Arbeitsgruppe in seiner Spezifität bestätigte und bisher nur im Western-Blot angewendete Antikörper, zeigte in der Immunhistochemie im Gegensatz zum Western-Blot, keinerlei Signale in den Kardiomyozyten. Auch nach mehrfachen Wiederholungen des Versuches unter gleichen Bedingungen, sowie verlängerten Inkubationszeiten, konnten keine Markierungen erkannt werden.

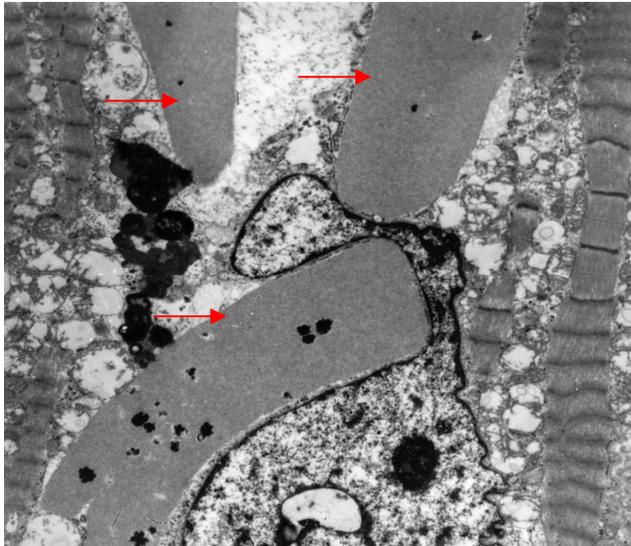
3.6. Elektronenmikroskopie

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse im Western-Blot sowie der Immunhistochemie sollten strukturelle und akkumulative Veränderungen der zellulären Matrix, mit Hilfen von elektronenmikroskopischen Bildern, dargestellt werden. Besonderes Interesse galt Veränderungen von Zellorganellen, die für den Proteinmetabolismus hauptverantwortlich sind (endoplasmatisches Retikulum, Golgifelder, Mitochondrien).

Die folgenden Bilder entstammen beide aus Myokardbiopsien eines an DCM erkrankten Patienten und zeigen eindrucksvoll perinukleäre Granula (\uparrow) im Bereich des endoplasmatischen Retikulums.

Die Bilder wurden freundlicherweise von Dr. Stefan Hein zur Verfügung gestellt und dienen der Vervollständigung der in dieser Studie veröffentlichten Ergebnisse der molekularbiologischen und immunhistologischen Untersuchungen im DCM erkrankten Myokard.

a)



b)

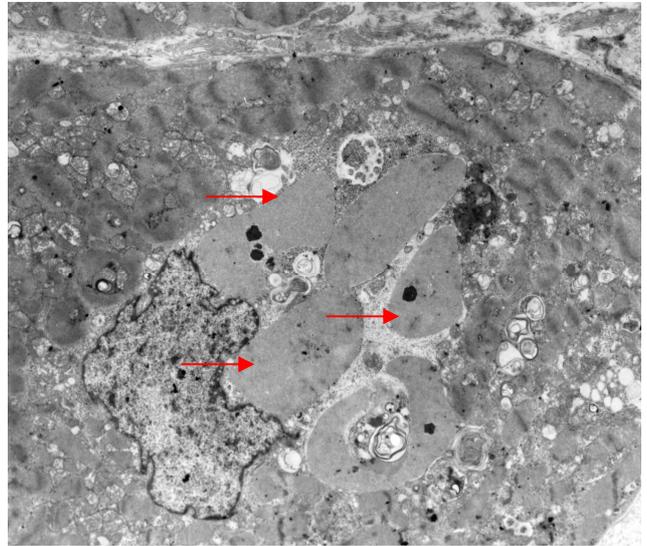
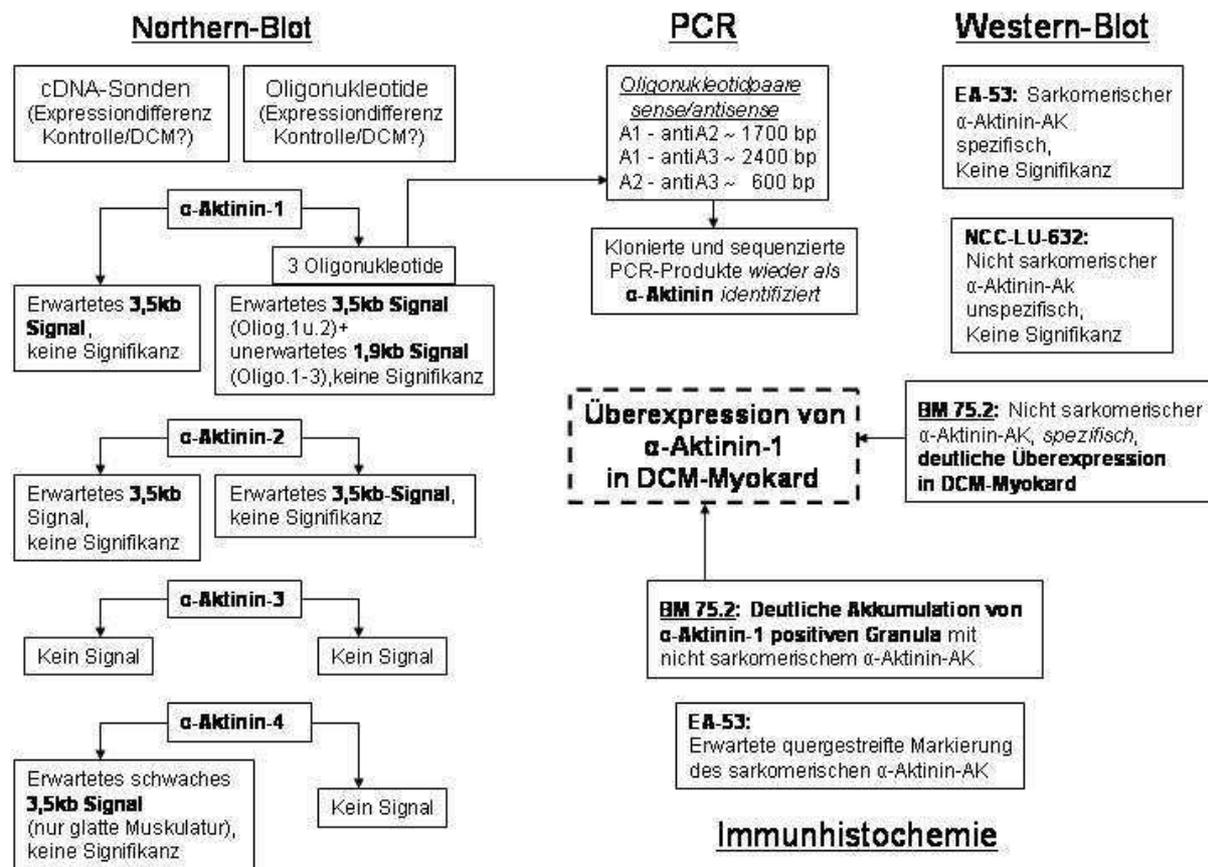


Abb. 38: Die Abbildungen a) und b) zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen von Kardiomyozyten bei dilatativer Kardiomyopathie. Eindrucksvoll erscheinen die Granula im perinukleären Bereich (→).

Die nachfolgenden Erläuterungen und Schaubilder sollen noch einmal die schon beschriebenen Resultate zusammenfassen und als Überleitung zur Diskussion hinsichtlich der verschiedenen Untersuchungsmethodiken, Ergebnisausprägungen und Möglichkeiten ihrer Einflussnahme auf die Pathogenese der DCM dienen.



Ausgehend von den ungewöhnlichen Ansammlungen des α -Aktinin-1 im endoplasmatischen Retikulum der Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie in den immunhistochemischen Versuchen wurden weiterführende molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt. Zunächst sollten mit Hilfe von cDNA-Sonden als spezifischer Marker auf RNA-Level die zuvor erlangten Ergebnisse auf molekularbiologischer Ebene untersucht werden, um Hinweise auf den Ursprung und Pathomechanismus der außergewöhnlichen Akkumulationen zu erlangen.

Alle α -Aktinin-cDNA-Sonden der unterschiedlichen Isoformen, mit Ausnahme von α -Aktinin-3, zeigten im Northern-Blot das erwartete und in der Literatur beschriebene Signal auf Höhe von 3,5 kb ohne einen signifikanten Unterschied zwischen Patienten und gesunden Kontrollen.

Im Gegensatz zu den cDNA-Sonden ließen sich bei Verwendung der spezifischen Oligonukleotide von α -Aktinin-1 (AntiA1/2/3) die erwarteten Signale bei 3,5 kb nur in geringem Maße detektieren. Dagegen zeigte sich hier aber ein unerwartet starkes Signal auf der Höhe von 1,9 kb.

Das Oligonukleotid, spezifisch für α -Aktinin-2 (AntiB1), verhielt sich wie erwartet und zeigte das Signal bei 3,5 kb ebenso ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden Kontrollgruppen.

α -Aktinin-3 und α -Aktinin-4 waren im Northern-Blot mit Oligonukleotiden nicht detektierbar.

Anschließende Nachweise auf Protein-Ebene im Western-Blot mit einem nicht sarkomerischem Antikörper BM 75.2 zeigten dann auch noch eine deutlich gesteigerte Expression des α -Aktinin-1 bei den Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, was die Ergebnisse der Immunhistochemie bestätigte. Der sarkomerische Antikörper (EA 53) zeigte starke Signale in allen Myokardgeweben ohne deutliche Unterschiede zwischen Kontroll- und Patientenmyokard. Der α -Aktinin-4 Antikörper jedoch war mit Ausnahme der glatten Muskulaturkontrollen in allen Myokardgeweben leicht detektierbar, ohne signifikante Differenzen zwischen DCM-Patienten und Kontrollherzen.

	mRNA			Protein		
	Kontrolle	DCM	Ergebnis	Kontrolle	DCM	Ergebnis
<i>α-Aktinin-1</i>	+	+	3,5/1,9kb-Signal, keine Signifikanz	+	+++	Überexpression in DCM
<i>α-Aktinin-2</i>	+	+	1,9kb, keine Signifikanz	+	+	Keine Signifikanz
<i>α-Aktinin-3</i>	-	-	Kein Signal	-	-	-
<i>α-Aktinin-4</i>	-	-	Kein Signal	(+)	(+)	Keine Signifikanz

Tab. 12: Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Northern- und Western-Blot-Analysen der α -Aktinin Isoformen in einer Gegenüberstellung.

IV. Diskussion

4.1 Einführung

Die Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie ist multifaktoriell und wird in der Literatur immer noch uneinheitlich beschrieben. Nach der Entschlüsselung des Genoms wurde häufig die Vorstellung vertreten, dass die molekularen Mechanismen ausreichend geklärt seien und aufgrund dieser Erkenntnisse eine kausale Therapie möglich wäre.

Gerade im Fall der kardiovaskulären Erkrankungen lässt sich diese Vorstellung jedoch nicht verwirklichen. So zeigen die schon seit Jahren laufenden molekulargenetischen Untersuchungen im Bereich der Kardiomyopathien, dass initiale Konzepte hinsichtlich der Zuordnung von Krankheitsgenen und der daraus resultierenden Pathogenese¹²² schnell wieder in Frage gestellt wurden.

Bei der dilatativen Kardiomyopathie sind bislang 15 verschiedene Genorte und 5 „Krankheitsgene“ bekannt. In den letzten Jahren sind sowohl klinische als auch experimentelle Daten veröffentlicht worden, die zeigen, dass Mutationen im gleichen Gen zu unterschiedlichen Phänotypen der DCM führen können^{123,124,125}. Dies bedeutet zum Beispiel das zeitgleiche Auftreten von DCM mit und ohne Herzrhythmusstörungen oder subklinischer Muskelbeteiligung bestimmter Abschnitte der Skelettmuskulatur^{115,119,126}.

So ist davon auszugehen, dass im Bereich der Kardiomyopathien, den Phänotyp und den damit zusammenhängenden Pathomechanismus betreffend, Überlappungen zustande kommen¹²⁵.

Anzunehmen ist, dass der Beginn der Erkrankung durch Mutationen in bestimmten Genen geprägt, jedoch die letztendliche phänotypische Ausprägung einer Kardiomyopathie dann von verschiedensten Faktoren beeinflusst wird, was in mehreren Studien eindrucksvoll beschrieben wurde. Hierzu gehören vor allem hämodynamische, metabolische und genetische Faktoren^{128,129,130}.

Diesen Faktoren ist der Einfluss auf eine verminderte Kontraktionskraft beziehungsweise eine Änderung der myofibrillären Strukturen gemeinsam, welche wiederum Auswirkungen auf die Funktion der sarkomerischen Proteine hat.

Aufgrund der in der Literatur immer wieder beschriebenen Funktionsbeeinträchtigung durch die oben beschriebenen Faktoren wählten wir für unsere Studie ein Protein aus, welches eine wichtige Rolle in der Organisation und der Interaktion des kontraktiles Apparates spielt.

Wie bereits zu Beginn erwähnt, konnte unsere Forschungsgruppe durch zahlreiche Untersuchungen am gesunden, als auch am erkrankten Myokard strukturelle Änderungen und Beeinträchtigungen von Proteinen des Kardiomyozyten nachweisen. Hier zeigten sich insbesondere Veränderungen der Sarkomer- oder Gerüstproteine mit maßgeblichen Auswirkungen auf die myokardiale Funktion²⁴⁻²⁸. Aus diesem Grund folgte, als logische Konsequenz auf die Ergebnisse mit Titin, die Untersuchung von α -Aktinin, als ein Protein mit zentraler Rolle im Sarkomer.

Gestützt von den Ergebnissen der immunhistochemischen Versuche, standen vor allem die in der Literatur beschriebenen Isoformen des α -Aktinin und deren Funktionen im Mittelpunkt des Interesses.

Gerade wegen dieser sich nur geringfügig unterscheidenden Isoformen ist das sarkomerische Protein prädestiniert für genetische Mutationen und Effekte in der Entstehung und dem Verlauf der dilatativen Kardiomyopathie. Diese Problematik wurde zum Beispiel schon zuvor bei anderen zellulären Proteinen, wie dem beta-Myosin-heavy-chain-, Titin-, oder Tropomyosin-Gen, aufgezeigt¹²⁵.

So konnten wir im Verlauf der Untersuchungen auf molekularbiologischer und immunhistochemischer Basis eine gestörte Translation der glatten Muskultur-spezifischen α -Aktinin-Isoform nachweisen.

Ein kurzes Resümee der Resultate, wie am Ende des Ergebnisteils vorgenommen (siehe S.74) soll noch einmal deren Relevanz im Rahmen der Pathogenese der DCM hervorheben, die im Folgenden erläutert wird.

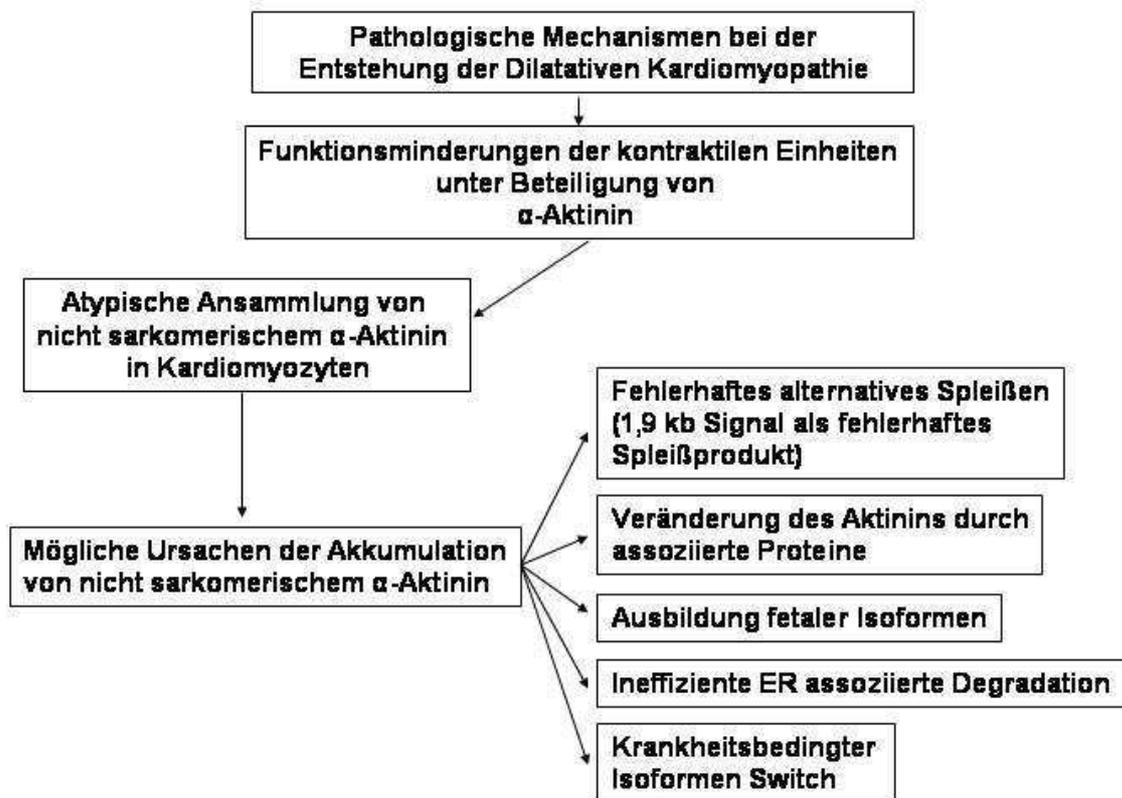
Das ungewöhnliche Vorkommen der nicht sarkomerischen Isoform des α -Aktinins in Myozyten bei den Patienten mit DCM lässt auf eine Beteiligung bei der Pathogenese der DCM schließen.

Neben diesen eindeutigen Ergebnissen auf Protein-Ebene lassen auch die Resultate im Northern-Blot auf eine Beteiligung an der Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie schließen.

So könnte das unerwartete 1,9 kb große Signal im Northern-Blot unter Umständen auf einen pathologischen Mechanismus im Bereich der Translation hinweisen, womit auch auf der mRNA-Ebene eine mögliche Ursache der Pathogenese zu suchen ist. In die Diskussion mit einzubeziehen ist aber auch die Tatsache, dass diese 1,9 kb große mRNA nicht für ein komplettes Aktinin kodieren kann. Ein kürzeres Aktinin wurde aber bei genauer Literatursuche und Datenbankrecherche nicht gefunden.

Im Folgenden sollen nun die verschiedenen Möglichkeiten der Pathogenese, unter Einbeziehung der genannten Faktoren, erläutert werden.

Das hier aufgeführte Schaubild soll zu den folgenden Diskussionspunkten leiten und einen kurzen Überblick über mögliche Ursachen der abnormen α -Aktinin-1 Akkumulation sowie deren Folgen geben.



4.2 Genetik der dilatativen Kardiomyopathie

Zunächst soll die Erkrankung selbst mit ihren genetischen Facetten etwas näher erläutert werden. Die Genetik der dilatativen Kardiomyopathie spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Erkrankung und wirkt sich auch somit destruktiv auf die verschiedensten einzelnen molekularen Mechanismen aus, welche im Verlauf der Erkrankung unterschiedliche Funktionen stören und in ihrer Gesamtheit dann zu dem Bild der DCM führen können.

Wie schon in der Einleitung erwähnt, liegen in mindestens ca. 25-30 % aller Fälle familiäre Formen der DCM vor, wobei der Erbgang hier überwiegend autosomal dominant oder, seltener, X-chromosomal ist⁹⁶⁻⁹⁹.

Bisher konnten 8 verschiedene Krankheitsgene identifiziert werden, nämlich die Gene für Dystrophin (DMD)¹⁰⁰, kardiales Aktin (ACTC)^{101,102}, Desmin (DES)¹⁰³, Lamin A/C (LMNA)^{104,105}, δ -Sarcoglykan (SGCD)¹⁰⁶, die schwere Kette des kardialen β -Myosins (MYH7)¹⁰⁷ und das kardiale Troponin T (TNT2)¹⁰⁷. Mutationen in diesen Genen führen mit einer sehr variablen Penetranz zu einer altersabhängigen Manifestation der DCM.

Die Kenntnis dieser Krankheitsgene führte auch zu einem neuen Verständnis der dilatativen Kardiomyopathie. Entsprechend der Funktion der von oben genannten Genen kodierten Proteine liegt die Überlegung nahe, dass der Erkrankung eine fehlerhafte Kraftentwicklung oder Kraftübertragung zugrunde liegt.

Mutationen in Genen der zytoskelettären als auch sarkomerischen Proteine spielen eine zentrale Rolle bei der Ursache der Erkrankung. Außerdem stehen die meisten der genannten Krankheitsgene und deren Proteine in einem Zusammenhang mit dem von uns untersuchten α -Aktinin, sei es die ähnliche Funktion innerhalb des Sarkomers, die nahezu identisch aufgebauten Domänen anderer Proteine oder die Lokalisation auf demselben Chromosom. Obwohl eine genetische Heterogenität bei den vererbten kardiovaskulären Erkrankungen wie auch die DCM vorhanden ist, lassen sich Krankheitsmuster oder Syndrome doch häufig von defekten Genen ableiten, die Proteine mit ähnlicher Funktion kodieren. Bowles et al. bezeichneten dies auch als die Hypothese der gemeinsamen Endstrecke (The "Final common Pathway" Hypothesis)¹⁰⁸.

Das durch die „Duchenne-Becker“-Muskeldystrophie wohl bekannteste Protein Dystrophin, welches ebenso in einem bestimmten Stadium zur DCM führt, ist nur ein Beispiel für den molekularen Funktionsverlust eines Proteins. Dystrophin ist ein 427 kDa großes zytoskelettäres Protein, das sich im Inneren des Sarkolemms befindet^{108,109}. Sowohl das N-terminale- als auch sein stabförmiges Ende zeigen signifikant große Ähnlichkeiten mit dem des α -Aktinins¹¹⁰⁻¹¹². Auch in seinen verbindungsstabilisierenden, zytoskelettären und sarkomerischen Funktionen stimmt es mit α -Aktinin nahezu überein. Darüber hinaus werden außerdem Koloalationen zu β -Spektrin und Vinculin in der Literatur angegeben. Dieses sind wiederum Proteine, kodiert von Genen, welche in einem Zug mit denen des α -Aktinins genannt werden^{113,114}. So ist ein Funktionsverlust wie bei Dystrophin, bedingt durch genetische Alterationen, auch bei α -Aktinin denkbar.

Eine Veröffentlichung im New England Journal of Medicine beschrieb Mutationen des Chromosoms 14q11.2-13, welches mit der dilatativen Kardiomyopathie in Verbindung steht. Diese führten zu Aminosäureänderungen im β -Myosin und wurden als Ursache der DCM identifiziert¹⁰⁷. Unter der Annahme, dass Mutationen in den Genen, die für Sarkomerproteine kodieren, zur dilatativen Kardiomyopathie führen können, untersuchte diese Gruppe auch das Troponin T- und I- sowie das α -Tropomyosin-Gen.

Dabei konnten in zwei weiteren Familien eine Deletion von 3 Nukleotiden als Ursache der DCM festgestellt werden¹⁰⁷. Diese Mutationen führten primär zur Dilatation, und es lag in keinem einzigen Fall eine myokardiale Hypertrophie vor.

Wahrscheinlich kommt es durch die Mutationen zu einer verminderten Kraftentwicklung innerhalb des Sarkomers.

Auch bei Aktin wurden solche Mutationen gefunden. Olson et al.¹⁰¹ stellte hier die Hypothese auf, dass die DCM eine Erkrankung ist, bei der die im Sarkomer erzeugte Kraft fehlerhaft auf die nächsten Myozyten übertragen wird.

In gleicher Weise führten solche Mutationen bei Desmin und δ -Sarcoglycan zu einer Beeinträchtigung der Kraftübertragung des Sarkomers¹⁰¹.

Es ist anzunehmen, dass durch die direkten funktionellen Verbindungen zu einigen dieser obengenannten Proteine die Funktion des α -Aktinins bei einer Mutation dieser Proteine in Mitleidenschaft gezogen wird. Da sowohl die interaktiven Funktionen als auch die Strukturen dem α -Aktinin gleichen, können mit Sicherheit verschiedenste molekulare Defekte, die auf benachbarte oder interagierende Gene bzw. Proteine einwirken, auch Aktinin selber beeinflussen.

Mutationen der bisher bekannten α -Aktinin Gene selbst wurden bisher noch nicht gefunden. Doch zeigen unsere Ergebnisse, dass eine solche Veränderung, möglicherweise ebenfalls durch Punktmutationen, zu einer zeitweise sekundären Isoformen-Produktion führen kann, die eine in diesem Fall nicht sarkomerische Isoform im Herz ausbildet.

Zur Zeit sind 5 verschiedene Lokalisationen auf den Chromosomen bekannt, welche zu der Form der genetisch heterogenen DCM führen. Diese liegen auf den Chromosomen [1q32]¹¹⁵, [2q31]^{116,117}, [9q13-q22]¹¹⁸, [10q21-24]¹¹⁹, [15q14]¹⁰¹.

Meist jedoch begründen diese Genmutationen ihre Entstehung auf hereditäre Formen, welche bei unseren Patienten zum größten Teil jedoch nachweislich ausgeschlossen werden konnten. Trotz allem sind spontane Formen dieser Mutationen, unabhängig von erblichen Faktoren, denkbar.

Diese Mutationen müssen nicht zwangsläufig auf der primären Ebene der Gene vollzogen werden. Die Ergebnisse von Garcia et al.¹²⁰ zeigen, dass eine hohe Inzidenz von mitochondrialen DNA Nukleotidsequenzveränderungen sowohl in Genen als auch in der Transfer-RNA bei Patienten mit DCM zu finden sind. Insgesamt wurden 5 Mutationen festgestellt, welche schon bestehende Sequenzstücke veränderten und möglicherweise die Funktion und Struktur von einer bestimmten Transfer-RNA beeinträchtigen. Vor allem waren diese Mutationen aber mit erheblichen enzymatischen Defekten assoziiert¹¹⁸. Auch dieser Ansatz könnte eine Möglichkeit der Isoformen-Veränderung des α -Aktinins bei der DCM darstellen.

4.3 Die Rolle der sarkomerischen Proteine im kontraktilem Apparat des Herzens

Im Hinblick auf unsere Untersuchungen sind, neben der übergeordneten Genetik, die Funktionseinschränkungen des kontraktilem Apparates durch die einzelnen Proteine, insbesondere α -Aktinin, von großer Bedeutung, so dass nun gezielt auf diese eingegangen werden soll.

Der Kardiomyozyt setzt sich intrazellulär aus dem kontraktilem Material, dem Zytoskelett, sowie aus dem Kern, Strukturen zur Proteinsynthese und Stoffwechselkompartimenten zusammen.

Der mechanische Teil der Kontraktion wird von den dicken und dünnen Filamenten nach dem Gleitfasermechanismus bewerkstelligt. Deren Hauptkomponenten Aktin und Myosin sind innerhalb der Sarkomere, der kleinsten sich wiederholenden Einheit der Myofibrillen, in paralleler Anordnung anzutreffen. Das Sarkomer, mit einer Länge von 2,0-2,2 μm , ist die wichtigste kontraktile Einheit sowohl im skelettären, als auch im Herzmuskel und repräsentiert mit dieser Länge ein Überlappungsverhältnis der Filamente, bei dem die Effizienz der Kontraktion am höchsten ist.

Die kontraktilem Eigenschaften des Herzens in Hinblick auf Kraftentwicklung und Geschwindigkeit der Kontraktion sind ebenso abhängig von der Anzahl wie auch von dem biochemischen Zusammenwirken der Sarkomere und der Funktion seiner Proteine⁵³. Neben den bekannten großen kontraktilem Proteinen, wie Aktin, Myosin und Troponin, spielen eine Reihe von sarkomerischen Proteinen, unter anderem **α -Aktinin** und Titin, eine sehr entscheidende Rolle. Zwar treten diese in geringeren Konzentrationen auf, tragen jedoch entscheidend zu der Organisation des Sarkomers und dessen Funktion bei^{54,55}. α -Aktinin nimmt hier eine besondere Stellung ein, da es der wichtigste Bestandteil des Z-Streifens ist und Aktinfilamente der beiden benachbarten Sarkomere im Z-Streifen verbindet.

Das intakte Zytoskelett und die Sarkomeren sorgen für die Stabilität und die kontinuierliche Kontraktilität des Myozyten und dessen Verbindung mit der extrazellulären Matrix, welche als ein weiteres Gerüst des Myozyten dient.

Die funktionelle Unterteilung der kardialen Proteine, wie sie in der Einleitung vorgenommen wurde (Tab.1), darf nicht in einem starr getrennten Schema verstanden werden. So sind unter Anderem Änderungen in den myofibrillären Strukturen und deren Bestandteilen sehr eng mit solchen von sarkomerischen Proteinen verbunden⁵⁶. Zwischen den einzelnen Kompartimenten bestehen Interaktionen, welche mechanische und funktionelle Aufgaben innerhalb des Zellverbandes erfüllen⁵⁷⁻⁶¹.

So ist bekannt, dass bei menschlichen Herzerkrankungen im Endstadium verschiedenste degenerative und strukturelle Veränderungen in den Kardiomyozyten vorliegen und sich fibrotische Bereiche über die Ventrikelwände verteilen können^{26,27,62,63}. Außerdem konnte gezeigt werden, dass beispielsweise bei der Hypertrophie im Übergang vom kompensierten zum dekompensierten Stadium das Zytoskelett des Kardiomyozyten eine Schlüsselrolle bei der Verursachung der kontraktilen Dysfunktion spielt. Ebenso wurden Veränderungen des Zytosketts, der kontraktilen Proteine und deren Funktion bei hypertrophen Ventrikeln in einigen Studien beschrieben⁶⁴⁻⁶⁹.

In unserem Fall war α -Aktinin das sarkomerische Protein, das bei dilatativer Kardiomyopathie (DCM) untersucht werden sollte. Wegen der vielseitigen Funktionen, die α -Aktinin innerhalb des Kardiomyozyten übernimmt, ist bei Veränderungen des Proteins eine Beeinträchtigung der kontraktilen Funktion der Sarkomere zu erwarten.

4.3.1 α -Aktinin

Aufbau:

α -Aktinin ist ein Homodimer mit zwei identischen Polypeptiden und besitzt ein Molekulargewicht von 94-103 kDa. Sein Anteil am Gesamtproteingehalt des Myozyten beträgt 1-2%. Die beiden Untereinheiten des α -Aktinins sind in ihrer Ausrichtung antiparallel. Das Molekül kann in drei Domänen eingeteilt werden, wobei die Aktinkopplung in der N-terminalen Region erfolgt und im Bereich der Carboxyl-Gruppe Bindungsstellen für Titin vorhanden sind. Dazwischen liegt in vielfacher Wiederholung eine Einheit bestehend aus 122 Aminosäuren, die für die Organisation der antiparallelen Anordnung verantwortlich sind. Zahlreiche muskuläre, (Skelett- bzw. Glattmuskulgewebe), und nicht-muskuläre (Gehirn, Makrophagen und kultivierte Fibroblasten) Isoformen von α -Aktinin sind bekannt, wie schon in der Einleitung erwähnt wurde. Der bisher bekannte funktionelle Unterschied zwischen den Isoformen ist die Tatsache, dass die aktinbindende Domäne der nichtmuskulären Form (ACTN4) im Gegensatz zu der sarkomerischen Form (ACTN2/3) eine Calciumsensitivität besitzt^{29-35,70-73}.

Funktion:

α -Aktinin stellt als Aktin-bindendes, ubiquitär exprimiertes Protein einerseits einen Teil des Anheftungskomplexes an dem Sarkolemm dar, und andererseits sorgt es im Z-Band-Bereich für eine parallele Anordnung der Aktinfilamente. Es bindet mit seiner Amino-Gruppe direkt das Aktinfilament, mit seiner Carboxyl-Gruppe das sarkomerische Protein Titin und mit einer bisher noch nicht identifizierten Bindungsstelle auch ein Membran-assoziiertes Protein, nämlich Vinkulin. Des weiteren ist α -Aktinin an den Bindungskomplexen vom Adhärenz-Typ ubiquitär vertreten, die auch Intermediärfilamente und Mikrotubuli an das Sarkolemm koppeln. Interessant ist, dass die Kopplung von α -Aktinin und Aktin temperaturabhängig ist, d.h. mit ansteigender Temperatur nimmt die Bindungsaffinität zu^{58,74-78}.

Veränderungen:

Bei fehlendem oder in seiner Interaktion beeinträchtigtem α -Aktinin kommt es innerhalb des Filamentkomplexes zu einem Bindungsverlust, in dessen Folge eine Disorganisation zytoskelettärer Strukturen und der Anordnung von Aktin auftritt, so dass die Kontraktion zumindest deutlich eingeschränkt oder sogar vollständig aufgehoben ist. Von den Veränderungen sind sowohl Kontakte zwischen den Zellen als auch Kontakte von der extrazellulären Matrix zur Zelle betroffen, wobei hier die üblichen mechanischen und funktionellen Interaktionen gestört werden. Bei Verlust oder erheblichen Alterationen von α -Aktinin in der Quervernetzung zu Aktin im Z-Band-Bereich kann es zu Dissoziation der Myofibrillen kommen. In diesem Fall unterstützen jedoch weitere zytoskelettäre Strukturen die Organisation der Myofibrillen, so dass die Funktion des Sarkomers, wenn auch eingeschränkt, weiterhin aufrecht erhalten werden kann^{29,61,79,80}.

In diesem Zusammenhang lassen sich die Auswirkungen bei einem Funktionsverlust des α -Aktinins deutlich erkennen. Solche Veränderungen nehmen nicht nur Einfluss auf das Protein selbst, sondern auch auf benachbarte Proteine und sogar auf den ganzen Kardiomyozyt. An dieser Stelle zeigt sich erneut die zentrale Rolle als Aktin-bindendes Protein. So wurden bei α -Aktinin „Knock-out“- Versuchen letale Folgen unter den Versuchstieren beschrieben^{29,61}.

Die Aufgabe unserer Studie war es, die einzelnen α -Aktinin Isoformen auf ihre differenzielle Genexpression bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und Kontrollherzen zu untersuchen. Es wurde hier vor allem auf eine herunterregulierte Expression der sarkomerischen α -Aktinin-Isoform (ACNT2) geachtet, die eine Ursache für die gestörte Kontraktilität bei DCM hätte darstellen können. Grund für diese Überlegungen waren frühere Untersuchungen, bei denen struktur- und funktionsorientierte Proteine einen deutlichen Expressionsrückgang zeigten^{26,27,28}. Ein Unterschied der Genexpression der einzelnen Isoformen auf mRNA-Ebene zwischen Kontrollherzen und Patienten war hier nicht zu erkennen. Jedoch konnten wir, wie vorher schon erwähnt, zeigen, dass eine nicht sarkomerische Isoform des α -Aktinins (ACTN1) in der Immunohistochemie bei Patienten im Gegensatz zu den Kontrollherzen deutlich zu detektieren war.

Die Möglichkeiten, die zur Ausbildung einer nicht-herzspezifischen Isoform im Kardiomyozyten führen, können nicht auf einen bestimmten Vorgang oder Prozess reduziert werden, da die Zelle mehrere denkbare Wege zur Ausbildung dieser α -Aktinin-1-Isoform einschlagen könnte. Der genaue zeitliche Ablauf und die Lokalisation der fehlerhaften Produktion, die zur Entstehung der genannten Isoform beitragen, konnte in unseren Untersuchungen nicht geklärt werden. Doch werden in der Literatur einige ähnliche Fälle anderer Proteine beschrieben, die interessante Ansätze für unsere Problematik liefern¹²⁵.

4.4 Molekulargenetische Ursachen für die Entstehung der dilatativen Kardiomyopathie

4.4.1 Expression von multiplen Isoformen mit Defektlokalisierung auf mRNA-Ebene

Ein Charakteristikum von höher organisierten Lebewesen ist die Fähigkeit der Expression von regulierten zelltypspezifischen Protein-Isoformen, welche strukturell unterschiedlich und entwicklungsabhängig reguliert sind, aber trotz allem eine hohe Homologie aufweisen können. Die molekularen Mechanismen, die für die Entstehung der unterschiedlichen Protein-Isoformen verantwortlich sind, müssen nicht auf einer Mutation des codierenden DNA-Strangs beruhen. Sie können auch durch veränderte Regulation des Splicings hervorgerufen werden, also die Weiterverarbeitung der prä-mRNA im Zellkern zur reifen mRNA

Beide Mechanismen involvieren die unterschiedliche Nutzung von Gensequenzen zur Produktion von multiplen Protein-Isoformen aus einem einzelnen Gen^{81,82}.

Bei den α -Aktinin-Isoformen sind bis heute vier Gene bekannt, die für die Expression der einzelnen Isoformen verantwortlich sind. Denkbar ist jedoch auch, dass bei Vorliegen eines bestimmten Stimulus, wie zum Beispiel metabolische oder hämodynamische Faktoren, eine fehlerhafte Expression eines Gens zur Produktion einer nicht vorgesehenen α -Aktinin-Isoform führt und somit den Beginn der DCM verursacht.

4.4.1.1 Alternatives Splicing

Die meisten prä-mRNAs werden nach einem festen Schema gesplitt (konstitutives Splicen). Aber die Transkripte von einem Gen können auf verschiedene Weise gesplitt werden. Man spricht hier von differentiellem oder auch alternativem Splicen. Diese Art des Splicings kann verschiedene mRNAs und damit unterschiedliche Proteine aus einem Gen, genauer aus einem primären Transkript, hervorbringen. Damit entstehen aus einer prä-mRNA verschiedene reife mRNAs, die sich durch die An-oder Abwesenheit einzelner Exons unterscheiden. Hier werden verschiedene Formen des alternativen Splicings unterschieden, welche auf der folgenden Seite noch einmal bildlich dargestellt sind:

- Kassettenexons (mutually exclusive Exons),
- das Überspringen von Exons (Exon Skipping),
- das Beibehalten von Introns (Intron retention) oder
- das Benutzen unterschiedlicher 5' oder 3' splice sites (alternative 5'/3' splice site)

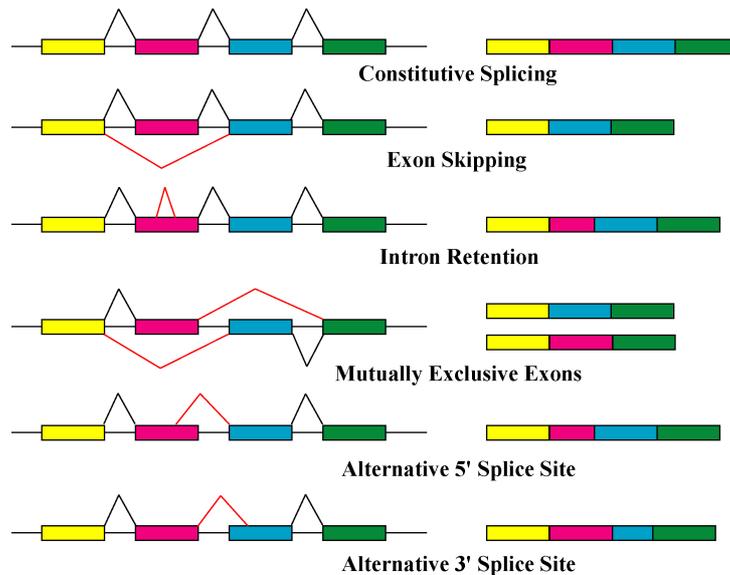


Abb. 39: Die Abbildung zeigt die verschiedenen Formen des alternativen Splicings (rote Markierungen) im Vergleich zum konstitutiven Splicing (schwarze Markierungen).

Sie kodieren somit häufig mehrere Formen desselben Proteins, die in unterschiedlichen Entwicklungsstadien oder in unterschiedlichen Zelltypen benötigt werden^{82,83}. Aus etwa 60% aller menschlichen Gene werden durch alternatives Splicing mehrere Proteine hergestellt. Dieser Vorgang steigert die Kodierungsmöglichkeiten. Ein Gen kann die Information für mehrere, auch verwandte, Proteine tragen. Man weiß jedoch noch nicht, ob der Organismus von dieser gesamten theoretischen Komplexität auch Gebrauch macht oder wie die mögliche Auswahl getroffen und reguliert wird. Diese Möglichkeit nutzen zum Beispiel die Gene für Immunglobuline, für Struktur-Proteine wie das Fibronectin und für Komponenten des kontraktiven Apparates der Muskelzellen.

Das alternative prä-mRNA Splicing ist besonders im quergestreiften Muskel und dem Herzmuskel zu beobachten. Unter den Genen, welche für die kontraktiven Proteine kodieren, ist diese Art der Genregulation vor allem für alpha- und beta-Tropomyosin, Troponin T und die leichten Ketten des Myosins, neben einigen weiteren Genen, dokumentiert worden^{81,82}. Einen Hinweis auf die negative Auswirkung von Splice-Vorgängen liefert die Untersuchung einer Gruppe aus Denver, USA. Sie konnte zeigen, dass dieser Vorgang durch fehlerhaft gesplice RNA einen genetischen Defekt hervorruft, der wiederum zu einem Mangel an Metavinkulin führt. Dies war nachweislich mit der dilatativen Kardiomyopathie in Zusammenhang zu bringen⁸⁴. So wird fehlerhaftes alternatives Splicing dabei in zunehmendem Maße als Ursache von Krankheiten erkannt.

Als Beispiel ist hier die Erkrankung der „Myotonen Dystrophie“ zu nennen, bei der abnorme Splicevarianten im Skelettmuskel von zwei verschiedenen Genen produziert werden. Als Folge davon wird ein Kanalprotein mit schwächerer Aktivität produziert, und es kommt als Folge zu Myotonien und Fehlansteuerungen des Muskels^{133,134,135}.

Die verschiedenen Isoformen der sarkomerischen oder kontraktiven Proteine, die entweder durch die Transkription unterschiedlicher Gene entstehen oder von demselben Gen durch alternatives Splicing produziert werden, sind meist in der Lage, eine Isoform zu substituieren und gleichzeitig nebeneinander in der Zelle zu bestehen⁸⁵. Es gibt aber auch gewebe- oder entwicklungsspezifische Splicemuster¹³⁰.

So ist es nicht abwegig, dass Isoformen mit einer hohen Homologie, die von demselben Gen kodiert werden, aber für völlig unterschiedliche Zellen vorgesehen sind, sich gegenseitig bei gleichzeitiger Präsenz in der Zelle auch behindern können und somit antagonistische Eigenschaften resultieren^{131,132}. Das gleichzeitige Nebeneinander der beiden Isoformen des Aktinins ist deutlich durch unsere Untersuchungen, vor allem im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern, eindrucksvoll hervorgehoben worden. Hier konnten deutlich beide Isoformen (ACTN-1/-2) detektiert werden. Auch auf mRNA-Ebene konnten die Isoformen mittels Northern-Blot detektiert werden, wobei hier zusätzlich die Versuche mit der Polymerase-Ketten-Reaktion die Spezifität der Oligonukleotide bestätigte.

Die immer wieder auftretende 1,9 kb Bande bei den α -Aktinin-1 spezifischen Oligonukleotiden könnte in diesem Fall ein Splice-Produkt darstellen, welches innerhalb einer gestörten Genexpression zu dem Auftreten der Aktinin-1- Isoform hätte führen können. Mit einer Größe von 1,9 kb ist diese mRNA jedoch zu klein, um für eine vollständige Variante des α -Aktinins kodieren zu können. Bei der darauf folgenden PCR-Analyse mit den entsprechenden Oligonukleotiden konnte jedoch ein ähnlich großes Produkt nicht detektiert werden.

Eine Verbindung hinsichtlich des Splicing-Produktes in Beziehung zur dilatativen Kardiomyopathie konnte mit dieser Untersuchung nicht hergestellt werden. Darüber hinaus konnte auch bezüglich eines Signalunterschiedes der detektierten Produkte keine Aussage über Differenzen zwischen Patienten und Kontrollherzen gemacht werden, da diese in beiden Fällen gleichfalls vorhanden waren.

Sequenzanalysen und Abgleiche mit zugänglichen Datenbanken konnten die benutzten Primer, beziehungsweise Oligonukleotide wieder als α -Aktinin identifiziert werden. Besonders die Suche in einer neueren, nicht öffentlichen Datenbank (CELERA) ergab positive Resultate in Bezug auf die Identifikation unserer PCR-Produkte als α -Aktinin-/ α -Aktinin- ähnliche RNA von ca. 1,9 kb ausfindig machen, welche aber leider durch die Datenbank noch nicht näher beschrieben werden konnte (siehe S. 58).

4.4.1.2 Die parallele Expression zweier Isoformen desselben Proteins

Es stellt sich jedoch die Frage, warum gerade die α -Aktinin-1 Isoform, eine nicht sarkomerische Isoform, bei DCM als koexistentes Protein neben α -Aktinin-2 im Herz auftritt beziehungsweise eine derart deutliche Überexpression stattfindet. Natürlich spielt die Homologie zwischen den beiden Isoformen eine große Rolle, da die sarkomerische Isoform die höchste Homologie zu α -Aktinin-1 aufweist. So könnten durch eine fehlerhaft gespligte RNA die Isoformen mit hoher Homologie parallel produziert werden. Ein weiterer Faktor ist natürlich das Vorhandensein von Gefäßmuskulatur im Myokard, was dann aber auch deutlich in den gesunden Patientenkontrollen zu detektieren sein müsste.

Darüber hinaus wurde von einigen Autoren berichtet, dass einige Isoformen von kontraktilen Proteinen, die in glatter Muskulatur ausgebildet werden, auch in anderen Muskelgruppen vorkommen, wie zum Beispiel dem Myokard. Bestimmte Isoformen seien hingegen auf das Myokard beschränkt^{53,55,86}.

Aber auch hier wurde der physiologische oder pathologische Grund für eine solche Isoformen-Verteilung nicht geklärt. Es wurden jedoch Vermutungen darüber geäußert, basierend auf dem Verständnis der Entwicklung des kontraktiven Apparates, dass embryonale und fetale Isoformen des Aktinins oder anderer Proteine des kontraktiven Apparates durch Mutationen schon früh in ihrer eigentlichen Funktion gestört werden können. Hier können Gensequenzen während ihrer Dekodierung in unterschiedlicher Abfolge zusammengefasst und im Folgenden insuffizient eingesetzt werden, so dass zwei Isoformen eines Proteins gleichzeitig gegensätzliche Funktionen in demselben Organ ausführen können. So tritt im Falle des Aktinins die nicht sarkomerische Isoform der glatten Muskulatur nebeneinander mit der sarkomerischen Isoform im Herzmuskelgewebe bei dilatativer Kardiomyopathie auf.

4.4.1.3 Ausbildung fetaler Isoformen bei dilatativer Kardiomyopathie

Diese besonderen Isoformen-Wechsel als Begleiterscheinung einer Hypertrophie durch eine erhöhte Arbeitsbelastung sind in der Literatur für Aktin und Myosin beschrieben, welches beide Proteine sind, die in engen Kontakt zu α -Aktinin stehen. Generell erfolgt eine Antwort auf eine Überbelastung infolge einer gesteigerten Kammerfüllung sehr schnell und betrifft nicht nur ein einzelnes Kompartiment⁹⁰. Diese Antwort ist durch die erneute Expression von Protein-Isoformen charakterisiert, die normalerweise nur während der Fetalperiode ausgebildet und im Erwachsenenalter unterdrückt werden. Das Phänomen wurde bisher für eine Reihe von Genen bestätigt, so zum Beispiel für kontraktile Proteine wie das skelettäre Aktin, Myosin-light-chain, und -heavy chain sowie das Tropomyosin^{90-93,151}. Ebenso konnte dieses für Membran-Proteine wie die Na^+ , K^+ -ATPase sowie das Atriale Natriuretische Peptid (ANP) nachgewiesen werden^{94,95}.

Außerdem führt eine chronische Druckbelastung des linken Ventrikels zu einer abnormen Aktivierung fetaler Wachstumsfaktoren, welche die Proteinsynthese und fetale Muskelgenprodukte verändern. Angiotensin II, Noradrenalin und andere Wachstumshormone beispielsweise haben eine wachstumsfördernde Wirkung auf das Myokard. Abhängig vom Ausmaß dieser Produktion von Wachstumsfaktoren kann unter Umständen eine überproportionale Myokardhypertrophie entstehen, was in gewissem Umfang auch für die dilatative Kardiomyopathie zutrifft. Bekanntermaßen kommt es bei einer DCM im Endstadium nicht zu einer muskulären Wandhypertrophie, jedoch zeigen sich histologisch häufig hypertrophierte Myozyten.

Infolge der Tatsache, dass das adulte Myokardgewebe, im Gegensatz zum fetalen Myokard, aufgrund der Blockade des Zellzyklus wenig oder gar nicht mehr zur Zellteilung fähig ist, resultiert auf molekularer Ebene eine pathologische Hypertrophiereaktion des Myokards bei Überbelastung¹³⁷.

Ausgehend von diesen Beobachtungen lässt sich feststellen, dass die myokardiale Hypertrophie in diesem Fall nicht nur ein quantitatives Problem im Sinne der Herzmasse, sondern darüber hinaus auch eine qualitative Änderung der wichtigsten Kompartimente des Myokards aufweist. So werden in diesem erkrankten Herzmuskel nicht nur fetale Proteine produziert, sondern dieser zeigt auch physiologische und biochemische Eigenschaften eines fetalen Myokards mit entsprechenden Funktions- und Leistungsverlusten.

So weist das fetale Myokard eine geringe Anzahl an T-Tubuli, sarkoplasmatischem Retikulum und Myofibrillen auf. Es besteht im Vergleich zum adulten Myokard eine geringe Anzahl kontraktile Elemente pro Gramm Herzmuskelgewebe, und es ist noch keine volle Innervation vorhanden. Daraus resultiert, dass Feten eine schlechtere systolische und diastolische Funktion aufweisen und beispielsweise schlechter auf adrenerge Stimulation reagieren¹³⁶.

Da diese Umstände der Hypertrophie, wie zuvor beschrieben, in einem Stadium auch für die dilatative Kardiomyopathie zutreffen, ist die Annahme der Expression einer fetalen Isoform durchaus begründet. Tatsächlich wird die α -Aktinin-1 Isoform auch als fetale Isoform beschrieben. Die in der Immunohistochemie und im Western-Blot gezeigte Akkumulation der α -Aktinin-1 Isoform lässt darauf schließen, dass durch diese Anhäufung einer nicht sarkomerischen Protein-Isoform, wie in den zuvor aufgeführten Fällen, eine Störung des kontraktile Apparates vorliegt, da es zu einer Reexpression einer fetalen Isoform kommt.

4.4.2 Ursprung und Lokalisation der fehlerhaften Produktion von Aktinin-Isoformen

4.4.2.1 Ursprung der fehlerhaften Produktion auf mRNA-Ebene

Häufig werden die zuvor beschriebenen Änderungen der Protein-Isoformen auf molekularer Ebene auf dem Level der Transkription für das jeweilige Gen vorgenommen, wie es auch in der Literatur für α - und β -Myosin beschrieben wird. Dies bedeutet, dass in dieser Untersuchung die im Northern-Blot erhobenen Befunde bereits eindeutige Hinweise auf eine vollständige Ausprägung der fehlerhaft produzierten α -Aktinin-1 Isoform vorhanden sein müssten. Einen derartigen Hinweis auf Art und Weise der Regulation und den Zeitpunkt des ersten Auftretens der α -Aktinin-1 Isoform im Herz konnten in unserer Studie mit den angewandten Methoden nicht explizit dargestellt werden, jedoch lassen sich Vermutungen diesbezüglich anstellen.

Vermutlich liegt der Regulationszeitpunkt nicht in der Transkriptionsperiode. Deutlich wird dies bei Betrachtung des konventionellen Northern-Blots, da auf der mRNA-Ebene, trotz der Spezifität der drei Oligonukleotide für die glatte-Muskulatur-Isoform, nur eine sehr geringe Expression der α -Aktinin-1 Isoform zu detektieren war. Mit Ausnahme einer Sonde (Anti-A1) ließen sich keine eindeutigen Signale auf der erwarteten Höhe von 3,5 kb erkennen. Doch auch dieses eine Signal ging bei intensivem Waschen der Membran verloren.

Jedoch könnte auf der anderen Seite das unerwartet detektierte, 1,9 kb große Signal im Northern-Blot hier einen Hinweis auf die im Transkriptionslevel ablaufende Fehlproduktion darstellen, wie es schon zuvor unter 4.4.1.1 beschrieben wurde. Weiterhin könnte es der Anstoß für eine irreguläre Translation sein, bei der es zur Bildung von mehreren stabileren oder völlig anderen Proteinen kommen kann.

4.4.2 Ursprung der fehlerhaften Produktion auf Protein-Ebene

Nach den eben beschriebenen Vorgängen auf der mRNA-Ebene ist die fehlerhafte Produktion mit großer Wahrscheinlichkeit auf der Protein-Ebene zu suchen.

Bei den Versuchen in der Immunhistochemie sowie im Western-Blot konnten eindeutige Zeichen der Ansammlung von α -Aktinin-1 beobachtet werden.

So ist zu vermuten, dass eine Störung der Translation Ursache für die im Herzen entstehende Überproduktion der α -Aktinin-1 Isoform ist. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass die fehlerhafte Produktion im Anfangsstadium schon im Bereich der Transkription lag, über einen längeren Zeitraum andauerte, hier für eine Akkumulation des Proteins sorgte und dann aber im Endstadium der Erkrankung langsam abnahm. So sind zwar noch einige schwache Banden auf mRNA-Ebene zu entdecken, wobei das Protein selbst hauptsächlich als Ansammlung über den Western-Blot auf der Protein-Ebene zu detektieren ist.

4.4.3 Ursachen und Auswirkungen der Akkumulation im endoplasmatischen Retikulum

Unabhängig von der zugrunde liegenden Ursache dieser Überexpression des α -Aktinin-1 konnte eine deutliche Akkumulation im endoplasmatischen Retikulum (ER) festgestellt werden.

Im Innenraum des rauhen endoplasmatischen Retikulums sammeln sich die von den Ribosomen gebildeten Proteine. Diese sind durch Membranen des ER vom Zytosol getrennt.

Eine Akkumulation im ER, wie in unserem Fall dokumentiert, kann ursächlich von verschiedenen Faktoren abhängig sein.

Eine mögliche Ursache könnte eine ineffiziente ER assoziierte Degradation von Proteinen sein, die außerhalb des ER stattfindet¹⁴². Bevor Proteine dieser Degradation durch Proteasen unterzogen werden, wird eine Art Qualitätskontrolle innerhalb des endoplasmatischen Retikulums durchgeführt. Hier wird beispielsweise die Entfaltung von Proteinen vollendet, bevor diese zur Ausübung ihrer eigentlichen Funktion ausgeschleust werden¹⁴³. Unvollendete Proteine werden dann dem Mechanismus der Degradation unterzogen, wenn sie als solche durch die Qualitätskontrolle des ER erkannt worden sind. Wie auch im Falle von völlig intakten Proteinen, scheint der entscheidende Faktor zur Erkennung von abnormalen Proteinen der anhängende Glucoserest dieses Proteins zu sein. Von besonderem Interesse ist das Entfernen dieses Glucoserestes, möglicherweise das entscheidende Signal zur Ausschleusung, was auch in der Literatur als „Trimming“ bezeichnet wird^{144,145}. Die hier ablaufenden enzymatischen Reaktionen verlaufen jedoch sehr langsam, so dass eine Verzögerung des Trimmings zu einer Akkumulation des zur Degradation anstehenden Proteins führen kann¹⁴⁶.

Die Verschiebung des Proteins aus dem ER ins Zytosol zur Degradation verläuft in zwei Schritten. Der erste Schritt ist die Passage entlang der Membran des endoplasmatischen Retikulums zur Oberflächenmembran, die an das Zytosol grenzt, wo Proteine nachweislich akkumulieren können¹⁴⁷, da dieser Schritt auch in Abwesenheit von Proteasen verläuft. Der zweite Schritt, die Verschiebung ins Zytosol zur eigentlichen Degradation, benötigt aber aktive Proteasen sowie ausreichend ATP als Energielieferant.

Diese hier beschriebene Akkumulation ist auch im Zusammenhang mit α -Aktinin-1 denkbar. Durch die „Qualitätskontrolle des ER“ als nicht intaktes Protein erkannt und zur Degradation vorgesehen, kann es so vor Ausschleusung ins Zytosol zur Ansammlung kommen.

Möglicherweise ist auch α -Aktinin-1 zur Degradation vorgesehen, kann aber aufgrund fehlender Proteasen dieser nicht zugeführt werden. Eine ineffiziente endoplasmatische Retikulum-assoziierte-Degradation führt somit zur Ansammlung abnormaler Proteine, die die Zelle schädigen oder ihre Funktion beeinträchtigen können.

Dieses unter normalen Umständen funktionierende System ist von entscheidender Bedeutung für das Überleben der Zelle. So ist es nicht überraschend, dass dieses System ursächlich mit einigen Krankheitsstadien in Verbindung gebracht wird¹⁴⁸. Auch wurden in diesem Zusammenhang in Tierversuchen Auswirkungen hinsichtlich der Entstehung einer DCM beschrieben¹⁴⁹. Darüber hinaus ist die Einwirkung auf die Variabilität von fehlerhaften Genexpressionen bedeutend¹⁴⁶.

4.5 Aktinin assoziierte Proteine

Die Funktionstörung des kontraktiven Apparates, welche letztendlich zur Erkrankung führen kann, muss jedoch nicht direkt ihren Ausgang von α -Aktinin nehmen.

Ein ganz anderer Gesichtspunkt liegt natürlich im Bereich der Aktinin assoziierten Proteine, bei denen es zu Protein/Protein-Wechselwirkungen innerhalb des Zytoskeletts oder der Sarkomer/- Gerüststruktur kommen kann.

Das Zytoskelett dient der Stabilisierung der Zelle und ihrer Organellen. Diese Funktion wird im Kardiomyozyten von Desmin und Tubulin wahrgenommen. Das Gerüst der Sarkomere andererseits, bestehend aus Titin, Myomesin und α -Aktinin, festigt die Stabilität des kontraktiven Apparates. Eine Verbindung der einzelnen zellulären Komponenten in ihrer Gesamtheit, wie kontraktiver Apparat, intrazytoplasmatisches Zytoskelett oder das Sarkolemm, erfolgt über Membran-assoziierte Proteine.

So haben beispielsweise Studien gezeigt, dass die Reduktion des kontraktiven Materials bei der DCM von einer Desorganisation und einer kompensatorischen Akkumulation von zytoskelettären Proteinen, wie Desmin und Tubulin, begleitet ist. Gleichzeitig waren die Proteine innerhalb des Sarkomers, wie Titin und Myomesin, reduziert^{25,28}.

Proteininteraktionen spielen in nahezu allen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle und können auf verschiedenen Wegen sowohl intrazelluläre Prozesse als auch die Signalübermittlung zwischen einzelnen Zellen beeinflussen.

Hier zeigt α -Aktinin seine Vielfalt und Bedeutung durch seine multiplen Funktionen, da es zum einen der Stabilisierung des Sarkomers und zum anderen auch als Verbindungsstück zwischen Aktin und der Zellmembran dient, wo es Integrine bindet und somit Interaktionen zwischen intra- und extrazellulärer Matrix ermöglicht. Integrine wiederum können so durch Verankerung mit dem Zytoskelett auf beide Matrizes und vor allem das Zytoskelett Einfluss nehmen¹³⁸.

Viele dieser oben genannten Proteine sind mit den Hauptkomponenten des Zytoskeletts verbunden und sind für dynamische Prozesse verantwortlich. So wird die Komplexität von α -Aktinin, die sich aus der Vielfalt der Interaktionen und der daraus resultierenden Funktionsbeeinflussung einzelner Proteine ergibt, deutlich.

Wie schon für andere Proteine des Zytoskletts und des Sarkomers beschrieben, so ist auch eine Alteration von α -Aktinin durch Funktionsbeeinträchtigung der assoziierten Proteine im Sinne einer Auf- oder Abregulation durchaus möglich. So zeigten frühere Untersuchungen, dass sarkomerische Proteine wie α -Aktinin und Titin, welche auf Höhe der Z-Scheibe aneinander binden, in erkranktem Myokard gleichermaßen reduziert und desorganisiert vorlagen und bei weiterer Beobachtung völlig verschwanden²⁵. Dies veranschaulicht die durch Interaktion der beiden Proteine hervorgerufenen Auswirkungen auf die strukturellen Veränderungen des kontraktiven Apparates im erkrankten Myokard.

Im Sinne der Assoziation ist aber nicht nur an die interagierenden Proteine zu denken, bei denen eine tatsächliche Bindung zu α -Aktinin besteht, sondern auch an solche mit strukturellen und sequenziellen Ähnlichkeiten, die keine direkte oder indirekte Bindung mit α -Aktinin eingehen.

Untersuchungen verschiedener Gruppen zeigten hier, dass Sequenzvergleiche von α -Aktinin mit Spektrin oder Dystrophin hohe Sequenz- und Strukturhomologien aufwiesen. Es wird vermutet, dass diese Proteine Mitglieder derselben Familie zytoskelettärer Proteine sind^{32,139,140,141}. Somit könnten Mutationen des kodierenden Gens einer Proteinfamilie durch falsche Informationen schon im Verlauf der Transkription oder Translation nur funktionsuntüchtige oder unvollständige Proteine bilden.

Dies wäre auch ein weiterer möglicher Ansatz für die Entstehung des im Northern-Blot detektierten 1,9 kb großen Signals. Hier könnte es sich um ein dem α -Aktinin sequenziell ähnliches Protein handeln, welches durch Genmutation und unzureichende oder gestörten Informationsfluß entstanden ist. Vergleiche mit der Celera-Datenbank zeigten in diesem Fall eine α -Aktinin-/ α -Aktinin- ähnliche RNA von ca. 1,9 kb, welche aber bis jetzt noch nicht näher beschrieben wurde (siehe S.58).

4.6 Krankheitsbedingter Isoformen-„Switch“ im Herz

Ähnlich wie bei den oben beschriebenen Ausbildungen fetaler Isoformen, als Initiator der Erkrankung, verhält es sich hier, nur das in diesem Falle die Erkrankung den auslösenden Faktor für den Isoformen-Wandel darstellt. Bekannt ist, dass ein gewisser Grad an Hypertrophie, hervorgerufen durch eine verstärkte Füllung und zunehmenden Druck der Kammern, sowohl im Vorhof als auch im Ventrikel zu einem Isoformen-„Switch“, führen kann, was in einigen Studien bewiesen wurde^{87,88}. Diese Untersuchungen bezogen sich vor allem auf das Myosin-heavy-chain (MHC). So wurde hier im menschlichen Herzen, welches normalerweise β -MHC (adulte Form; embryonal = alpha) ausbildet, als Antwort auf einen erhöhten Druck im Ventrikel ein Isoformen-Wechsel zu α -MHC vorgefunden. Jedoch wurden beide Isoformen weiterhin in unterschiedlicher Intensität produziert, in diesem Fall zu Gunsten des α -MHC.

Dieser Vorgang ist im Fall der dilatativen Kardiomyopathie noch nicht bekannt. Doch ist die chronische Herzinsuffizienz im Endstadium die Manifestation einer Gruppe verschiedener Erkrankungen, unter anderem die der dilatativen Kardiomyopathie, welche üblicherweise in unterschiedlichen Stadien von myokardialen Hypertrophien begleitet werden⁸⁹.

Aus diesem Grund ist ein Switch von α -Aktinin-Isoformen ebenso denkbar, vielleicht sogar ausgelöst durch die dilatative Kardiomyopathie selbst.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Gewebeproben aus dem linken Ventrikel von Patienten mit terminaler Linksherzinsuffizienz infolge dilatativer Kardiomyopathie untersucht. Als Kontrollen dienten gesunde, nicht transplantierte Spenderherzen, sowie glattes Muskulaturgewebe aus der linken arteria thoracica interna.

Ziel der Arbeit war es, mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden wie PCR, Northern- und Western-Blot sowie der Immunhistochemie die Expression von verschiedene Isoformen des ubiquitär vorkommenden Proteins α -Aktinin in gesundem und an DCM erkranktem Myokard zu vergleichen.

Untersuchungen mit dem konfokalen Mikroskop in der Immunhistochemie zeigten bei den Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie Akkumulationen des nicht sarkomerischen α -Aktinin-1 im sarkoplasmatischen Retikulum von Kardiomyocyten.

Mit dem Western-Blot konnten wir die Resultate der immunhistologischen Untersuchungen lokal auf Proteinebene bestätigen. Sie zeigten, den Akkumulationen entsprechend, eine deutliche Überexpression der nicht sarkomerischen α -Aktinin-1 Isoform (AK: BM 75.2) in den Herzmuskelgeweben der an DCM erkrankten Patienten im Gegensatz zu den Kontrollherzen. Auch die Kontrollen der glatten Muskulatur zeigten hier ein deutliches Signal, was für die Spezifität des Antikörpers spricht. Jedoch blieb eine entsprechende Bestätigung auf mRNA-Ebene, wie im Folgenden beschrieben, mit einer vergleichbaren Überexpression aus.

Ähnlich verhielt es sich bei α -Aktinin-4 im Western-Blot. Zwar waren dezente Signalunterschiede zwischen Patientengeweben und Kontrollen zu erkennen, welche aber nicht als signifikant einzustufen waren. Die glatten Muskulatur-Kontrollen zeigten kein Signal.

Der sarkomerische Antikörper (EA-53) produzierte, mit Ausnahme der Kontrollen für glatte Muskulatur, in allen Herzgeweben ein deutliches Signal.

Zusammenfassend zeigte somit nur die nicht sarkomerische α -Aktinin-1 Isoform (AK: BM 75.2) ein unerwartetes aber spezifisches und richtungweisendes Signal als Hinweis eines defekten Proteinkatabolismus.

Unter den Northern-Blot-Analysen zeigten die cDNA Sonden für α -Aktinin-1 und 2 die erwarteten 3,5 kb großen isoformenspezifische Signale, die jedoch keine Differenzen zwischen Kontrollherzen und DCM-Patienten aufwiesen.

α -Aktinin -3 und 4 konnten mit den cDNA Sonden als auch später mit den spezifischen Oligonukleotiden nicht detektiert werden.

Für α -Aktinin-1 verwendeten wir, aufgrund der ungewöhnlichen Ergebnisse im Western-Blot und der Immunhistochemie, drei spezifische Oligonukleotide aus unterschiedlichen Bereichen des RNA. Auch diese zeigten in allen drei Fällen das erwartete 3,5 kb große Signal sowohl in den Herzwegen ohne Unterschied zwischen den beiden Untersuchungsgruppen als auch bei der glatten Muskulatur, so dass die Veränderungen der Expression beziehungsweise die Akkumulation des α -Aktinin-1 einer Störung der Translation zugeschrieben werden müssen. Darüber hinaus konnte zu diesem Signal zusätzlich eine weitere Bande bei 1,9 kb detektiert werden. Diese trat bei allen drei α -Aktinin-1-spezifischen Oligonukleotiden auf. Auch nachdem stringente Waschprozeduren der Membran durchgeführt worden waren, um ein unspezifisches Signal auszuschließen, war diese Signal noch deutlich abgrenzbar. Auch die Oligonukleotide für α -Aktinin-2 zeigten wieder das erwartete 3,5 kb große Signal in den Herzwegen.

Resümierend ist festzustellen, dass es weder unter Verwendung der cDNA-Sonden (ACNT1-4), noch unter der der Oligonukleotide (ACTN1-4) zu deutlichen Expressionsunterschieden zwischen den zu vergleichenden Geweben kam. Somit ist lediglich für α -Aktinin-1 lokal auf Proteinebene ein pathologischer Regulationsmechanismus bei kumulativer Expression festzustellen.

Um unsererseits die Spezifität der Oligonukleotide nochmals zu überprüfen und darüber hinaus die detektierte 1,9 kb Bande zu analysieren, führten wir Sequenzanalysen mittels einer PCR durch. Als Oligonukleotid-Primer benutzten wir die α -Aktinin-1 spezifischen Oligonukleotide. Die hier entstandenen Produkte wurden ohne Ausnahmen als α -Aktinin-1/ α -Aktinin-1-ähnliche mRNA identifiziert.

Unklar bleibt, ob es sich bei diesem Produkt um das Ergebnis eines Splicing-Vorganges handelt oder ob es ein dem α -Aktinin verwandtes Protein ist, welches bis jetzt noch nicht identifiziert werden konnte.

Darüber hinaus besteht weiterhin die Frage nach der Lokalisation und dem tatsächlichen Ursprung beziehungsweise dem auslösenden Mechanismus, der zu einer gestörten Translation oder dem Splicing führt.

Schlussfolgerung

1. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit geht hervor, dass die Überexpression einer für das Herz untypischen Isoform, in dem Fall α -Aktinin-1, bei dilatativer Kardiomyopathie reproduzierbar nachzuweisen ist. Diese reproduzierbaren Akkumulationen in der Immunhistochemie sowie die deutlichen Signale im Western-Blot mit den signifikanten Unterschieden zwischen den Kontrollgruppen zeigen eine gestörte Translation der glatten-Muskulatur-spezifischen- α -Aktinin Isoform.
2. Auf der Grundlage der vorliegenden Ergebnisse bei unverändertem Transkriptionslevel im Northern-Blot und eindeutigen Veränderungen auf Proteinebene wird angenommen, dass eine gestörte Translation sowie die folgende intrazelluläre Akkumulation in Kardiomyozyten einen defekten Proteinkatabolismus repräsentiert. Dieser führt zu zellulären Dysfunktionen und letztendlich zur Herzerkrankung. Diese Dysfunktionen haben insbesondere Auswirkungen auf den kontraktilem Apparat des Herzmuskels und scheinen im Endstadium signifikant detektierbar zu sein. Möglicherweise können diese Proteinveränderungen in Zukunft als Marker einer progredienten Herzerkrankung genutzt werden.
3. Wegen der uneinheitlichen Entstehungsgenese der dilatativen Kardiomyopathie und den multiplen Interaktionen zwischen den α -Aktinin assoziierten Proteinen sowie der intra- und extrazellulären Matrix ist auch für die gestörte Translation und die Akkumulation des α -Aktinins-1 im Kardiomyozyten eine multifaktorielle Kombination von Ursachen anzunehmen .

VI. Summary

Differential Expression of α -Aktinin Isoforms in human myocardium at patients with Dilated Cardiomyopathie (DCM)

Confocal microscopic studies in human explanted hearts with DCM showed an accumulation of non-sarcomeric α -actinin (ACTN1) in the sarcoplasmic reticulum of cardiomyocytes. To analyse this phenomenon in more detail, specific oligonucleotides for ACTN-1 (smooth muscle), ACTN-2 (cardiac), ACTN-3 (skeletal) and ACTN-4 (non muscle) were used for Northern-Blot analysis in conjunction with isoform specific antibodies in Western-Blot (non-sarcomeric antibody BM 75.2, sarcomeric antibody EA 53, non-muscle antibody NCC-LU-632).

Furthermore we performed PCR sequencing to verify the used oligonucleotides. We analysed 17 tissue samples from DCM and 4 control hearts.

In Western-Blot analysis we could confirm the results from the immunohistochemical studies.

The non-sarcomeric antibody (BM 75.2) showed a significant overexpression of ACNT-1 in patients with DCM, comparing with the control hearts. The two other antibodies (EA-53 / NCC-LU-632) showed the expected signals without any significant differences between the compared tissues, whereas the smooth muscle controls (left intern thoracic artery) showed no signal by using the non-sarcomeric antibody.

In Northern-Blot analysis ACTN3 and 4 were not detected, neither by cDNA probes, nor by oligonucleotides.

ACTN-1 and ACTN2 was detected by the cDNA probes at 3,5 kb without any visible differences between control and DCM. Because of the unusual results in the immunohistochemical studies we used three different specific oligonucleotides for ACTN1. By hybridisation with these oligonucleotides we detected furthermore a previously unknown 1.9 kb mRNA in addition to the expected 3.5 kb mRNA with all oligonucleotides. However, sequencing of PCR products, generated by the same oligonucleotides, identified only ACTN1 and ACNT-1 similar proteins.

Conclusion: Overexpression of an unusual α -actinin isoform is typical of hearts with DCM. Intracellular accumulation might represent disturbed protein catabolism leading to cellular dysfunction and heart failure.

VII. Literaturverzeichnis

1. Bridgen W. Uncommon myocardial diseases. The noncoronary cardiomyopathies. *Lancet*. 1957;ii:1179-84 & 1243-9.
2. Goodwin JF. Cardiac function in primary myocardial disorders. *Br Med J*. 1964;i:1527-33 & 1595-7
3. Goodwin JF, Oakley CM. The cardiomyopathies. *Brit. Heart J*. 1972;34:545-552
4. Report of the 1995 World Health Organization/ International Society and Federation of Cardiology task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation*. 1996;93:841-842
5. Goodwin JF. The frontiers of cardiomyopathy. *Br Heart J*. 1982;48:1-18
6. Cobet R, Gutzeit K, Bock HE. Kardiomyopathien. *Klinik der Gegenwart*, Teil 2. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore. 1998;IX,1:5-1:21
7. Wigle ED, Sasson Z, Henderson MA, Rudy TD, Fulop J, Rakowski H, Williams WG. Hypertrophic Cardiomyopathie: the importance of the site and the extent of hypertrophy: a review. *Prog. Cardiovasc. Dis*. 1985;28:1-83
8. Seidman CE, McKenna WJ, Watkins HC, Sedman JG. Molecular genetic approaches to diagnostic and management of hypertrophic cardiomyopathie. *Braunwald E, ed. Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine*. New York, NY: WB Saunders Co,1992:77-83
9. Dargie HJ, Goodwin JF. Catecholamines, cardiomyopathies and cardiac function. *Progress in cardiology, P.N Yu, J.F. Goodwin (Eds.)* 1982;11:93-108
10. Goodwin JF. Mechanics in Cardiomyopathies. *J. Mol.Cell. Cardiology*. 1983;175-9
11. Manolio TA, Baughman KL, Rodeheffer R, Pearson TA, Bristow JD, Michels VV, Abelmann WH, Harlan WR. Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy (Summary of a national heart, lung, and blood institute workshop). *Am J Cardiol*. 1992;69:1458-1466
12. Torp A. Incidence of congestive cardiomyopathy *Postgr Med J*. 1987;54:435-437
13. Osterziel KJ, Scheffold T, Pierrot A, Dietz R. Genetik der dilatativen Kardiomyopathie. *Z Kardiol*. 2001;90:461-469

14. Klinik der Gegenwart 48
15. Klinik der Gegenwart 70
16. Ghali JK, MD, Shanes JG, MD. A review of dilated cardiomyopathy. *Comprehensive therapy*. 1987;13(8):46-56
17. Toshima H, Okada R. Current status of dilated cardiomyopathy. *Jap Circulation J*. 1987 ;51 :652-653
18. Keeling PJ, Tracy S. Link between enteroviruses and dilated cardiomyopathy: serological and molecular data. *Br Heart J*. 1994;72:25-29
19. Bachinski LL, PhD, Roberts R, MD. New theories. Causes of dilated cardiomyopathy. *Cardiology Clinics*. 1998;16(4):603-610
20. Mestroni L, MD, Rocco C, MD, Vatta M, PhD, Miodic S, Giacca M, PhD. Advances in molecular genetics of dilated cardiomyopathy. *Cardiology Clinics*. 1998;16(4):611-621
21. Bilinska ZT, Ruzyllo W. Genetic basis of dilated cardiomyopathy. *Newsletter of scientific council on cardiomyopathies*. 1999; 9-11
22. Towbin JA, Bowles NE. Genetic abnormalities responsible for dilated cardiomyopathy. *Curr Cardiol Rep*. 2000;2(5):475-480
23. Hornbostel H, Kaufmann W, Siegenthaler W. *Innere Medizin in Praxis und Klinik*. In vier Bänden. 4. überarbeitete Auflage. Band I: Herz, Gefäße, Atmungsorgane. Thieme Verlag, Stuttgart, New York 19??;1-330-1.335
24. Kostin S, Heling A, Hein S, Scholz D, Klövekorn W, Schaper J. The protein composition of the normal and diseased cardiac myocyte. *Reviews* 1998;2:245-260
25. Hein S, Scheffold T, Schaper J. Ischemia induces early changes to cytoskeletal and contractile proteins in diseased human myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1995;110:89-98
26. Schaper J, Froede R, Hein S, Buck A, Hashizume H, Speiser B, Friedl A, Bleese N. Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1991;83:504-514
27. Hein S, Scholz D, Fujitani N, Rennollet H, Brand T, Friedl A, Schaper J. Altered expression of titin and contractile proteins in failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 1994;26:1291-1306
28. Hein S, Kostin S, Bauer EP, Klövekorn WP, Schaper J. Das Zytoskelett des Kardiomyozyten im normalen und insuffizienten menschlichen Myokard. I Sarkomere und Zytoskelett. *Germ J Cardio-Vasc Med*. 1998;2:7-22
29. Blanchard A, Ohanian V, Critchley D. The structure and function of α -actinin. *J Muscle Res Cell Motil*. 1989;10:280-289

30. Beggs AH, Byers TJ, Knoll JHM, Boyce FM, Bruns GAP, Kunkel LM. Cloning and characterisation of two human skeletal muscle α -actinin genes located on chromosom 1 and 11. *J Biol Chem.* 1992;267:9281-9288
31. Taylor KA, Taylor DW, Schachat F. Isoforms of α -actinin from cardiac, smooth, and skeletal muscle form polar arrays of actin filaments. *J Cell Biol.* 2000;149:635-645
32. Baron M.D., Davison M.D., Jones P, Critchley D.R. The sequence of chick α -actinin reveals homologies to spectrin and calmodulin. *J Biol Chem.* 1987;262:17623-29
33. Baron, M.D., Davison, M.D., Jones P, Patel B, Critchley, D.R. Isolation and characterisation of cDNA encoding a chick α -actinin. *J Biol Chem* 1987;262:2258-61
34. Honda K, Yamada T, Endo R, Ino Y, Gotoh M, Tsuda H, Yamada Y, Chiba H, Hirohashi S. Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J Cell Biol.* 1998;140:1383-93
35. Bennet JP, Zaner K, Stossell TP. Isolation and some properties of macrophage alpha-actinin. *Biochem.* 1984;23:5081-5086
36. Burridge K, Feramisco JR. Non muscle α -actinins are calcium sensitive actin binding proteins. *Nature* 1981;294:565-7
37. Burridge K, Feramisco JR. α -actinin and vinculin from non-muscle cells: calcium sensitive interactions with actin. *Cold Spring Harbor Symposium* 1982;46:587-97
38. Papa I et al.. α -actinin-CapZ, an anchoring complex for thin filaments in Z-line. *Journal of Muscle Research Cell Motility.* 1999;20:187-97
39. Sorimachi H, Freiburg A, Kolmerer B, Ishiura S, Stier G, Gregorio CC, Labeit D, Linke WA, Suzuki K, Labeit S. Tissue-specific expression and α -actinin binding properties of the Z-disc titin: implications for the nature of the vertebrate Z-disc. *Journal of Molecular Biology.* 1997;270:688-695.
40. Young P, Ferguson C, Banuelos S, Gautel M. Molecular structure of the sarcomeric Z-disc: two types of titin interactions lead to an asymmetrical sorting of α -actinin. *EMBO Journal.* 1998;17:1614-24
41. Sanger JM, Mittal B, Pochapin MB, Sanger JW. Myofibrillogenesis in living cells microinjected with fluorescently labeled α -actinin. *Journal of Cell Biology.* 1986;102:2053-66.
42. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: Laboratory manuel.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1998
43. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Current protocols in molecular biology.* Current protocols; 1993.
44. Chomzynski P, Sacchi N: Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-159

45. Leonard GB, Dibner MD, Battery JF. Basic methods in molecular biology. New York: Elsevier Science Publ. Co., Inc.;1986
46. Lathe J. Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data. Theoretical and practical considerations. *J Mol Biol.* 1985;183:1-12
47. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl- paper and hybridisation with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977;74:5350-5354
48. Vosberg HP. The polymerase chain reaction: an improved method for the analysis of nucleic acids. *Hum Gen.* 1989;83:1-15
49. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR Protocols: A guide to methods and applications. *Academic Press, N.Y.*, 1990
50. Scharf SJ, Horn GT, Erlich HA. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science.* 1988;233:1076-1078

ERGEBNISSE:

51. Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O. Ribosomal 18S RNA prevails over Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and β -Actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal Biochem.* 2001;295:17-21
52. Yang J, Moravec CS, Sussman MA, DiPaola N, Fu D, Hawthorn L, Mitchell CA, Young JB, Francis GS, McCarthy MP, Bond M. Decreased SLIM1 expression and increased gelsolin expression in failing human hearts measured by high-density oligonucleotide arrays. *Circulation.* 2000;102:3046-3052

DISKUSSION:

53. Swynghedauw B. Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles. *Physiol Rev.* 1986;66:710-711
54. Obinata T, Maruyama K, Suigita H. Dynamic aspects of structural proteins in vertebrate skeletal muscle. *Muscle Nerv.* 1981;4:456-457
55. Emerson C, Fischman DA, Nadal-Ginard B, Siddiqui MA. Molecular biology of muscle development. *UCLA Symposia on molecular and cellular biology.* 1986;New Series,29
56. Hein S, Schaper Jutta. The cytoskeleton of cardiomyocytes is altered in the failing human heart. *Heart Failure.* 1996;12(3):128-132
57. Albelda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* 1990;4:2868-2880
58. Belkin AM, Koteliansky VE. Interaction of iodinated vinculin, metavinculin and α -actinin with cytoskeletal proteins. *FEBS Lett.* 1987;220:291-294

59. Burridge K, Fath K. Focalcontacts: transmembrane links between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *BioEssays*. 1989;10:104-108.
60. Geiger B, Volk T, Volberg T, Bendori R. Molecular interactions in adherens-type contacts. *J Cell Sci*. 1987;8:251-272
61. Simpson D, Decker R. The cardiac cytoskeleton: functional integration of the contractile apparatus. *Heart Failure*. 1992;208(3):559-572.
62. Schaper J, Speiser B, Brand T. The cytoskeleton and extracellular matrix in human hearts with dilated cardiomyopathie. In Figulla HR, Kandolf R, McManus B, eds. *Idiopathic Dilated Cardiomyopathy*. Berlin, Germany: Springer-Verlag.1993;260:75-80
63. Heling A, Zimmermann R, Kostin S, Maeno Y, Hein S, Devaux B, Bauer E, Klövekorn WP, Schlepper M, Schaper W, Schaper J. Increased expression of cytoskeletal, linkage, and extracellular proteins in failing human myocardium. *Circ Res*. 2000;86:846-853.
64. Tsutsui H, Ishihara K, Cooper G. Cytoskeletal role for contractile dysfunction of hypertrophied myocardium. *Science*. 1993;260:682-687.
65. Tsutsui H, Tagawa H, Kent RL, McCollam PL, Ishihara K, Nagatsu M, Cooper G. Role of microtubules in contractile dysfunction of hypertrophied cardiocytes. *Circulation*. 1994;90:533-555
66. Tagawa H, Koide M, Sato H, Zile MR, Carabello BA, Cooper G. Cytoskeletal role in transition from compensated to decompensated hypertrophy during adult canine left ventricular pressure overloading. *Circ Res*. 1998; 82:751-761
67. Tagawa H, Koide M, Sato I, Cooper G. Cytoskeletal role in the contractile dysfunction of cardiocytes from hypertrophied and failing right ventricular myocardium. *Proc Assoc Am Physicians*. 1996;108:218-229
68. Tagawa H, Rozich JD, Tsutsui H, Narishige T, Kuppuswamy D, Sato H, McDermott PJ, Koide M, Cooper G. Basis for increased microtubules in pressure-hypertrophied cardiocytes. *Circulation*. 1996;93:1230-1243
69. Tagawa H, Wang N, Narishige T, Ingber DE, Zile MR, Cooper G. Cytoskeletal mechanics in pressure-overload cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 1997;80:281-289
70. Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, Correia LA, Tong HQ, Mathis BJ, Pérez JC, Allen PG, Beggs AH, Pollak MR. Mutations in ACTN4, encoding α -actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nature Genetics* 2000;24:251-56
71. Duhaiman AS, Bamberg JR. Isolation of brain alpha actinin. *Biochem*. 1984;23:1600-1608
72. Imamura M, Endo T, Kuroda M, Tanaka T, Masaki T. Substructure and higher structure of chicken smooth muscle alpha-actinin molecule. *J Biol Chem*. 1988;263:7800-7805.
73. Landon F, Gache Y, Touitou H, Olomucki A. Properties of two isoforms of human blood platelet alpha-actinins. *Eur J Biochem*. 1985;153:231-237.

74. Endo T, Masaki T. Differential expression and distribution of chicken skeletal and smooth muscle alpha-actinins during myogenesis in culture. *J Cell Biol.* 1984;99:2322-2332.
75. Jockusch B, Isenberg G. Interactions of α -actinin and vinculin with actin: opposite effects on filament network formation. *Proc Natl Acad Sci.* 1981;78(5):3005-3009
76. Luna E, Hitt A. Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science.* 1992;258:955-964
77. Mimura N, Asano A. Further characterization of a conserved actin binding domain 27kDa fragment of actinogelin and alpha-actinins and mapping of their binding sites on the actin molecules by chemical cross-linking. *J Biol Chem.* 1987;262:4717-4723.
78. Price M. Striated muscle endosarcomeric and exosarcomeric lattices. *Advances in Structural Biology.* 1991;1:175-207.
79. Small J, Fürst D, Thornell L. Review: The cytoskeletal lattice of muscle cells. *Eur J Biochem.* 1992;208(3):559-572.
80. Wachsstock DH, Wilkins JA, Lin S. Specific interaction of vinculin with alpha-actinin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;146:554-560.
81. Breitbart RE, Andreadis A, Nadal-Ginard B. Alternative splicing: A ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. *Annu Rev Biochem.* 1987; 56:467-468.
82. Smith CW, Patton JG, Nadal-Ginard B. Alternative splicing in the control of gene expression. *Ann Rev Gen.* 1998;23:527-577.
83. Lees-Miller JP, Goodwin LO, Helfman DM. Three novel brain tropomyosin isoforms are expressed from the rat α -tropomyosin gene through the use of alternative promoters and alternative RNA processing. *Mol Cell Biol.* 1990;10:1729-1742.
84. Maeda M, Holder E, Lowes B, Valent S, Bies RD. Dilated Cardiomyopathie associated with deficiency of the cytoskeletal protein Metavinculin. *Circulation.* 1997;95:17-20.
85. Kedes LH, Stockdale FE. (eds):UCLA Symposia on molecular and cellular biology of muscle development. New York. Liss AR. 1989.
86. Stiles GL, Lefkowitz RJ. Cardiac adrenergic receptors. *Annu Rev Med.* 1984;35:149-150
87. Izumao S, Lompre AM, Matsuoka R. Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy . Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals. *J Clin Invest* 1989;79:970-971.
88. Mercadier JJ, Bouveret P, Gorza L. Myosin isoenzymes in normal and hypertrophied human ventricular myocardium. *Circ Res.* 1987;53:52-53.

89. Braunwald E. Pathophysiology of heart failure. In: Braunwald E, ed. *Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. Philadelphia, Pa: WB Saunders Co Inc; 1980:453-483.
90. Izumo S, Mahdavi V, Nadal-Ginard B. Proto-oncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1988;85:339
91. Schwartz K, Lompre AM, Bouveret P. Accumulation of skeletal actin mRNA in experimental cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 1985;17(Suppl.3):abstract 22.
92. Reiser PJ, Portman MA, Ning XH, Schomisch-Moravec C. Human cardiac myosin heavy chain isoforms in fetal and failing adult atria and ventricles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280:1814-1820.
93. Bea F, Bär H, Watson L, Blessing E, Kübler W, Kreuzer J, Jahn L. Cardiac α -actin in smooth muscle cells: detection in umbilical cord vessels and in atherosclerotic lesions. *Basic Res Cardiol.* 2000;95:106-113.
94. Hirzel HO, Tuckschmidt CR, Schneider J. Relationship between myosin isoenzym composition, hemodynamics and myocardial structure in various forms of human cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 1985;57:729.
95. Cantley LC. Structure and mechanism of the (Na,K)-ATPase. *Curr Top Bioenergetics.* 1981;11:201.
96. Grünig E, Tasman JA, Kücherer H, Franz W, Kübler W, Katus HA. Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31:186-194.
97. Keeling PJ, Gang Y, Smith G, Seo H, Bent SE, Caforio ALP, McKenna WJ. Familial dilated cardiomyopathy in the United Kingdom. *Br Heart J.* 1995;73:417-421.
98. Mestroni L, Rocco CH, Gregori D, Singara G, DiLenarda A, Miocic S, Vatta M, Pinamonti B, Muntoni F, Caforio ALP, McKenna WJ, Falaschi A, Giacca M, Camerini F. 1999;34:181-190
99. Michels VV, Moll PP, Miller FA, Tajik J, Chu JS, Driscoll DJ, Burnett JC, Rodeheffer RJ, Chesebro JH, Tazelaar H. The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patient with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1992;326:77-82.
100. Cox GF, Kunkel LM. Dystrophies and heart disease. *Curr Opin Cardiol.* 1997;12(3):329-343.
101. Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, Tai YS, Keating MT. Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science.* 1998;280:750-752.

102. Tesson F, Sylvius N, Pilotto A, Dubosq-Bidot L, Peuchmaurd M, Bouchier C, Benaiche A, Mangin L, Charron P, Gavazzi A, Tavazzi L, Arbustini E, Komajda M. Epidemiology of desmin and cardiac actin gene mutations in a european population of dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2000;21:1872-1876.
103. Li D, Tapscoft T, Gonzalez O, Burch PE, Quinones MA, Zoghbi WA, Hill R, Bachinski LL, Mann DL, Roberts R. Desmin mutations responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1999;100:461-464.
104. Raffaele Di Barletta M, Ricci E, Galuzzi G, Tonali P, Mora M, Morandi L, Romorini A, Voit T, Orstavik KH, Merlini L, Trevisan C, Biancalana V, Housmanowa-Petrusewicz I, Bione S, Ricotti R, Schwartz K, Bonne G, Toniolo D. Different mutations in the LMNA gene cause autosomal dominant and autosomal recessive emery-dreifuss muscular dystrophy. *Am J Hum Genet*. 2000;66:1407-1412.
105. Fatkin D, MacRae C, Sasaki T, Wolff MR, Porcu M, Frenneaux M, Atherton J, Vidaillet HJ, Spudich S, De Girolami U, Seidman JG, Seidman CE. 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*. 1999;341:1715-1724.
106. Tsubata S, Bowles KR, Vatta M, Zintz C, Titus J, Muhonen L, Bowles NE, Towbin JA. Mutations in the human delta-sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 2000;106:655-662.
107. Kamisago M, Sharma SD, DePalma SR, Solomon S, Sharma P, McDonough B, Smoot L, Mullen MP, Woolf PK, Wigle ED, Seidman JG, Seidman CE, Jarcho J, Shapiro LR. Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2000;7:1688-1696.
108. Bowles NE, Bowles KR, Towbin JA. The "Common Final Pathway" Hypothesis and inherited cardiovascular Disease. *Herz/Urban&Vogel*. 2000;25(3):168-175.
109. Ohlendieck R. Towards an understanding of the dystrophin-glycoprotein complex: linkage between the extracellular matrix and the membrane cytoskeleton in muscle fibers. *Eur J Cell Biol*. 1996;69:1-10.
110. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organisation of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*. 1987;50:609-617.
111. Ahn Ah, Kunkel LM. The structure and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet*. 1993;72:349-360.
112. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*. 1988;53:219-228.

113. Byers TJ, Husain-Chishti A, Dubreuil RR, Branton D, Goldstein LSB. Sequence similarity of the amino-terminal domain of Drosophila beta-spectrin to alpha-actinin and dystrophin. *J Cell Biol.* 1998;109:1633-1641.
114. Youssoufian H, McAfee M, Kwiatkowski DJ. Cloning and chromosomal localization of the human cytoskeletal α -actinin gene reveals linkage to the β -spectrin gene.
115. Durand JB, Bchinski LL, Bieling LC. Localization of a gene responsible for familial dilated cardiomyopathy to chromosome 1q32. *Circulation.* 1995;92:3387-3389.
116. Siu BL, Niimura H, Osborne JA. Familial dilated cardiomyopathy locus maps to chromosome 2q31. *Circulation.* 1999;99:1022-1026.
117. Jung M, Poepping I, Perrot A, Ellmer AE, Wienker TF, Dietz R, Reis A, Osterziel KJ. Investigation of a family with autosomal dominant dilated cardiomyopathy defines a novel locus on chromosome 2q14-22. *Am J Hum Genet.* 1999;65:1068-1077.
118. Krajcinovic M, Pinamonti B, Singara G. Linkage of familial dilated cardiomyopathy to chromosome 9. Heart Muscle Disease Study Group. *Am J Hum Genet.* 1995;57:846-852.
119. Bowles KR, Gajarski R, Porter P. Gene mapping of familial autosomal dominant dilated cardiomyopathy to chromosome 10q21-23. *Clin Invest.* 1996;98:1355-1360.
120. Marin-Garcia J, Goldenthal MJ, Ananthakrishnan R, Pierpont ME. The complete sequence of mtDNA genes in idiopathic dilated cardiomyopathy shows novel missense and tRNA mutations. *J Card Fail.* 2000;6(4):321-329.
121. Goebel HH, Piirsoo A, Werlo I et al.: Infantile intranuclear rod myopathy. *J Child Neurol.* 1997; 12/1:22-30
122. Kass S., MacRae C, Graber HL, Sparks EA, McNamara D, Boudoulas H, et al.: A gene defect that causes conductin System disease and dilated cardiomyopathy maps to chromosome 1p1-1q1. *Nat. Genet.* 1994;7(4): 546-551.
123. Chien KR.: Genomic circuits and the integrative biology of cardiac diseases. *Nature* 2000;407(6801): 227-232.
124. Hoshijima M, Chien KR.: Mixed signals in heart failure: cancer rules. *J Clin. Invest.* 2002;109(7): 849-855.
125. Mogensen J, Kubo T, Duque M, Uribe W, Shaw A, Murphy R et al.: Idiopathic restrictive cardiomyopathy is part of the clinical expression of cardiac troponin I mutations. *J. Clin. Invest.* 2003;111(2): 209-216.
126. Olson TM, Keating MT.: Mapping a cardiomyopathy locus to chromosome 3p22-p25. *J. Clin. Invest.* 1996;97(2): 528-532.

127. Chien KR: Stress pathways and heart failure. *Cell* 1999;98(5): 555-558.
128. Minamisawa S, Hoshijima M, Chu G, Ward CA, Frank K, Gu Y, et al.: Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interactions is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. *Cell* 1999;99(3): 313-322.
129. Suzuki M, Carlson KM, Marchuk DA, Rockman HA: Genetic modifier loci affecting survival and cardiac function in murine dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2002;105(15): 1824-1829.
130. Caceras JF, Kornblihtt AR: Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends in Genetics* 2002; Vol 18: 186-192.
131. Dralyuk I, Brudno M, Gelfand MS, Zorn M, Dubchak I.: References to alternative splicing. *Nucleic acid research*. 1999/2000; Bd. 27: 301, Bd.28:296-297.
132. Wu JY. Pre mRNA splicing and regulation of alternative splicing, Alzheimer`s disease: molecular pathogenesis, vertebrate neural development, apoptose. University school of medicine. 2002 unter: <http://research.medicine.wustl.edu/ocfr/Research.nsf/Abstracts>.
133. Charlet MB, Savkur RS, Singh G, Philips AV, Grice EA, Cooper TA. Loss of the muscle specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Molecular Cell*. 2002; 10: 45-53
134. Mankodi A, Takahashi MP, Jiang H, Beck CL, Bowers WJ, Moxely RT, Cannon SC, Thornton CA. Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Molecular Cell*. 2002;10: 35-43.
135. Tyler J. Misstep in protein formation causes disorder in myotonic dystrophy. 2002 unter: <http://public.bcm.tmc.edu/pa/mytonicdys.htm>
136. Tulzer G. Physiologie und Pathophysiologie der fetalen Zirkulation. *Kinderzentrum Linz, Department für Pränatalmedizin*. 2002. unter www.kinderzentrum.at.
137. Deutsche Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdrucks e.V. *Hochdruck und Herz*. 1998; 1: 1-2
138. Sampath R, Gallagher PJ, Pavalko F. Cytoskeletal interactions with the leukocyte integrin $\beta 2$ cytoplasmic tail. Activation-dependent regulation of associations with talin and α -actinin. *J. Biol. Chem*. 1998;273: 33588-33594.
139. Wasenius VM, Narvanen O, Letho VP, Saraste M. α -Aktinin and spectrin have common structure domains. *FEBS Lett*. 1987; 221: 73-76.
140. Hammond RG. Protein sequence of DMD gene is related to actin binding domain of α -Aktinin. *Cell*. 1987;51: 1.
141. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystropin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*. 1988;53: 219-228.

- 142 Jarosch E., Lenk U., Sommer T. Endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Int Rev Cytol.* 2003;223: 39-81.
- 143 Jarosch E., Geiss-Friedlander R., Meusser B, Walter J., Sommer T. Protein Dislocation from the Endoplasmic Reticulum- Pulling out the Suspect. *Traffic* 2002,3: 530-536
- 144 Ellgaard L., Helenius A. ER quality control: Towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13: 431-437.
- 145 Jakob CA., Burda P., Roth J., Aebi M. Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is terminated by a specific oligosaccharide structure. *J Cell Biol* 1998;142: 1223-1233.
- 146 Bross P, Corydon TJ., Andresen BS, Jorgensen MM., Bolund L, Gregersen N. Protein Misfolding and Degradation in Genetic Diseases. *Human Mutation* 1999;14: 186-198.
- 147 Elkabetz Y., Shapira I., Rabinovich E., Bar-Nun S. Distinct steps in dislocation of luminal endoplasmic reticulum-associated degradation substrates: roles of endoplasmic-bound p97/Cdc48p and proteasome. *J Biol Chem* 2004; 279(6): 3980-3989.
- 148 McCracken AA., Brodsky JL. Evolving questions and paradigm shifts in endoplasmic-reticulum-associated degradation (ERAD). *Bioessays* 2003;25(9): 868-877.
- 149 Hamada H, Suzuki M, Yuasa S, Mimura N, Shinozuka N, Takada Y, Nishino T, Nakaya H, Koseki H, Aoe T. Dilated Cardiomyopathy caused by aberrant endoplasmic reticulum quality control in mutant KDEL receptor transgenic mice. *Mol Cell Biol* 2004;24(18): 8007-17.
- 150 Subramanian SV, Kelm RJ, Polikandriotis JA, Orosz CG, Strauch AR. Reprogramming of vascular smooth muscle alpha-actin gene expression as an early indicator of dysfunctional remodeling. *Cardiovasc Res* 2002;54(3): 492-494.
- 151 Frangogiannis NG, Shimoni S, Chang SM, Ren G, Dewald O, Gersch C, Shan K, Aggeli C, Reardon M, Letsou GV, Espada R, Ramchandani M, Entman ML, Zoghbi WA. Active interstitial remodelling: an important process in the hibernating human myocardium. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39(9): 1468-1474.
- 152 Zhang J, Liu W, Yan P. The expression of proliferating cell nuclear antigen and alpha smooth muscle actin in papillary muscle of the patient with rheumatic heart disease and its significance. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 1998;78(5):337-9.

VIII. Lebenslauf

Persönliche Informationen

Name: Tim Michael Block

Geburtsdatum: 19.06.1976

Geburtsort: Ehringshausen

Ehefrau: Frauke Stiller, Richterin am Amtsgericht Frankfurt am Main

Eltern: Dr. Jürgen Block, Arzt der Allgemeinmedizin,
verstorben im Dezember 1991.
Ursula Block, geb. Bender, Lehrerin an der Gesamtschule
Ehringshausen.

Geschwister: Alexander Block
Assistenzarzt der Inneren Medizin an der Asklepios Klinik Lich

Familienstand: verheiratet

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung

Schulbildung: - 1982 - 1986 Grundschule Werdorf
- 1986 - 1992 Gesamtschule Ehringshausen
- 1992 - 1995 Gymnasiale Oberstufe, Goethe-Schule Wetzlar
- 1995 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

08/95 - 09/96 Zivildienst beim Rettungsdienst des
Deutschen Roten Kreuzes mit Ausbildung zum Rettungssanitäter.

Studium

WS 1996/97 - Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Justus-Liebig-Universität Giessen

08/98	Physikum
08/99	1. Staatsexamen
04/02	2. Staatsexamen
05/03	3. Staatsexamen

Berufstätigkeit

06/03 Arzt im Praktikum im Kreiskrankenhaus Schotten, Innere Abteilung unter der Leitung
von Priv. Doz. Dr. M Graubner

IX. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Wolfgang Schaper und insbesondere auch Prof. Dr. Jutta Schaper sowie Dr. Rène Zimmermann und Dr. Stefan Hein, zum einen für die Überlassung des Themas und zum anderen für die zahlreichen inhaltlichen Anregungen, für die ständige Diskussionsbereitschaft, die konstruktive Kritik sowie für die professionelle aber auch nette und persönliche Betreuung.

Weiterhin möchte ich mich dafür bedanken, dass mir die Möglichkeit geboten wurde, mich sowohl sprachlich als auch persönlich weiterzubilden, und für die nicht selbstverständliche Möglichkeit der Beteiligung an Posterpräsentationen im Ausland, die mir zahlreiche positive Erfahrungen bescherte.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Molekularbiologie und Immunhistochemie danke ich für die schöne Arbeitsatmosphäre und die ständige Unterstützung bei den Laborarbeiten. Insbesondere möchte ich mich an dieser Stelle bei Claudia Ullmann, Elfriede Neubauer, Marianne Kranz, Beate Grohmann, Kerstin Böngler und Stefanie Böhm für das nette Miteinander, die tatkräftige Unterstützung sowie die permanente Hilfsbereitschaft zur Lösung vieler Probleme bedanken.

Gerd Stämmler danke ich für die vielen wertvollen Tipps, die Geduld bei wiederholtem Nachfragen zu Problemen im EDV-Bereich, für die großartige Mithilfe bei der Erstellung von Postern und dieser Arbeit sowie die Bereitschaft, bei der graphischen Gestaltung auftretende Schwierigkeiten zu überwinden.

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.