

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

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Die Rolle von Titin in der Sarkomerogenese Untersuchungen an adulten Kardiomyozyten der Ratte in Langzeitkultur

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Veronika Person

Gießen 2000

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

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. I. Käufer-Weiss

Die Rolle von Titin in der Sarkomerogenese Untersuchungen an adulten Kardiomyozyten der Ratte in Langzeitkultur

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Veronika Person
Tierärztin aus Ringsheim (Baden-Württemberg)

Gießen 2000

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

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

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

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. I. Käufer-Weiss

Tag der mündlichen Prüfung: 27. November 2000

für meine Eltern und meinen Freund Bernhard

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. LITERATURÜBERSICHT	3
1. Struktur eines Sarkomers	3
1.1 Aufbau des Z-Streifens	6
1.2 Aufbau der M-Bande	7
2. Kontraktile und sarkomere Proteine	8
2.1 Titin	8
2.2 α -Aktinin	13
2.3 Myomesin	13
2.4 Aktin	14
2.5 Myosin	15
3. Sarkomerogenesemodelle	17
3.1 <i>In vitro</i> Studien	17
3.2 <i>In vivo</i> Studien	18
III. MATERIAL UND METHODEN	20
1. Isolierung adulter Kardiomyozyten der Ratte	20
1.1 Material	20
1.1.1 Versuchstiere	20
1.1.2 Langendorff-Perfusionsapparatur	20
1.1.3 Instrumente	21
1.1.4 Puffer	21
1.2 Methoden	23
1.2.1 Operationstechnik	23
1.2.2 Retrograde Herzperfusion	23
1.2.3 Zerschneiden des Herzens und Filtration der Zellsuspension	24

	Seite
1.2.4 Zentrifugation mit Dichtegradient	25
2. Primärkultur	25
2.1 Material	25
2.1.1 Zellen	25
2.1.2 Medium	26
2.1.3 Objektträger für die Zellkultur	26
2.1.4 Lamininbeschichtung	26
2.2 Methoden	26
2.2.1 Zellkultur	26
2.2.2 Mediumwechsel	26
3. Quantitative Analyse zellulärer Phänotypen	27
3.1 Material	27
3.1.1 Zellen	27
3.1.2 Mikroskope	27
3.1.3 Antikörper	27
3.2 Methoden	28
3.2.1 Zellkultur über einen Zeitraum von 28 Tagen	28
3.2.2 Immunzytochemie	28
3.2.3 Quantitative Analyse	28
3.2.4 Konfokale Mikroskopie zur Beurteilung der De- und Redifferenzierung	29
4. Antisense-Oligodesoxynukleotid-Experimente	29
4.1 Material	30
4.1.1 Zellen	30
4.1.2 Phosphorothioat-Oligodesoxynukleotide (S-ODN)	30
4.1.2.1 Fluorescein-markierte S-ODN	34
4.1.2.2 Fluorescein- und Cholesterol-gekoppelte S-ODN	34
4.1.3 Antikörper	34
4.1.4 Mikroskope und Bildverarbeitung	35

	Seite
4.2 Methoden	35
4.2.1 Versuchsprotokoll der S-ODN-Experimente	35
4.2.2 Immunzytochemie	36
4.2.2.1 Experimente mit markierten S-ODN	36
4.2.2.2 Experimente mit unmarkierten S-ODN	36
4.2.3 Konfokale Lasermikroskopie und Bildverarbeitung	37
4.2.4 Quantitative Analyse der Fläche der Myosinquerstreifung zur Gesamzellfläche	37
4.2.4.1 Quantitative Analyse der Gesamzellflächen	38
5. Immunzytochemie	38
5.1 Material	38
5.1.1 Antikörper	38
5.1.1.1 Primäre Antikörper	38
5.1.1.2 Sekundäre Antikörper	39
5.1.1.3 Detektionssystem bei biotinylierten Sekundärantikörpern	39
5.1.1.4 Puffer	40
5.2 Methoden	40
5.2.1 Färbeprotokoll	41
6. Konfokale Lasermikroskopie und Bildverarbeitung	43
6.1 Material	43
6.1.1 Konfokale Lasermikroskope	43
6.1.2 Computereinheit zur Bildverarbeitung	43
6.2 Methoden	44
6.2.1 Erklärung des konfokalen Prinzips	44
6.2.2 Dreidimensionale Bildverarbeitung	45
IV. ERGEBNISSE	46
1. Analyse der Phänotypen und des sarkomeren Musters	46
1.1 Quantitative Analyse	46
1.2 Sarkomerogenese	51

	Seite
1.3 Kontraktilität	58
2. Antisense-Oligodesoxynukleotid-Experimente	59
2.1 S-ODN-Aufnahme	59
2.1.1 Fluorescein-markierte S-ODN	59
2.1.2 Fluorescein- und Cholesterol-gekoppelte S-ODN	59
2.2 Auswirkungen der Transfektion	59
2.2.1 Einfluß auf das Verhalten von α -Aktinin und F-Aktin	59
2.2.2 Einfluß auf das Verhalten von F-Aktin	61
2.2.3 Einfluß auf die Titinexpression	61
2.2.4 Einfluß auf die Inkorporation der Myosinfilamente in die Sarkomeren	61
2.3 Quantitative Analyse der Fläche quergestreiften Myosins zur Gesamtzellfläche	64
2.4 Auswirkungen auf die Kontraktilität der Zellen	64
2.5 Quantitative Analyse der Zellflächen	67
3. Zusammenfassung der Ergebnisse	67
V. DISKUSSION	69
1. Redifferenzierungsmodell von ARC in Langzeitkultur	69
1.1 Zwei Methoden der Kultur von ARC	69
1.2 Vorteile und Nachteile der Langzeitkultur von ARC	71
1.3 Vergleich der <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> Studien	72
1.4 Phänotypen von ARC	73
2. Sarkomerogenese	73
2.1 Titin und α -Aktinin	74
2.2 F-Aktin	75
2.3 Myosin und Myomesin	76

	Seite
3. Hemmung der Titinexpression	78
3.1 Antisense-Strategie	78
3.2 S-ODN-Experimente	79
3.3 Auswirkungen der Transfektion mit Antisense S-ODN	80
3.3.1 Einfluß auf das Verhalten von Titin und α -Aktinin	80
3.3.2 Einfluß auf das Verhalten von Myosin und F-Aktin	80
4. Hypertrophie	83
5. Vergleichende Aspekte der mikroskopischen Technik	84
6. Klinische Relevanz	85
7. Schlußfolgerung	86
VI. ZUSAMMENFASSUNG	88
VII. SUMMARY	89
VIII. ABKÜRZUNGEN	90
IX. LITERATURVERZEICHNIS	91
X. DANKSAGUNG	113

I. EINLEITUNG

Während der Entwicklung eines Sarkomers (Sarkomerogenese, Myofibrillogenese) als kontraktile Einheit quergestreifter Muskulatur fügen sich viele unterschiedliche Proteine zu einer supramolekularen Struktur zusammen. Aufgrund des präzisen Zusammenbaus werden die von Aktin und Myosin auf molekularer Ebene geleisteten Bewegungen in makroskopisch sichtbare Muskelbewegungen umgewandelt. Die für die Muskelkontraktion entscheidenden Prozesse, die an dünnen (Aktin) und dicken (Myosin) Filamenten ablaufen, wurden schon seit Jahrzehnten intensiv untersucht und aufgeklärt. In den letzten Jahren wurde nun ein drittes Filamentsystem bekannt, welches entscheidend zur Funktion des quergestreiften Muskels beiträgt und aus riesigen elastischen Molekülsträngen, den Titinen, besteht.

Das filamentöse Sarkomerprotein Titin wurde Ende der 70er Jahre des 20. Jahrhunderts von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander entdeckt, weshalb in der Literatur zwei gleichermaßen gültige Namen, Connectin¹ und Titin², existieren. Mit einem Molekulargewicht von 3-3,7 MDa und einer Länge von 1 µm ist Titin das größte bisher beschriebene Polypeptid und mit einem Anteil von 8-10% an der Gesamtmuskelmasse nach Myosin (43%) und Aktin (22%) das dritthäufigste Muskelprotein³. Ein Titinmolekül erstreckt sich von der Z- bis zur M-Linie eines Sarkomers und interagiert mit verschiedenen Proteinen der A-Bande wie beispielsweise mit Myosin und Myosin-assoziierten Proteinen⁴⁻⁸.

Verschiedene Funktionen werden Titin zugeordnet⁹. Zum einen wurde eine mechanische Rolle als entropische Feder ausführlich beschrieben¹⁰⁻¹⁶, zum anderen weisen der molekulare Aufbau^{5,7,17} und die frühe Expression¹⁸⁻²³ darauf hin, daß Titin nicht nur Elastizitätsfunktionen erfüllt, sondern auch eine wichtige Rolle in der Morphogenese der Myofibrillen, insbesondere in der Sarkomerogenese, spielt^{4,21,24-28}.

Morphologische Studien an insuffizienten menschlichen Herzen zeigten zahlreiche Veränderungen degenerativer Art²⁹⁻³¹. Neben einem Mangel an kontraktile Elementen waren vor allem eine ausgeprägte Disorganisation und Reduktion von Titin auffällig. Es wurde daraufhin postuliert, daß ein Defekt oder ein Mangel an Titin nicht nur die Elastizität des Sarkomers herabsetzt, sondern auch in einer gestörten Sarkomerogenese resultiert.

Diese verschiedenen Ergebnisse führten zu der Hypothese, daß die Expression von Titin Voraussetzung für die Inkorporation von Myosin in die Sarkomeren adulter Kardiomyozyten ist, d.h. daß eine Neubildung von intakten Sarkomeren nur in

Anwesenheit von Titin möglich ist³². In der vorliegenden Arbeit wurde diese Hypothese mit Hilfe von Antisense-Oligodesoxynukleotiden untersucht, die die Translation dieses Proteins inhibieren und damit einen direkten Zugang zur Frage der Rolle von Titin innerhalb der Sarkomerogenese *in vitro* ermöglichen. Das Modell adulter Kardiomyozyten der Ratte in Langzeitkultur hat sich hierbei für das *in vitro* Studium der Sarkomerogenese als geeignet erwiesen, da die Zellen einem komplexen Dedifferenzierungs- (mit Sarkomer- und Kontraktilitätsverlust) und Redifferenzierungsprozeß (mit *de novo* Myofibrillogenese und erneuter Kontraktilität) unterliegen³³.

In der vorliegenden Studie sollte geklärt werden, ob die gegen die Titin mRNA gerichteten Antisense-Oligodesoxynukleotide die sarkomere Inkorporation von Myosin beeinflussen, um somit die Hypothese zu überprüfen und zu bestätigen, daß die Anwesenheit und Organisation von Titin eine Voraussetzung für die Sarkomerogenese ist.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Struktur eines Sarkomers

Ein Charakteristikum quergestreifter Muskulatur (Herz- und Skelettmuskulatur) ist die alternierende Querstreifung aus hellen und dunklen Banden, die sowohl im Elektronenmikroskop als auch an mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten, längsgeschnittenen Muskelfasern im Lichtmikroskop erkennbar ist.

Bezüglich ihres Verhaltens in polarisiertem Licht werden die hellen Banden als I-Banden (isotrop, einfach lichtbrechend) und die dunklen als A-Banden (anisotrop, doppelbrechend) bezeichnet. Während die I-Bande durch eine dunklere Querlinie, den Z-Streifen (Zwischenscheibe), unterteilt wird, wird die A-Bande durch eine hellere H-Zone (Hensenscher Streifen) halbiert, die in der Mitte eine feine dunkle M-Linie (Mesophragma, Mittelstreifen, M-Bande) aufweist (Abb. 1 und 2).

Die sich wiederholende Untereinheit auf den Myofibrillen, das Sarkomer, reicht von einem Z-Streifen zum benachbarten und hat eine Länge von 1,5-2,2 μm . Da die 0,5-2 μm dicken Myofibrillen in der Muskelzelle parallel zueinander verlaufen und die Querstreifen ihrer Sarkomere nahezu in der gleichen Höhe liegen, kommt es zum lichtmikroskopisch erkennbaren Phänomen der Querstreifung.

Elektronenmikroskopisch wurde gezeigt, daß sich dicke Filamente (Myosin) in der A-Bande und dünne Filamente (Aktin, Troponin und Tropomyosin) in der I-Bande befinden. Verschiedene Querschnitte durch das Sarkomer verdeutlichen die Anordnung der dicken und dünnen Filamente zueinander. Zum Beispiel ist im Bereich, in dem sich dünne und dicke Filamente überlappen, jedes dicke Filament von sechs dünnen umgeben (hexagonale Anordnung; Abb. 1).

Lichtmikroskopisch stellt sich die Muskelkontraktion als Verkürzung der Sarkomeren dar, wobei die I- und H-Banden schmaler werden, während die Länge des A-Bandes erhalten bleibt. Auf diesem Phänomen basiert die 'Gleitfilamenttheorie'³⁴, welche die Verkürzung durch das Ineinandergleiten von Aktin- und Myosinfilamenten erklärt. Der Motor dieser Kraftentwicklung, der auf der zyklischen Interaktion des Myosin-S1-Köpfchens basiert, konnte inzwischen auf molekularem Niveau aufgeklärt werden^{35,36}.

Grundsätzliche Fragen sind jedoch noch zu klären. So zum Beispiel die Frage nach der Struktur, die dieses komplexe Gefüge in seinem Aufbau und in seiner Länge bestimmt.

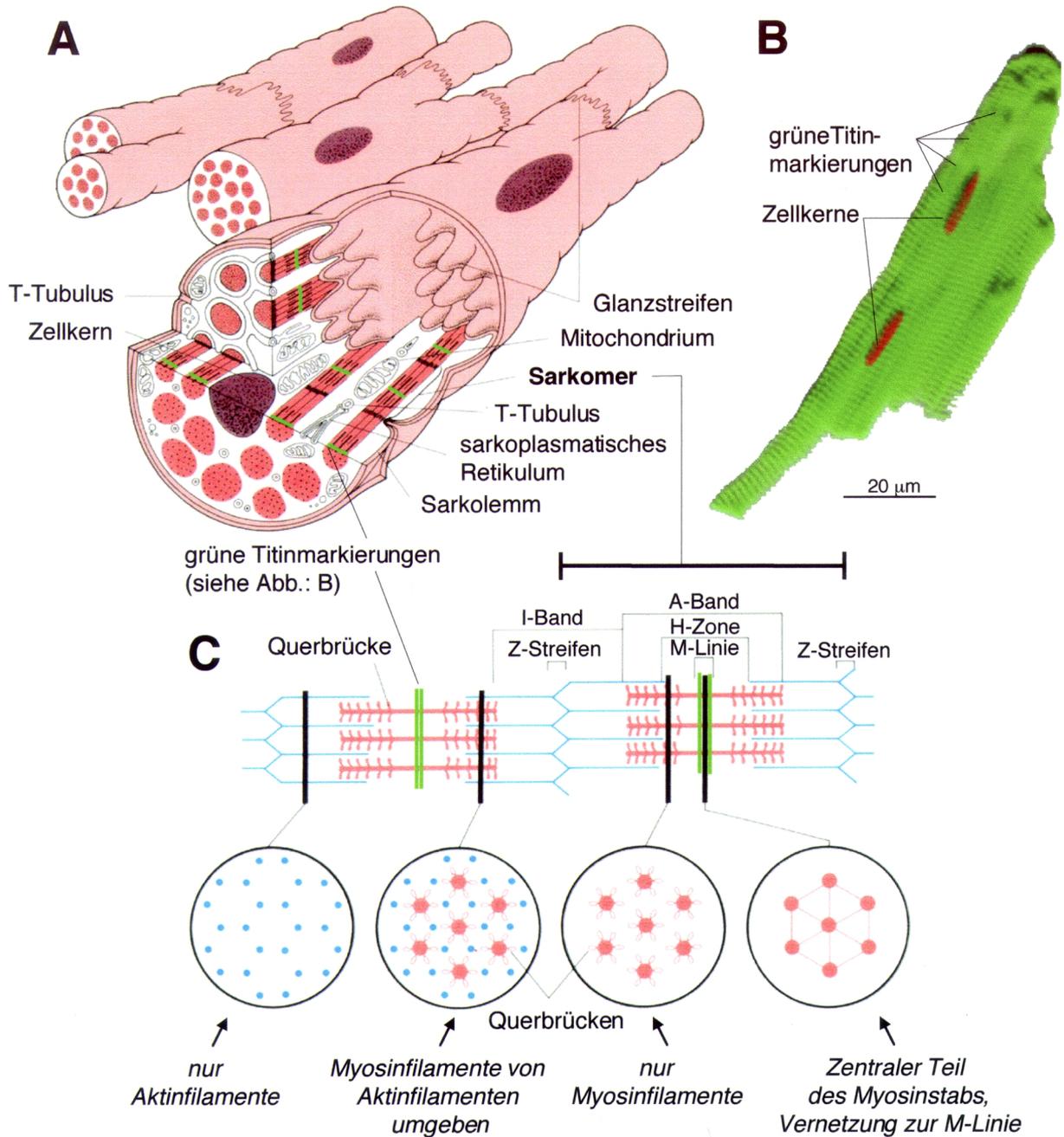


Abb.1: Aufbau einer Herzmuskelzelle

(A) Die gabelförmig verzweigten Zellen nehmen über die Glanzstreifen mit den Nachbarzellen Kontakt auf. Die grüne Markierung im Bereich der M-Bande markiert die Stelle des Titinantikörpers, der in (B) verwendet wurde.

(B) Konfokales Bild einer frisch isolierten binukleären Herzmuskelzelle der Ratte. Die Kerne (rot) wurden mit Propidiumjodid markiert. Die regelmäßige Querstreifung (grün) wurde immunzytochemisch mit dem Antikörper Titin 42, dessen Epitop nahe der M-Bande lokalisiert ist, erreicht.

(C) Eine quergestreifte Muskelzelle beinhaltet viele Myofibrillen, die als kontraktile Komponenten fungieren. Die Myofibrillen sind aus sich wiederholenden funktionellen Untereinheiten, den Sarkomeren, aufgebaut. Querschnitte durch verschiedene Ebenen des Sarkomers verdeutlichen das Muster der Proteine (modifiziert nach Schauf, Moffett, Moffett, Schubert: Medizinische Physiologie³⁷).

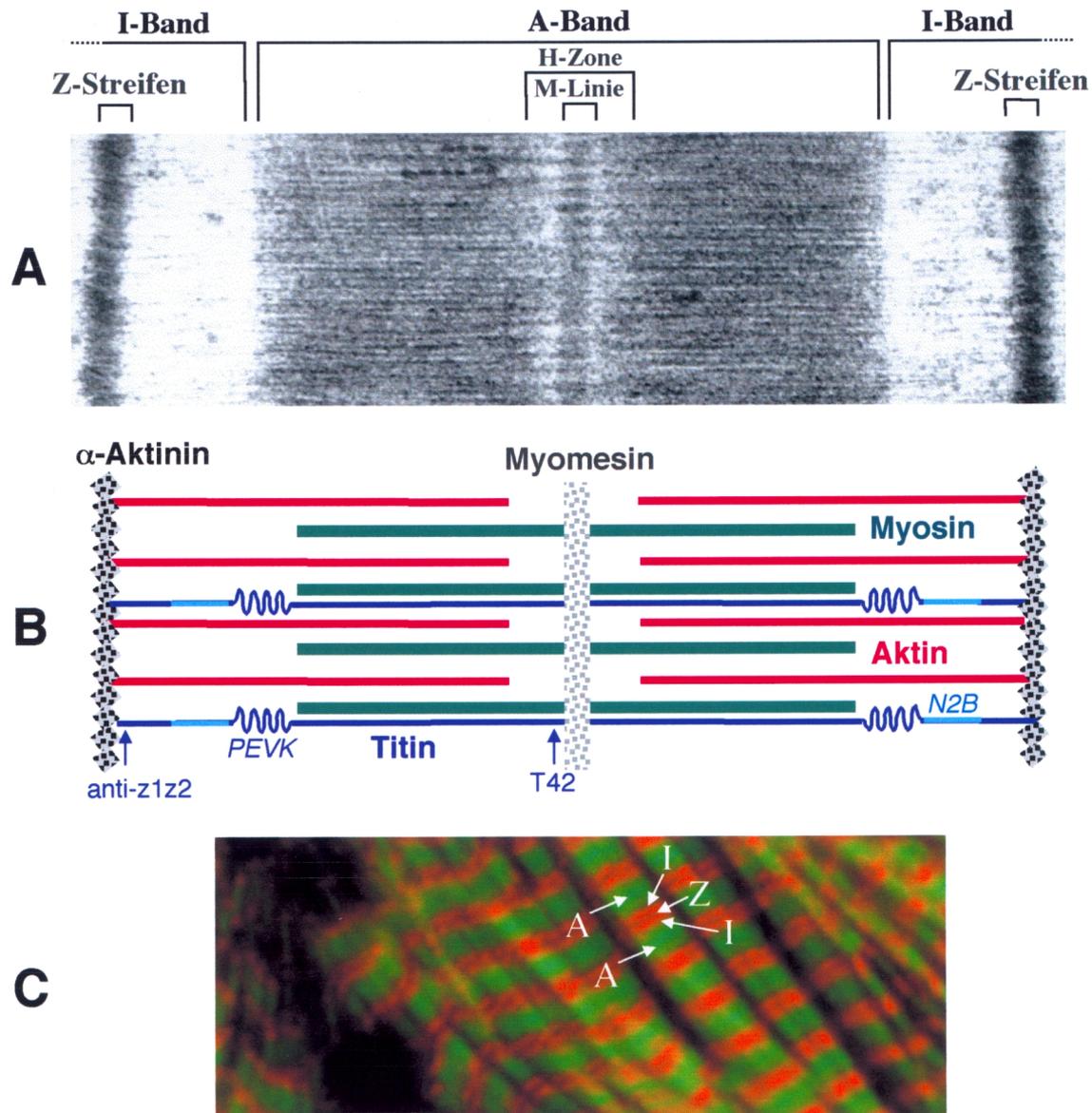


Abb. 2: Sarkomerstruktur

(A) Elektronenmikroskopisches Bild eines Sarkomers. Deutlich erkennbar sind die Z-Streifen, die dunkle A-Bande mit der in der Mitte liegenden helleren H-Zone und M-Linie und die hellen I-Banden.

(B) Schematische Zeichnung eines Sarkomers mit charakteristischen Proteinen.

(C) Detailaufnahme eines konfokalen Bildes einer adulten Herzzelle der Ratte (12 Tage in Kultur), welche für Titin (rot) und Myosin (grün) gefärbt wurde. Der hier verwendete Titinantikörper 'anti-z1z2' färbt am Rande des Z-Streifens (dunkler Streifen zwischen roter Markierung), der Myosinantikörper markiert die A-Bande.

Ein Kardiomyozyt enthält neben den kontraktilen Myofilamenten Aktin und Myosin, die mit 22% und 43% den Hauptanteil am Gesamtprotein bilden, noch eine Vielzahl anderer Proteine ³⁸:

Das Sarkomer wird in erster Linie von den kontraktilen Proteinen und den sie in ihrer Position fixierenden sarkomeren Gerüstproteinen gebildet.

Tab. 1: Proteine im Kardiomyozyt (modifiziert nach Kostin et al. ³⁹)

Kontraktile Proteine	Aktin, Troponin, Tropomyosin, Myosin
Sarkomere 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	Connexin 43, Cadherin, Catenin, Desmoplakin

Die ausgeprägte Regelmäßigkeit, mit der dünne und dicke Filamente im Sarkomer angeordnet sind, kann nicht nur auf ihrer Eigenschaft der Selbstassemblierung beruhen, sondern umfaßt einerseits auch Kontrollelemente, die sowohl den Ablauf koordinieren als auch die Länge der Filamente bestimmen ¹⁷, und andererseits spezifische Interaktionen mit dem zytoskelettären Gitterwerk ⁴⁰.

Titin könnte ein Kontrollelement sein, da es sich als molekulare Einheit über die Distanz eines Halbsarkomers von der Z- bis zur M-Linie erstreckt und dabei durch seine spezifischen Bindungsstellen die Positionen der anderen sarkomeren Proteine räumlich definieren kann ^{27,41-43}.

1.1 Aufbau des Z-Streifens

Im Z-Streifen binden zwei antiparallele Untereinheiten eines α -Aktinin-2 Homodimers mit ihrem N-Terminus an Aktin und an Titin mit ihrem C-Terminus. Somit vernetzt α -Aktinin die antiparallelen Titin- und Aktinfilamente von gegenüberliegenden Sarkomeren. Die α -Aktinin-2 Bindungsstelle des Titins befindet sich in einer wiederholten Sequenz von 45 Aminosäuren und wird daher als 'Z-repeat' bezeichnet ⁴⁴ (Abb. 3).

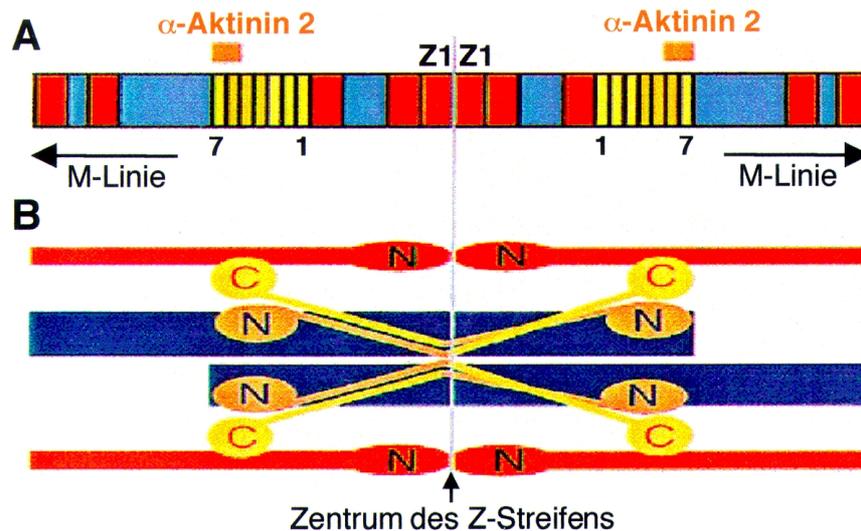


Abb. 3: Anordnung von Titin, α -Aktinin und Aktin im Z-Streifen.

(A) Das N-terminale Ende von Titin ist im Z-Streifen lokalisiert (rot: Immunglobulin-artige Domänen, blau: nicht-repetitive Sequenzen, gelb und orange: herzspezifische Z-repeats 1-7, orange: skelettmuskelspezifische Z-repeats).

Die α -Aktinin-2 Bindung befindet sich am Rande des Z-Streifens.

(B) Modell der Interaktion zwischen Titin und der Z-Einheit.

Z-Einheiten sind sich überlappende dünne Filamente (blau), die von gegenüberliegenden Sarkomeren stammen. Die dünnen Filamente werden durch die N-terminalen Enden eines antiparallelen α -Aktinin-2 Homodimers (gelb/orange) miteinander vernetzt. Querverbindungen zu den antiparallelen Titinfilamenten (rot) gegenüberliegender Sarkomere werden durch die C-terminale Region von α -Aktinin-2 ermöglicht. (modifiziert nach Sorimachi et al. ⁴⁵).

1.2 Aufbau der M-Bande

Die M-Bande oder M-Linie, als elektronendichte Zone in der Mitte der querbrückenfreien H-Zone gelegen, ist ungefähr 75 nm breit ⁴⁰ und weist bis zu 17 elektronendichte Linien, die bilateral der Mitte der M-Linie (M1) angeordnet sind, auf. Es können dabei, abhängig von der Spezies und dem Fasertyp, drei bis fünf Hauptstreifen differenziert werden ⁴⁶. Diese Streifen werden als M-Brücken bezeichnet und scheinen die dicken Filamente zur hexagonalen Struktur zu verbinden. Zusätzlich sollen diese M-Brücken durch M-Filamente, die parallel zu den dicken Filamenten verlaufen, verbunden sein ⁴⁷. Außerdem konnte der M-Brücke M4/M4' als strukturelle Komponente die Kreatinkinase (CK) zugeordnet werden.

Fünf Proteine, die sich in der M-Bande befinden, wurden bis jetzt identifiziert: CK ^{48,49}, M-Protein ⁵⁰, Myomesin ⁵¹, Skelemin ⁵² und Titin ⁵³.

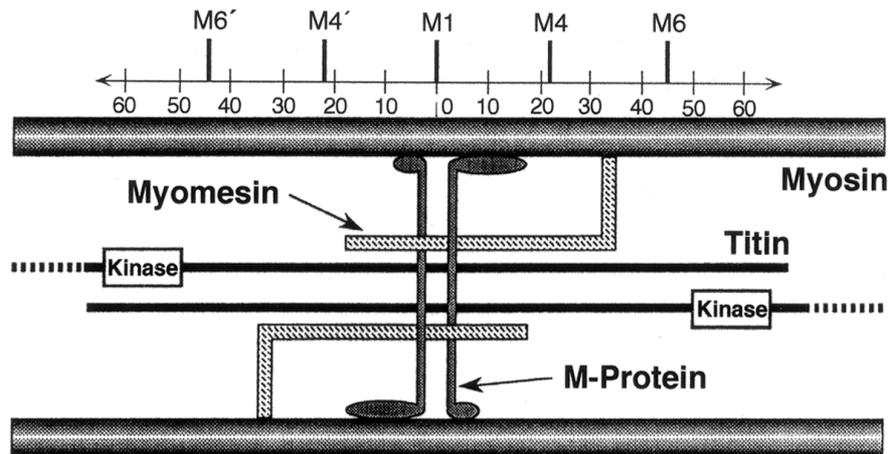


Abb. 4: Schema der Anordnung von Titin, Myomesin und M-Protein in der M-Bande (modifiziert nach Obermann et al.⁸ und Maruyama⁴³). Die Skalierung gibt die Distanz in nm zum Zentrum des A-Bandes an. Desweiteren sind die Hauptstreifen (M1, M4, M6) der M-Linie eingezeichnet.

Während die Kreatinkinase eine Rolle im Energiemetabolismus spielt, wird Skelemin eine Aufgabe in der Verbindung der Myofibrillen mit den intermediären Filamenten zugeordnet⁵⁴. Myomesin hingegen verbindet Titin mit Myosin, da es sowohl eine enge Verbindung zur C-terminalen Region von Titin besitzt, als auch Myosin an der zentralen Region des leichten Meromyosins mit Hilfe seiner aminoterminalen Domäne bindet^{8,55,56}. Auch das M-Protein weist eine Bindungsstelle für Myosin auf, und eine weitere für Titin wird diskutiert⁵⁷⁻⁵⁹ (Abb. 4).

2. Kontraktile und sarkomere Proteine

Für das hier vorliegende experimentelle Modell sind verschiedene Proteine besonders wichtig: Titin, α -Aktinin, Myomesin, Aktin und Myosin (Abb. 2, B). Diese sind für die Bildung der Hauptkomponenten der Sarkomere verantwortlich und wurden deshalb für diese Studie ausgewählt.

2.1 Titin

Aufgrund elektronenmikroskopischer Studien gab es bereits vor 40 Jahren Hinweise für die Existenz eines dritten Filamentsystems, welches parallel zu den dünnen und den dicken Filamenten verläuft. Es wurde zunächst als S-Filament⁶⁰ oder Gap-Filament⁶¹ bezeichnet. Eine weitere Charakterisierung war zu dieser Zeit jedoch nicht möglich. Ein Jahrzehnt danach wurde Titin (Connectin) von zwei Arbeitsgruppen^{1,2} unabhängig voneinander als neues Protein der quergestreiften Muskulatur mit Hilfe niedrigprozentiger Polyacrylamidgele entdeckt.

Das ungefähr 30.000 Aminosäuren-lange, filamentöse Titin ist mit einer Länge von 1 μm ⁶² und einem Molekulargewicht von 3-3,7 MDa⁷ das größte bisher beschriebene Polypeptid. Das Titin-Gen wird beim Menschen von einer einzelnen, auf dem langen Arm des Chromosoms 2 gelegenen Genkopie codiert⁶³. Mit Hilfe der Gelelektrophorese unter Verwendung großporiger Gele (2-3%) kann Titin als Doppelbande T1 und T2 dargestellt werden, wobei T2 ein proteolytisches Produkt von T1 ist⁶⁴⁻⁶⁶.

In der Titinfamilie können zwei Subklassen unterschieden werden. Das ungefähr 3 MDa große Titin kommt in der quergestreiften Muskulatur⁷ und in Nichtmuskelzellen^{67,68} von Vertebraten vor. Nichtvertebraten weisen hingegen in ihrer quergestreiften und glatten Muskulatur Titin-artige Proteine mit einem Molekulargewicht von ungefähr 800 kDa auf, die als Twitchin, Projektin und Mini-Titin bekannt sind^{9,69}. Außerdem ist Titin in den Chromosomen von menschlichen Epithelzellen und in den Embryonen von *Drosophila melanogaster* vorhanden, wo es vermutlich eine Rolle bei der Mitose spielt^{68,70}.

Immunhistochemische Studien mit Titin-spezifischen Antikörpern haben gezeigt, daß sich ein einzelnes Titinmolekül vom Z-Streifen bis zur M-Linie erstreckt^{4,53,71}. Während das C-terminale Ende (Carboxy-Terminus) über Interaktionen mit anderen Proteinen in der M-Linie verankert ist, liegt das N-terminale Ende (Amino-Terminus) im Z-Streifen, wo es an α -Aktinin bindet^{5,45,72}. In der Nähe des Z-Streifens wird durch Assoziation mit Aktin eine Versteifung des Titins erreicht⁷³. Desweiteren sind Phosphorylierungsstellen^{7,44} und eine Serin-Threonin-Kinasedomäne⁵ vorhanden, deren Funktionen jedoch bis jetzt nicht geklärt sind.

Labeit und Kolmerer veröffentlichten 1995⁷ die komplette humane cDNA-Sequenz für Titin und zeigten, daß in verschiedenen Muskeln Isoformen des Proteins existieren, die sich erheblich in ihrer Größe unterscheiden. So besitzt die kardiale Titinisoform eine Masse von ungefähr 3 MDa, während das Titin des Musculus soleus ungefähr 3,7 MDa aufweist. Dieser enorme Größenunterschied basiert auf unterschiedlich langen I-Band-Titin-Bereichen dieser Muskeln (Abb. 14).

Die Aufklärung der Primärstruktur zeigte weiterhin, daß es sich bei diesem Protein nicht um ein Polymerisationsprodukt von zahlreichen Proteinuntereinheiten handelt, sondern daß es auf der Expression einer einzelnen modular aufgebauten Polypeptidkette beruht.

Diese Polypeptidkette besteht zu 90% (ungefähr 300 Kopien) aus zwei Motivfamilien: Fibronektin-Typ-III-(Fn3)-Domänen (Typ I) und immunglobulin-artigen (Ig) Domänen (Typ II)^{5,63}. Die jeweils globulären Domänen, bestehend aus einer ungefähr 100 Aminosäuren langen Kette, liegen als siebenfache, antiparallele β -Faltblattstruktur vor. Die restlichen 10% sind in sogenannten nicht-repetitiven

(‘unique’) Sequenzen organisiert, die zwischen den Ig- und Fn3-Domänen lokalisiert sind.

Titin läßt sich in zwei funktionell unterschiedliche Regionen, A-Band- und I-Band-Titin unterteilen (Abb. 5):

a) Im A-Band-Titin (2 MDa) sind zwei Typen von sogenannten ‘super repeats’ vorhanden, die beide aus Ig- und Fn3-Domänen aufgebaut sind ⁴⁴.

Innerhalb des zentralen Anteils sind sieben Fn3- und 4 Ig-Domänen nach dem Muster (Ig-Fn3-Fn3-Ig-Fn3-Fn3-Fn3-Ig-Fn3-Fn3-Fn3-) angeordnet. Diese ungefähr 43 nm langen repeats wiederholen sich elfmal im A-Band-Titin ^{5,7,74}. Myosin und C-Protein enthalten ebenfalls ‘repeats’ mit einer entsprechenden 42,9 nm-Periodizität in der C-Zone der A-Bande. Somit korreliert die regelmäßige Anordnung der Domänen des A-Band-Titins mit der Ultrastruktur des dicken Filamentes. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß das A-Band-Titin einen molekularen Bauplan des dicken Filamentes enthält, d.h. die genaue Assemblierung und die Länge der dicken Filamente organisiert ^{5,7,17}. Schon in den 80er Jahren wurde aufgrund ähnlicher Substrukturen von Titin und Myosin spekuliert, daß Titin als strukturelle Matrize für den Zusammenbau des dicken Filamentes dient ²⁴.

Etwas näher zum Aminoterminal sind fünf Fn3- und zwei Ig-Domänen in einem ‘super repeat’ nach dem Muster (Ig-Fn3-Fn3-Ig-Fn3-Fn3-Fn3-) arrangiert, das sich siebenmal innerhalb der A-Bande wiederholt ²⁷. Dieser Teil des Titinfilamentes wird D-Zonen-A-Band-Titin genannt.

Aufgrund der Bildung stabiler, supramolekularer Komplexe zwischen Titin und dem dicken Filament ist das A-Band-Titin funktional steif, obwohl es intrinsisch elastisch ist. Drei bis sechs Titinstränge verbinden sich hierbei mit dem dicken Filament.

b) Das I-Band-Titin (800 kD bis 1,5 MDa) ist größtenteils aus tandemartig angeordneten, wiederholten Abfolgen von Ig-Domänen, die ‘Tandem-Ig’ genannt werden, aufgebaut ^{75,76}.

Außerdem beinhaltet es einige nicht-repetitive Sequenzen wie das PEVK-Segment, das seinen Namen aufgrund der vorherrschenden Aminosäurezusammensetzung aus Prolin (P), Glutamat (E), Valin (V) und Lysin (K) erhielt ⁷. Herzmuskulatur, die sehr steif ist, weist eine sehr kurze PEVK-Region auf, Skelettmuskulatur hingegen eine viel längere.

Die PEVK-Region ist verantwortlich für die Elastizität und trägt entscheidend zur passiven Spannung bei. Dies konnte in Studien gezeigt werden, wo Titin entweder durch proteolytische Methoden oder ionisierende Strahlung degradiert oder durch Extraktion entfernt wurde, was in einem Abfall der passiven

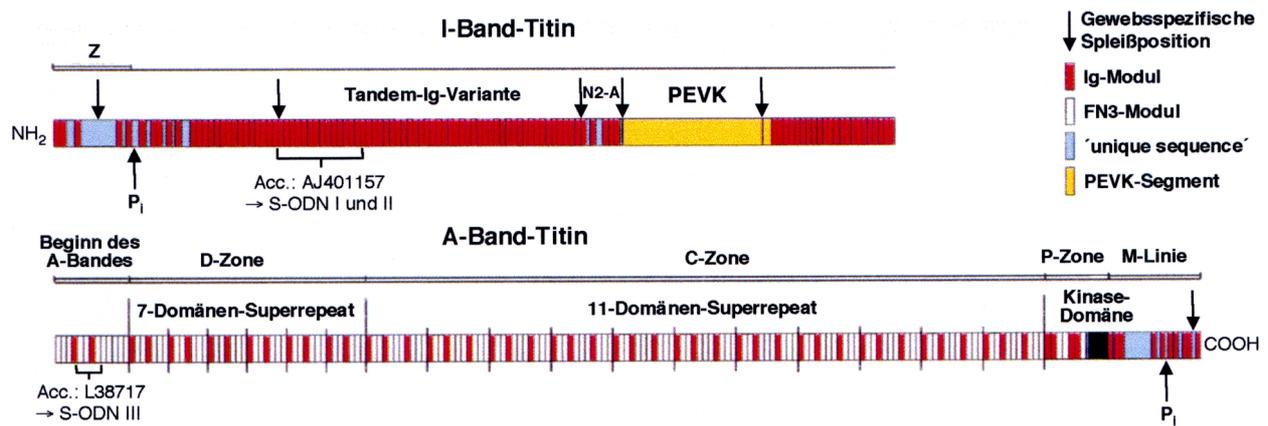


Abb. 5: Domänenarchitektur des Titins vom Soleusmuskel des Menschen (modifiziert nach Labeit und Kolmerer ⁷)

Das 3,7 MDa große Polypeptid enthält 297 Kopien von ~100 Aminosäuren-langen Modulen, die zur Superfamilie der Ig bzw. Fn3 gehören und als 10-12 kDa schwere, globuläre Untereinheiten vorliegen. Spezifisch für das I-Band-Titin ist eine zu 70% aus nur vier Aminosäuren bestehende Sequenz, das PEVK-Segment. Die Tandem-Ig und die PEVK-Region des I-Band-Titins werden bei physiologischer Dehnung gedehnt. Spezifisch für das A-Band-Titin sind regelmäßige Abfolgen von Ig- und Fn3-Domänen, die sogenannten 'super-repeats', welche Bindungsstellen für Myosin und C-Protein darstellen. Außerdem kommen 'unique sequences' vor, die Phosphorylierungsmotive (Pi) bzw. eine Serin / Threonin-Kinasedomäne codieren.

Muskelspannung resultierte. Zusätzlich wurde auch eine starke Absenkung der kalziumaktivierten Kraft beobachtet. Dies wurde auf die mangelhafte Zentrierung der dicken Filamente im Sarkomer zurückgeführt ^{12,77-79}.

Im mittleren Bereich des I-Band-Titins (N2-Region) kommen weitere nicht-repetitive Sequenzen vor, die in der Herzmuskulatur eine beachtliche Länge aufweisen können.

Durch differentielles Spleißen entsteht entweder die N2B-, die N2A- oder die N2BA-Isoform (Kombination aus N2B und N2A). Während die N2A-Isoform in Skelett- und Herzmuskulatur auftritt, kommen die N2B- und die N2BA-Isoformen ausschließlich in der Herzmuskulatur vor (Abb. 14).

Zellen mit einem höheren Anteil an N2BA-Titin (Schwein) zeigen eine geringere Steifheit als diejenigen anderer Spezies (Ratte, Maus), die einen höheren Gehalt an N2B-Titin aufweisen. Dies führte zu der Hypothese, daß die Koexpression der Isoformen in unterschiedlicher Zusammensetzung die zelluläre Steifheit der Herzmuskulatur moduliert ⁸⁰.

Die Tandem-Ig-Region und das PEVK-Segment des I-Band-Titins verhalten sich wie zwei in Serie geschaltete Komponenten einer inhomogenen molekularen Feder, die während der Extension passive Spannung erzeugen ⁸¹⁻⁸⁵. Unter physiologischen

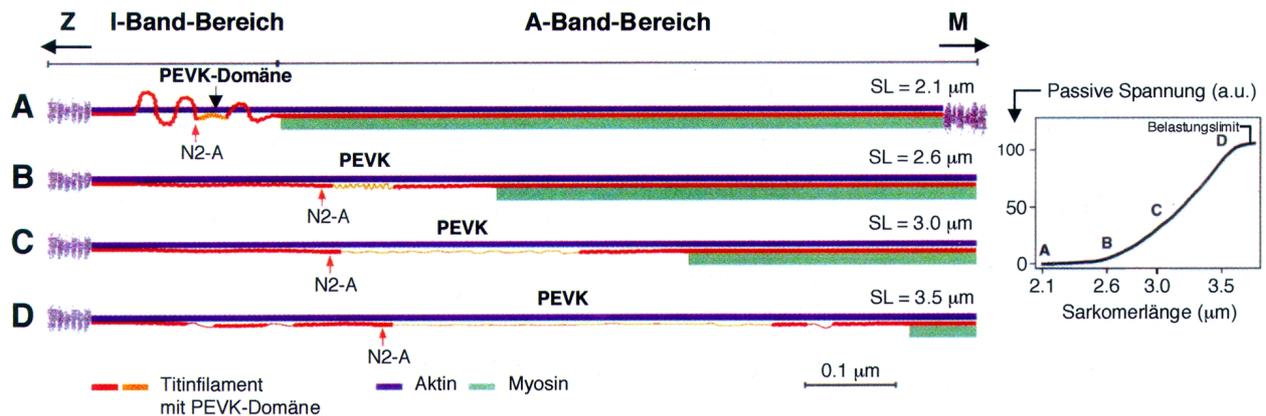


Abb. 6: Modell zur Titinelastizität im Psoasmuskel (modifiziert nach Linke et al.⁸⁷ und Labeit et al.⁷⁵)

Die linke schematische Zeichnung demonstriert das Verhalten eines Halbsarkomers bei verschiedenen Dehnungszuständen. Im rechten Diagramm ist die typische Ruhedehnungskurve einer Psoasmyofibrille dargestellt; die Buchstaben A bis D beziehen sich auf die entsprechenden Sarkomerlängen des linken Schemas. Zu beachten ist die sequentielle Extension von Ig-Domänensegmenten (rote Kugeln) und PEVK-Region. Erst bei Ausdehnung der PEVK-Region entsteht eine signifikante passive Spannung. Der Zustand in D wird unter physiologischen Bedingungen wohl nicht erreicht.

Bedingungen nimmt zuerst die Tandem-Ig-Region an Länge zu, wobei bei diesem Vorgang noch keine passive Spannung entwickelt wird. Ein beträchtlicher Spannungsanstieg setzt bei der folgenden Extension der PEVK-Region ein^{75,86,87}. Bei übermäßiger, unphysiologischer Krafteinwirkung entfalten sich anschließend die einzelnen Ig-Domänen gefolgt von einer N2-Region-Dehnung^{88,89}.

Aufgrund der Dehnung des Sarkomers wird passive Spannung durch das Titin aufgebaut, da es das Bestreben hat, das Sarkomer wieder in seine ursprüngliche Länge zu versetzen (Abb. 6).

Aufgrund dieser Ergebnisse werden Titin folgende Funktionen zugeordnet:

- Erzeugung passiver Spannung und damit Rückstellung des Sarkomers auf die ursprüngliche Länge nach physiologischer Dehnung,
- Aufrechterhaltung der aktiven Spannung bei isometrischer Kontraktion durch Positionieren der dicken Filamente im Zentrum des Sarkomers,
- eine wichtige Rolle als molekulare Matrize (Lineal) und Koordinator in der Sarkomerogenese, insbesondere in der Assemblierung der dicken Filamente.

2.2 α -Aktinin

Bei α -Aktinin handelt es sich um ein Aktin-bindendes und -vernetzendes Protein, das sowohl in Muskelzellen als auch in Nichtmuskelzellen vorkommt ⁹⁰.

α -Aktinin ist ein Dimer aus gegenläufig angelagerten identischen Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von 94-103 kDa ^{91,92}. Im elektronenmikroskopischen Bild stellt es sich als langes, stabförmiges Molekül mit einem Durchmesser von 3-4 nm und einer Länge von 30-40 nm dar. Sequenzhomologien mit den zytoskelettären Proteinen Spektrin und Dystrophin ⁹³ weisen auf eine gemeinsame Familie hin.

Verschiedene Isoformen von α -Aktinin wurden charakterisiert. Neben Isoformen der Skelettmuskulatur (α -Aktinin-3), der Herzmuskulatur (α -Aktinin-2) und der glatten Muskulatur (α -Aktinin-1) wurden Nichtmuskelisoformen (ebenfalls α -Aktinin-1) im Gehirn, in Makrophagen, Thrombozyten und Fibroblasten in Kultur gefunden. Der einzig deutliche funktionelle Unterschied zwischen diesen Isoformen besteht in der Kalzium-sensitiven Bindung der α -Aktinin-Isoformen von Nichtmuskelzellen an Aktin, während die Aktinbindung der Muskelisoformen Kalzium-insensitiv ist ⁹⁴.

Bezüglich seiner Struktur kann α -Aktinin in drei Domänen unterteilt werden. Man unterscheidet eine N-terminale Aktin bindende Domäne, vier sich intern wiederholende 122 Aminosäuresequenzen und eine C-terminale Region, die zwei Kalzium bindende Motive sowie eine Titinbindungsstelle besitzt.

Während α -Aktinin in den Z-Streifen und in Membran-assoziierten Strukturen der Skelettmuskulatur lokalisiert ist, findet es sich in der Herzmuskulatur sowohl in den Z-Streifen als auch in den Glanzstreifen und in glatten Muskelzellen in zytoplasmatischen 'dense bodies' und Membran-assoziierten 'dense plaques'.

In der Herzmuskulatur vernetzt α -Aktinin die Aktin- und die Titinfilamente der beiden benachbarten Sarkomere im Z-Streifen (Abb. 3) und verankert sie auch am Zellende im Glanzstreifen ⁹⁵. Neben den stabilisierenden Funktionen im Zytoskelett wird α -Aktinin auch eine wichtige Rolle in der Sarkomerogenese zugesprochen ⁹⁶.

2.3 Myomesin

Das myofibrilläre Protein Myomesin ist Komponente der M-Linie in quergestreifter Muskulatur. Im Jahre 1984 konnte die Arbeitsgruppe um Eppenberger ⁵¹ zwischen einem 165 kDa und 185 kDa Protein unterscheiden. Das 165 kDa Protein wurde als M-Protein und das 185 kDa Protein als Myomesin definiert. Myomesin wurde außer

in der Skelett- und Herzmuskulatur auch im Thymusgewebe aufgrund der dort vorhandenen myogenen Zellen gefunden.

Das Protein wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenz in postmitotischen, nicht proliferierenden Myoblasten in einem regelmäßigen Querstreifungsmuster nachgewiesen. Elektronenmikroskopische Bilder von frühen Muskeltuben zeigten Myomesin in der sich formenden H-Zone einer neu entstehenden Myofibrille⁹⁷⁻⁹⁹. Somit ist Myomesin nicht nur als ein hochspezifischer Marker für die Differenzierung quergestreifter Muskelzellen zu betrachten, sondern es spielt vermutlich auch eine wichtige Rolle in Zusammenbau und/oder Erhaltung der Myofibrillen¹⁰⁰.

Myomesin gehört zur Immunglobulinsuperfamilie und ist in erster Linie aus Immunglobulin-ähnlichen und Fibronektin Typ III Domänen aufgebaut, wie auch einige andere mit dem dicken Filament assoziierten Proteine, die sogenannten Myosin-bindenden Proteine (MyBPs), M-Protein, C-Protein, H-Protein und Titin¹⁰¹. Myomesin und M-Protein verankern die dicken Filamente mit dem elastischen dritten Filamentsystem, da beide eine Affinität sowohl für Myosin als auch für Titin besitzen^{8,55-57,62} (Abb. 4).

Im Kardiomyozyten befindet sich Myomesin in den Regionen 1-4 der M-Bande eines Sarkomers⁸, was zu einem deutlichen Querstreifungsmuster nach spezifischer immunhistochemischer Markierung führt.

2.4 Aktin

Neben Myosin (43%) und Titin (10%) ist Aktin mit einem Anteil von ungefähr 22% ein Hauptbestandteil der Myofibrillen³.

Aktinfilamente sind aus zwei Strängen von globulären Aktinmolekülen (G-Aktin, MW: 42 kD, Durchmesser: 5,6 nm), die nach Art einer α -Doppelhelix verdrillt sind, aufgebaut. Jeder Strang von polymerisierten G-Aktin-Monomeren ist ca. 1 μ m lang und wird als F-Aktin bezeichnet.

Die Aktinfilamenthelix besitzt sechs Windungen mit je 13 G-Aktin-Einheiten. Das G-Aktin-Monomer ist aus vier Subdomänen 1-4 aufgebaut. Obwohl jede Subdomäne einen Bindungsplatz für Myosin besitzt, sind nicht alle für die Myosinköpfechen zugänglich, da durch die Doppelhelixformation einige der Bindungsstellen zur Innenseite der Helix gerichtet sind (Subdomäne 3 und 4). Die für eine Bindung verfügbaren Subdomänen (Subdomäne 1 und 2) befinden sich entlang des dünnen Filamentes in einem regelmäßigen Abstand von 2,7 nm.

Beim Aktinfilament handelt es sich um eine polare Struktur mit einem (+) Ende und einem (-) Ende. Das (+) Ende, das auch als 'barbed end' bezeichnet wird, zeichnet sich durch eine achtfach größere Wachstumsgeschwindigkeit gegenüber dem (-) Ende oder 'pointed end' aus. Das (+) Ende ist im Kardiomyozyten entweder im Z-Streifen oder im Sarkolemm verankert. Beide Pole werden im Sarkomer durch sogenannte Capping Proteine vor Ab- und Umbau geschützt. Diese Proteine gehören, wie auch Myosin und Tropomyosin, zur Gruppe der Aktin bindenden Proteine ¹⁰².

In Säugetieren wurden sechs verschiedene Aktin-Isoformen (3 α , 1 β und 2 γ) gefunden, die eine Homologie untereinander von mehr als 90% aufweisen und deshalb genetisch stark konserviert sind ¹⁰³.

F-Aktin läßt sich mit Farbstoff-gekoppeltem Phalloidin immunzytochemisch anfärben. Hierbei ist eine Unterscheidung in das quergestreifte sarkomere Aktin und in das kontinuierlich gefärbte nicht-sarkomere Aktin, das Aktin der Streifasern oder Streifaser-ähnlichen Strukturen, möglich.

Aktin ist Komponente des dünnen Filamentes, wie auch Tropomyosin und Troponin, wobei letztere regulatorische Funktionen besitzen.

Ein Tropomyosinmolekül erstreckt sich über sieben Aktin Monomere und besteht aus zwei Polypeptidketten, die zu einer α -Helix gewunden sind. Troponin ist ein globuläres Molekül und besteht aus drei Untereinheiten, Troponin (Tn) T, I und C. Während TnT Tn mit Tropomyosin verbindet, verhindert TnI die Brückenbildung zwischen Myosin und Aktin in Ruhe, und TnC stellt einen Bindungsplatz für Kalziumionen dar. Der Hemmeffekt von TnI wird aufgehoben, wenn TnC Ca^{2+} -gesättigt ist, da es zu einer Konformationsänderung des Tn-Moleküls kommt. Dabei wird auch das Tropomyosin so verschoben, daß die Myosinbindungsstellen des Aktins freigelegt werden und Aktin und Myosin miteinander reagieren können.

2.5 Myosin

Mit einem Anteil von 43% am Gesamtproteingehalt ist Myosin das häufigste Protein der quergestreiften Muskelzelle.

Das Muskelmyosin gehört zur Familie der Myosin II Unterfamilie. Myosin II kommt auch in Nichtmuskelzellen vor, wo es vermutlich eine Rolle bei der Zellteilung spielt und an der Erzeugung von Spannung in Streifasern beteiligt ist. Nichtmuskelzellen weisen noch weitere kleinere Myosintypen auf wie zum Beispiel Myosin I. Es wird vermutet, daß sich Myosin II aus dem primitiveren Myosin I entwickelt hat.

Das Myosinmolekül besitzt einen zweigeteilten Kopf, der sowohl eine spezifische Bindungsstelle für ATP als auch selbst ATPase-Aktivität aufweist und gelenkartig mit einem Halsstück verbunden ist. Diese beiden Strukturen werden als 'schweres Meromyosin' (HMM) (200 kDa), bezeichnet. An dieses lagert sich, ebenfalls gelenkartig verbunden, das stabförmige Schwanzstück oder 'leichte Meromyosin' (LMM) (16-28 kDa) an.

Das schwere Meromyosin kann mittels Papain in die Subfragmente HMM-S1 und HMM-S2 weiter aufgetrennt werden. HMM-S1 stellt dabei die N-terminalen Köpfe mit je zwei leichten Ketten (LC1 und 2) dar und HMM-S2 einen C-terminalen, drehbaren Schwanzabschnitt von 150 nm Länge, der im Dimer eine Doppelhelix mit einer alle 14 nm auftretenden Windung bildet.

Die gelenkartige Beweglichkeit des Kopf-Hals-Stücks ermöglicht die reversible Bindung von Myosin an Aktin (Aktomyosinkomplex) und das Ineinandergleiten der Aktin- und Myosinfilamente (Gleitfilamenttheorie der Kontraktion) ³⁴.

Ungefähr 150 - 360 sich überlappende Myosindimere bilden, bündelartig zusammengefaßt, durch Aneinanderlagern der Schwanzstücke das Myosinfilament (dickes Filament). Es ist ungefähr 1,6 µm lang, was der Länge des A-Bandes im Sarkomer entspricht, hat einen Durchmesser von 15 nm und ein Molekulargewicht von 500 kDa. In der Mitte, der sogenannten H-Zone des Sarkomers, tangieren sich die Schwanzbereiche der entgegengesetzten Myosinfilamente der beiden Halbsarkomere, deshalb sind auf dieser Distanz von 150 nm keine Myosinköpfe (auch als Querbrücken bezeichnet) zu finden ¹⁰⁴.

Bei den schweren und leichten Meromyosinen wurden verschiedene Isoformen mit unterschiedlichen Eigenschaften gefunden. Bei der schweren Kette sind α und β Isoformen ($\alpha\alpha$ -V1, $\alpha\beta$ -V2 und $\beta\beta$ -V3) zu unterscheiden, die im Atrium und Ventrikel des Herzens vorkommen, sowie eine schnelle und langsame Isoform, die im Skelettmuskel auftritt. Hierbei entspricht die langsame Isoform der V3-Isoform des Herzens. Desweiteren werden während der Embryogenese eine embryonale und eine fetale Isoform gebildet.

Die Unterschiede der einzelnen Isoformen liegen in der ATPase-Aktivität begründet, die zum Beispiel für V1 viermal höher ist als für V3. Dieser hohe ATP-Umsatz führt zu einer höheren Kontraktionsgeschwindigkeit und einem höheren Sauerstoffverbrauch ^{105,106}.

3. Sarkomerogenesemodelle

Das Herz ist das erste funktionelle Organ in einem sich entwickelnden Embryo¹⁰⁷. Tokuyasu und Maher^{18,19} konnten in ihren Studien an Hühnerembryonen schon nach 36 Stunden *in ovo* Kontraktionen der Kardiomyozyten beobachten. Der Zusammenbau der myofibrillären Proteine in die Sarkomeren muß demnach ein sehr schneller und koordinierter Prozeß sein. Um dieses Rätsel zu lösen, wurden zahlreiche *in vitro* Studien in Primärkulturen von Kardiomyozyten und auch *in vivo* Studien durchgeführt. Im Verlauf der letzten 30 Jahre wurden verschiedene Modelle postuliert, die teilweise miteinander übereinstimmen, aber auch in wesentlichen Punkten differieren.

3.1 *In vitro* Studien

Ein erster Modellansatz, der auf elektronenmikroskopischen Untersuchungen kultivierter, embryonaler Kardiomyozyten beruhte^{108,109}, zeigte den Beginn des Myofibrillenzusammenbaus in Z-Streifen-ähnlichem Material (Z-Streifen-Vorläufer), an dem Myofilamente inserierten und IZI-artige Strukturen bildeten. Sobald diese Strukturen miteinander Verbindung aufnahmen, entstanden einfache Myofibrillenbündel. Die Z-Streifen-ähnlichen Strukturen wurden auch als Organisationszentren bezeichnet.

In den folgenden Jahren wurden mit neuen Methoden und Erkenntnissen genauere Modelle entwickelt, jedoch hat das grundlegende Prinzip der IZI-artigen Strukturen des Markwald-Modells noch immer seine Gültigkeit, da diese Strukturen auch in anderen Modellen der Sarkomerogenese eine grundsätzliche Rolle spielen.

Ein anderes Modell, das in kultivierten Herz- und Skelettmuskelzellen aufgestellt wurde, postulierte, daß die ersten Fibrillen, die sich in der Peripherie von sich ausbreitenden Kardiomyozyten bildeten, die sogenannten Streßfaser-artigen Strukturen (SFLS), ein Gerüst oder eine Schablone während des Sarkomeren-zusammenbaus darstellten. Es wurde gezeigt, daß sich diese SFLS zunächst mit Phalloidin und Nichtmuskel-spezifischen Isoformen von Aktin, Myosin und α -Aktinin anfärbten. Zu einem späteren Zeitpunkt ließen sich jedoch nur noch Muskel-spezifische Isoformen nachweisen, so daß sich die SFLS fortschreitend in neue Myofibrillen zu verwandeln schienen¹¹⁰.

Basierend auf dieser Hypothese konnten andere Gruppen zeigen, daß die IZI-Komplexe aus α -Aktinin, Aktin und Titin bestehen, und daß diese Komplexe in enger Verbindung mit den SFLS stehen und somit sogenannte nicht-gestreifte Myofibrillen (NSMF) bilden. Diese Prämyofibrillen werden dann allmählich in voll

entwickelte Myofibrillen umgewandelt, indem sarkomere Proteine inkorporiert werden^{97,99,111}. Weiterhin wurde postuliert, daß die unabhängig gebildeten Myosinfilamente später in die Sarkomeren eingelagert werden, vermutlich mit Hilfe der Titinfilamente^{20,21,97,112}.

Eine weitere Hypothese postuliert die Existenz von Prämyofibrillen als Vorläuferstrukturen während der Myofibrillogenese embryonaler und adulter Kardiomyozyten^{99,113,114}. Es konnte gezeigt werden, daß die Prämyofibrillen aus kurzen sarkomeren Einheiten von α -Aktinin, Aktinfilamenten und kurzen Nichtmuskel-spezifischen Myosin IIB Filamenten bestehen (Mini-Sarkomere), die kein Titin enthalten. Durch Integration von Muskel-spezifischen Myosin IIB Filamenten und Titin werden diese Prämyofibrillen zu jungen Myofibrillen. Verlust des Nichtmuskel-spezifischen Myosin IIB, Zunahme der Länge der Mini-Sarkomere und periodische Anordnung der Muskel-spezifischen Myosin II Filamente in den A-Banden führt zur endgültigen Form ausgereifter Myofibrillen.

3.2 *In vivo* Studien

Tokuyasu und Maher¹⁸ berichteten in ihren Pionierstudien an embryonalen Hühnerherzen, daß zu einer Zeit, in der Aktin und Myosin diffus in der Zelle verteilt sind, α -Aktinin und Titin schon in einem periodischen Muster organisiert vorliegen. Im weiteren Verlauf wird Myosin in einer sarkomeren Anordnung beobachtet, während Aktin noch immer filamentös erscheint. Die I-Banden werden erst zu einem späteren Zeitpunkt sichtbar.

Studien an embryonaler Skelettmuskulatur der Maus deuteten auf eine definierte Abfolge im Erscheinen der sarkomeren Proteine hin. Desmin trat zuerst in Erscheinung, gefolgt von Titin und, mit zeitlichem Abstand, den anderen sarkomeren Proteinen²². Dies führte auch hier zu der Annahme, daß Titin auch *in situ* als Integrator des IZI-Komplexes wirkt und sich die Assemblierung der A-Bande unabhängig vollzieht.

Schließlich konnten Ehler et al.²⁸ in einer Studie an Hühnerembryonen mit Hilfe von Dreifachfärbungen die Lokalisation der verschiedenen sarkomeren Komponenten innerhalb einer Myofibrille vergleichen. Die Ergebnisse zeigten zwei Hauptstadien der Myofibrillogenese. Zum einen fand sich im unreifen, nicht kontraktile Herzen filamentöses Aktin nahe der Zellmembranen, und nur α -Aktinin und Titin waren in einem deutlichen Muster organisiert. Zum andern erschienen die Sarkomere zum Zeitpunkt der ersten Kontraktionen vollständig organisiert mit Ausnahme der I-Banden, die ihre definierte Länge zu einem

späteren Zeitpunkt erhielten. Typische Streifzfaser-artige Strukturen oder Prämyofibrillen wie in kultivierten Zellen konnten nicht gefunden werden. Auch hier wurde postuliert, daß die IZI-Strukturen als erste Organisationszentren in der Myofibrillogenese dienen und daß Titin als Matrize bzw. Lineal für den sarkomeren Zusammenbau wirkt.

Beim Vergleich der Sarkomerogenesemodelle der *in vitro* und *in vivo* Studien wird deutlich, daß große Ähnlichkeiten, besonders bezüglich der IZI-Strukturen und der vermutlich integrierenden Rolle von Titin, bestehen.

Der zuvor beschriebene molekulare Aufbau, insbesondere die Domänenstruktur des A-Band-Titins, welche mit der Ultrastruktur des dicken Filamentes korreliert, und die frühe Expression weisen darauf hin, daß Titin neben der Erzeugung passiver Spannung auch eine wichtige Rolle in der Sarkomerogenese spielt. Diese zentrale Rolle von Titin nachzuweisen, ist Thema dieser Dissertation.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Isolierung adulter Kardiomyozyten der Ratte

Das Prinzip der Isolierung besteht darin, daß das Herzgewebe einem dissoziierenden Medium ausgesetzt wird, das einen niedrigen Ca^{2+} -Gehalt aufweist und proteolytische Enzyme enthält. Die freie Kalziumkonzentration im Herzgewebe wird reduziert, um die Ca^{2+} -abhängigen Desmosomen in den Glanzstreifen zu dissoziieren. Proteolytische Enzyme wie Kollagenase, Pronase und Trypsin dienen der Spaltung der Verbindungen zwischen der einzelnen Zelle und ihrer Extrazellulärmatrix ¹¹⁵.

1.1 Material

1.1.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um männliche Wistar-Ratten, die aus der Tierzuchtanlage des Max-Planck-Instituts für Physiologische und Klinische Forschung, Bad Nauheim stammten oder von der Firma Charles River, München bezogen wurden. Für die Versuche wurden männliche Tiere im Alter von 8-10 Wochen verwendet.

1.1.2 Langendorff-Perfusionsapparatur

Die Langendorff-Perfusionsapparatur zur retrograden Herzperfusion dient zur Isolierung der Myozyten aus dem Myokardgewebe.

Sie besteht aus einem oberen Reservoir, einem Zwischenstück mit einem Flußreduzierer, einer Blasenfalle mit einem speziellen Auslaß zur Fixierung der Aorten-Kanüle und einem unteren, beweglich angebrachten Auffangtrichter. Die Distanz vom oberen Reservoir zur Aortenkanüle beträgt 80 cm. Die beschriebenen Anteile sind aus doppelwandigem Glas aufgebaut, um sie über ein zirkulierendes Wasserbad auf einer konstanten Temperatur von 37°C zu halten. Eine Verbindung miteinander erhalten sie über PVC-Schläuche. Die Apparatur ist mit einer Quetschpumpe versehen, um das Eluat aus dem Auffangtrichter in das obere Reservoir zur Rezirkulation zu transportieren. Zwischen Auffangtrichter und Pumpe ist ein Drei-Wege-Hahn angebracht, mit dem es möglich ist, Flüssigkeit in den Abfallbehälter umzuleiten. Während der Perfusion wird das obere Reservoir mit Hilfe einer 2 ml-Einmalpipette kontinuierlich mit 95% O_2 und 5% CO_2 moderat

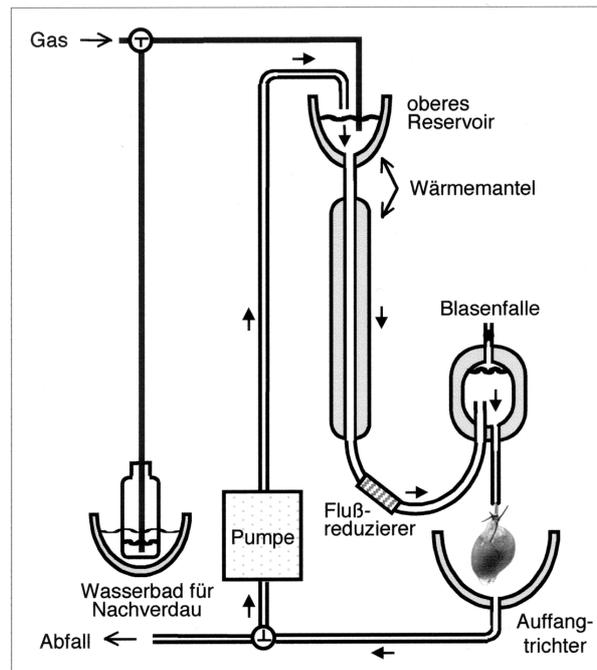


Abb. 7: Schematische Zeichnung der Langendorff-Perfusionsapparatur mit einem an der Aortenkanüle fixierten Herzen.

begast. Unabhängig von der eigentlichen Apparatur ist ein weiterer doppelwandiger, temperaturkontrollierter Behälter vorhanden, der mit A. dest. entsprechend gefüllt ist und nach Beendigung der Perfusion als Wasserbad für die 250 ml-Flasche zum eventuellen Nachverdau der frisch isolierten Zellen dient. Auch dieser Behälter wird moderat begast (Abb. 7).

1.1.3 Instrumente

Operationsbesteck, eine geriefte Aortenkanüle mit Gummiadapter, ein Stück Nylon (Netzgröße: 200 μm), ein Trichter, Einmalpipetten (Größen: 2, 5, 10, 20 ml) (Greiner), zwei 100 ml-Bechergläser, eine 250 ml-Flasche, 2 Petrischalen und Röhrchen mit Schraubverschluss (15 ml und 50 ml) (Falcon) und eine 2 ml-Spritze mit Kanüle. Alle diese Instrumente waren steril.

Desweiteren wurden eine Zentrifuge (Hettich), ein 37°C Inkubator (Heraeus) und eine Sterilbank (Nunc) benötigt.

1.1.4 Puffer

Ca²⁺-freier Perfusionspuffer (Perf. puffer)

110 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 10 mM HEPES und 11 mM Glukose

HEPES -Lösung

5,96 g HEPES, 1,0 g BSA (Fraktion V, frei von Fettsäuren, Sigma) in 50 ml A. dest., auf pH 7,2 eingestellt.

Kollagenase-Cocktail

30 mg Kollagenase (CLS2, Worthington Biochemical Corporation), 4 mg Pronase (Boehringer Mannheim) und 5 mg Trypsin (Sigma) in 10 ml Ca^{2+} -freiem Perfusionspuffer unter Zugabe von 40 μl CaCl_2 (siehe 1.2.1).

Heparin (Liquemin N 25000) (Roche)

1 ml Heparin (250 U/ml) in einer Spritze.

BSA (Sigma)

2,5 ml einer 20% BSA-Lösung

 CaCl_2 -Stammlösung (Boehringer Mannheim)

100 mM CaCl_2 in A. dest.

HES-Lösung (Hepes Enriched Salt - Lösung)

In 1 Liter A. dest. wurden folgende Bestandteile gelöst: 8,18 g NaCl, 0,37 g KCl, 0,144 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,235 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 6,0 g Glukose und 6,0 g HEPES. Die Lösung wurde auf pH 7,4 eingestellt.

Earle's Lösung

2,8 M NaCl, 16 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 1 \text{H}_2\text{O}$, 100 mM KCl, 500 mM Glukose

Tab. 2: Percoll-Dichtegradient (AmershamPharmacia Biotech AB)

	Ca^{2+} -freier Perf. puffer	100 mM CaCl_2	Percoll -18	HES- Lösung
Separation 1	30 ml	-	-	-
Sep.Percoll 1	-	20 ml	3,7 ml	6,3 ml
Sep.Percoll 2	-	20 ml	3,7 ml	6,3 ml
Separation 2	30 ml	150 ml	-	-
Separation 3	30 ml	600 ml	-	-
	Percoll	Earle's Lösung	HEPES	
Percoll-18	12,7 ml	700 μl	700 μl	

Separation 1-3, Sep.Percoll 1 und 2 wurden vor jeder Isolierung frisch hergestellt und im 37°C-Brutschrank mit losgelöstem Schraubverschluß gasäquiliert.

Die Reagenzien ohne genauere Angaben stammten von Roth, Sigma und Merck. Die Puffer und Lösungen wurden nach dem Ansetzen steril filtriert (Sterivex 0,22 µm, Millipore).

1.2 Methoden

1.2.1 Operationstechnik

Die Ratte wurde mit Isofluran (Roth) narkotisiert und anschließend in Rückenlage positioniert. Nach Desinfektion des Abdomens mit 70% Ethanol wurde die Bauchhöhle in der Linea alba weit eröffnet, wobei der Schnitt bis zum Xyphoid ausgedehnt wurde. An der rechten Bauchhöhlenwand wurde ein Entlastungsschnitt vorgenommen, um die Vena cava caudalis für die Heparininjektion darstellen zu können. Anschließend wurde der Thorax auf beiden Seiten ventrolateral durch Durchschneiden der Rippen eröffnet und das Diaphragma von den Rippen abgetrennt. Die vordere Brustwand wurde nach kranial geklappt und das Herz nach Eröffnung des Perikards vorsichtig durch Durchschneiden der Gefäße entnommen. Das Herz wurde sofort in ein Becherglas mit eiskaltem, Ca^{2+} -freien Perfusionspuffer verbracht.

1.2.2 Retrograde Herzperfusion

Nach vorsichtigem Entfernen von mediastinalem Gewebe in einer mit kaltem, Ca^{2+} -freien Perfusionspuffer gefüllten Petrischale wurde das Herz an der freipräparierten Aorta mit zwei Präparierpinzetten erfaßt, an der Kanüle der vorbereiteten Langendorff-Perfusionsapparatur (Zirkulation des gasäquilierten Ca^{2+} -freien Perfusionspuffers bei 37°C) angebracht und mit Hilfe einer Klemme fixiert. Die Klemme wurde anschließend durch eine Ligatur mit einem Faden ersetzt.

Bei der Fixation des Herzens an der Apparatur muß darauf geachtet werden, daß die Semilunarklappe nicht penetriert wird und beide Koronarostien perfundiert werden können (Abb. 8).

Die Flußrate wurde auf ungefähr ein Tropfen/Sekunde reguliert und der untere Auffangtrichter zur Seite bewegt, damit das blutige Eluat nicht in das Perfusionssystem gelangen konnte. Während dieser ungefähr 5 min dauernden Vorperfusion wurde die Kollagenaselösung vorbereitet.

Aus dem oberen Reservoir wurden 10 ml Ca^{2+} -freier Perfusionspuffer entnommen und zusammen mit 40 μl CaCl_2 zum Kollagenase-Cocktail pipettiert. Nach Einstellen der Menge des Ca^{2+} -freien Perfusionspuffers auf 100 ml im Langendorffsystem wurde die CaCl_2 -Kollagenase-Lösung in das obere Reservoir zur Rezirkulation gegeben. Anschließend wurde der untere Auffangtrichter unter bzw. um das Herz positioniert und mit einem Stück Parafilm bedeckt.

Die Perfusion dauerte empirisch zwischen 20-25 min. In der Zwischenzeit wurde der Postperfusionspuffer vorbereitet, indem 40 ml des Puffers aus dem Langendorffsystems entnommen und mit 2,5 ml BSA in einer 250 ml-Flasche vermischt wurden. Dieser Puffer wurde an dem oben beschriebenen unabhängigen Behälter begast und erwärmt.

1.2.3 Zerschneiden des Herzens und Filtration der Zellsuspension

Nach ungefähr 25 min wurde das sehr weiche Herz von der Apparatur entfernt. In einer Petrischale, gefüllt mit Postperfusionspuffer, wurden die Ventrikel freipräpariert, indem die Vorhöfe und die Aorta zusammen mit der Kanüle entfernt wurden. Die Ventrikel wurden mit Hilfe der gebogenen feinen Schere in kleine Stückchen breiig geschnitten und zum 2-3 min dauernden Nachverdau in die 250 ml Flasche gegeben. In der Zwischenzeit fand eine Überprüfung der isolierten Kardiomyozyten mit Hilfe des Lichtmikroskops statt. Lagen die Zellen einzeln vor, so wurde die Zellsuspension direkt durch den Nylonfilter in ein 50 ml-Röhrchen filtriert.

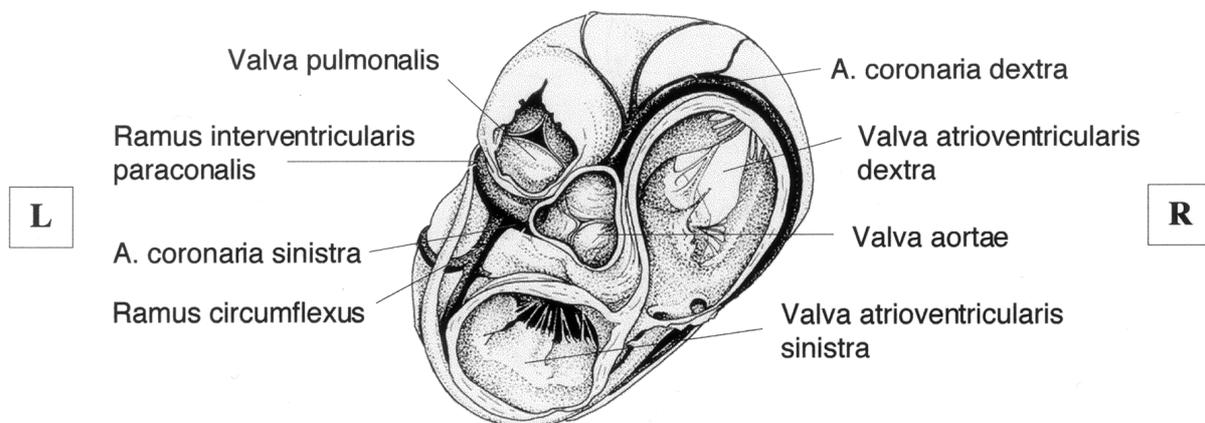


Abb. 8: Dorsalansicht des Herzens nach Entfernung der beiden Vorhöfe. Die Koronararterien sind freigelegt. Bei der Kanulierung der Aorta für die Perfusion muß darauf geachtet werden, daß sich das Kanülenende oberhalb der Abzweigung der Koronararterien befindet, damit das Myokard perfundiert wird (modifiziert nach Dyce, Sack, Wensing: Anatomie der Haustiere ¹¹⁶)

1.2.4 Zentrifugation mit Dichtegradient

Die filtrierten Zellen wurden 3 min bei 220 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Saugvorrichtung bis Marke 5 ml entfernt, das Zellpellet mit Separation 1 (siehe Kapitel III, 1.1.4) aufgelöst und bei 220 rpm 3 min abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes bis Marke 5 ml wurden 800 µl Percoll-EH hinzugefügt und das Zellpellet vorsichtig aufgelöst. Diese konzentrierte Zellsuspension wurde unter Vermeidung einer Lösungsvermischung auf die Röhrchen mit dem viskösen Percollgradienten Sep.Percoll 1 und 2 gleichmäßig verteilt und 5 min bei 220 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde jeweils bis Marke 1,5 ml aspiriert, die Zellsuspensionen in das Röhrchen Separation 2 überführt und ebenfalls bei 220 rpm 3 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum bis Marke 5 ml aspiriert und das Zellpellet mit Separation 3 aufgelöst. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 220 rpm und Aspiration des Überstandes wurden die Zellen in das im Inkubator auf 37°C erwärmte Kulturmedium (siehe Kapitel III, 2.1.2) pipettiert.

2. Primärkultur

Für diese Studie wurde das sogenannte Redifferenzierungsmodell adulter Kardiomyozyten der Ratte in Kultur verwendet.

2.1 Material

2.1.1 Zellen

Es wurden frisch isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten von adulten Wistar-Ratten verwendet (Isolierung siehe Kapitel III, 1).

2.1.2 Medium

Das Kulturmedium 'Medium 199' wurde angereichert mit 5 mM Kreatin, 2 mM L-Karnitin, 5 mM Taurin, 25 mM HEPES, 0,1 mM Insulin (Sigma), 10 mM Arabinosid Cytosin (Sigma), 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin und 10% FCS (fetales Kälberserum) (Sigma). Das Medium wurde mit 5 M NaOH auf pH 7,4 eingestellt, sterilfiltriert (Sterivex/Millipore) und bei 4°C aufbewahrt.

2.1.3 Objektträger für die Zellkultur

Es wurden spezielle Objektträger (Nunc), sogenannte '8-well chamber slides' verwendet, die aus einem Objektträger mit abnehmbarem Kompartimentaufbau, beides aus Plexiglas gefertigt, bestehen. Mit diesen 'Kulturobjektträgern' ist es möglich, die Zellen direkt auf dem Objektträger zu kultivieren (Abb. 9).

2.1.4 Lamininbeschichtung

Die Objektträgerbeschichtung mit Laminin (25 µg/ml) (Beckton Dickinson) kann auch am Vortag der Isolierung erfolgen. Sechs der acht Kompartimente (Abb. 9) der Objektträger wurden mit 200 µl der Lamininsuspension beschichtet und 1 h bei 37°C in einem 95% O₂ / 5% CO₂-Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Lamininsuspension abgesaugt und durch 300 µl Medium 199 + 10% FCS (siehe Kapitel III, 2.1.2) ersetzt. Sämtliche Arbeitsschritte wurden in einer Sterilbank durchgeführt.

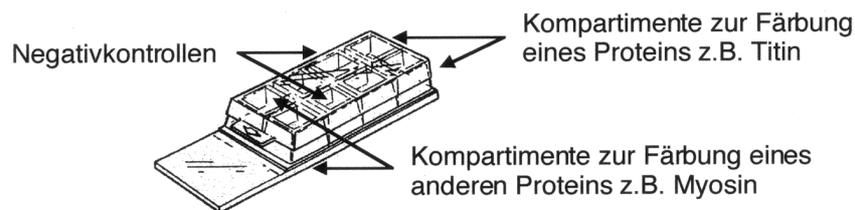


Abb. 9: Kulturobjektträger 'chamber slide'.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die frisch isolierten Zellen (siehe III, 1.2.4) wurden unter der Sterilbank in einer Konzentration von ungefähr 2×10^4 Zellen/Kompartiment auf die Objektträger verbracht, indem das sich in den vorbereiteten Kompartimenten befindliche Medium durch 300 µl der Zellsuspension (Kardiomyozyten + Medium 199 + 10% FCS) ersetzt wurde. Für die Inkubation wurde der schon beschriebene Brutschrank verwendet.

2.2.2 Mediumwechsel

Drei Stunden nach Ausplattieren der Zellen wurde der erste Mediumwechsel mit Medium 199 + 10% FCS durchgeführt, wobei nur etwa 100 µl des Mediums ausgetauscht wurden, um die Zellen in ihrer Anheftungsphase nicht zu stören. In

der anschließenden Kulturperiode wurden jeden zweiten Tag 250 µl des alten Mediums durch frisches ersetzt.

3. Quantitative Analyse zellulärer Phänotypen

3.1 Material

3.1.1 Zellen

Für diese Studie wurden drei unabhängige Kulturen frisch isolierter Kardiomyozyten von adulten Wistar-Ratten verwendet (Isolierung und Kultur siehe Kapitel III, 1 und 2).

3.1.2 Mikroskope

Zur Beurteilung der Zellen in Kultur wurde ein Phasenkontrastmikroskop (Zeiss) verwendet. Dem Mikroskop war ein Videogerät mit Printer (Sony) angeschlossen.

Die immunzytochemisch gefärbten Zellpräparate wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop der Firma Leica (Leica TCS 4D) ausgewertet.

3.1.3 Antikörper

Die Kardiomyozyten wurden mit folgenden Antikörpern gefärbt:

Tab. 3: Primärantikörper:

Name	Klon	Wirt	Konz.	Firma
α-Aktinin	EA-53	Maus	1:200	Sigma
Myosin	NOQ7.5.4D	Maus	1:250	Sigma
Titin	T42	Maus	1:5	freundlichst überlassen von Herrn Prof. Fürst
Titin	anti-z1z2	Kanin-chen	1:10	freundlichst überlassen von Herrn Prof. Labeit
Myomesin	B4	Maus	1:5	freundlichst überlassen von Herrn Prof. Eppenberger

Tab. 4: Sekundärantikörper

Name	Wirt	Konz.	Firma
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG	Esel	1:100	Jackson ImmunoResearch
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG	Esel	1:200	Jackson ImmunoResearch

Bei den Primärantikörpern handelt es sich mit Ausnahme des polyklonalen Titinantikörpers anti-z1z2 um monoklonale IgG Antikörper. Als Sekundärantikörper wurden die entsprechenden biotinylierten Esel-anti-Maus oder Esel-anti-Kaninchen IgG (H+L) Antikörper (Jackson ImmunoResearch) verwendet, und als Detektions- bzw. Verstärkungssystem diente Cy-2 Streptavidin (Rockland), das eine hohe Affinität zu Biotin auszeichnet. Außerdem wurden die Zellen für F-Aktin unter Verwendung von TRITC-konjugiertem Phalloidin (Sigma) angefärbt.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur über einen Zeitraum von 28 Tagen

Die Kardiomyozyten wurden gemäß des Protokolls (siehe Kapitel III, 2) behandelt. Mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops konnten die Kardiomyozyten bezüglich ihres Wachstums- bzw. Ausbreitungsverhaltens und ihrer Kontraktilität beurteilt werden. Dokumentiert wurden die Ergebnisse anhand von Videoausdrucken.

3.2.2 Immunzytochemie

Um das typische Ausbreitungsmuster der Zellen darzustellen, wurden sie an neun verschiedenen Tagen innerhalb eines Zeitraums von 28 Tagen, d.h. an den Tagen 3, 5, 8, 10, 12, 16, 20, 24 und 28, fixiert und immunzytochemisch gefärbt. Die Färbung von F-Aktin diente dabei der Darstellung der Gesamtzellfläche, und die Färbungen für Titin, Myosin, α -Aktinin, und Myomesin als sarkomere Marker sollten Aufschluß über die Phase der Redifferenzierung geben.

Je zwei der äußeren Kompartimente (Abb. 9) wurden mit dem Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung beschichtet (Doppelansatz). Als Negativkontrolle diente eines der mittleren Kompartimente, bei dem die Inkubation mit dem ersten Antikörper ausgelassen wurde. Auf einem Objektträger konnten somit zwei verschiedene Antikörper (drei Kompartimente/Antikörper) getestet werden; es wurden Titin/Myosin und α -Aktinin/Myomesin auf einem Objektträger verwendet. Das Färbeprotokoll wird im Kapitel III, 5.2.1 beschrieben.

3.2.3 Quantitative Analyse

Die Kardiomyozyten der drei aufeinanderfolgenden Kulturen wurden mit Hilfe des konfokalen Mikroskops aufgrund der F-Aktinfärbung bezüglich ihrer Form stäbchenförmig (a), abgerundet (b) und ausgebreitet (c-e) eingeteilt. Mit Hilfe des Programmes LEICA SCANware 05.1b Software zur Bestimmung der Zellflächen

war es möglich, die ausgebreiteten Zellen in drei Gruppen unterschiedlicher Zellgröße zu unterteilen: 500-6000 μm^2 (c), 6001-12000 μm^2 (d) und >12000 μm^2 (e). Die Kardiomyozyten wurden somit in fünf Gruppen eingeteilt.

An den neun oben beschriebenen Zeitpunkten wurden pro Färbung zehn Gesichtsfelder (d.h. mindestens 100 Zellen) mit dem 25x Immersionsobjektiv ausgezählt. Da im Doppelansatz gefärbt wurde, wurden also je fünf Felder der ehemaligen Kompartimente (Ecken und Mitte) zur Auswertung herangezogen. Auf diese Weise wurden mindestens 3600 Zellen pro Kultur ausgewertet. Die Daten wurden als Prozente der Gesamtzellzahl graphisch dargestellt.

3.2.4 Konfokale Mikroskopie zur Beurteilung der De- und Redifferenzierung

Von den zellulären Phänotypen wurden konfokale mikroskopische Bilder angefertigt, die aufgrund der Doppelfärbung von F-Aktin mit den verschiedenen sarkomeren Markern die Phasen der De- und Redifferenzierung dokumentieren. Es wurden Übersichtsbilder mit dem 25x Immersionsobjektiv und Detailaufnahmen mit dem 40x Immersionsobjektiv mit Verwendung der Funktion 'Zoom' (Vergrößern) angefertigt.

4. Antisense-Oligodesoxynukleotid-Experimente

Das Prinzip der Antisense-Strategie besteht in der Hemmung der Translation eines bestimmten Proteins durch einen sequenzspezifischen Inhibitor (Antisense-Oligodesoxynukleotid), der komplementär (antisense) zu der mRNA (sense - sinngebend) des betreffenden Proteins unter Ausbildung einer kurzen doppelsträngigen Region, welche die Translation verhindert, bindet.

Mit Hilfe von Antisense-Oligodesoxynukleotiden, die spezifisch gegen die mRNA von Titin gerichtet sind, soll der Einfluß von Titin auf die Inkorporation der Myosinfilamente in die Sarkomeren aufgezeigt werden (Abb. 10).

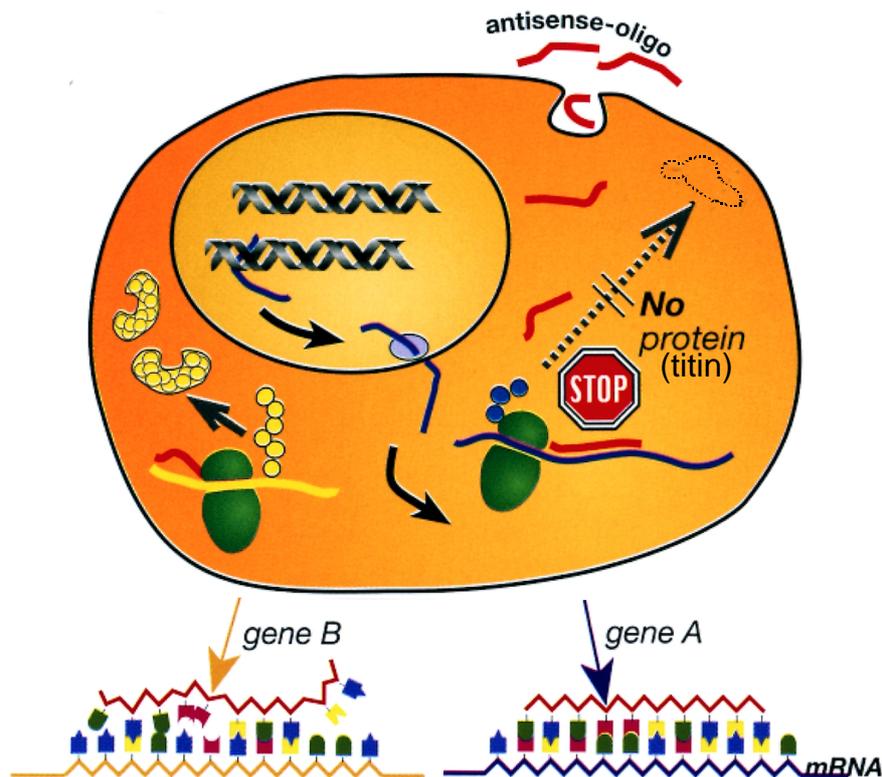


Abb. 10: Antisense-Strategie.

Die Antisense-Oligodesoxynukleotide (rot, antisense-oligo) werden aufgenommen und hybridisieren mit der mRNA (sense), welche die komplementäre Sequenz enthält (Gen A, hier: Titin). Andere Gene dürfen diese Sequenz nicht enthalten, damit die Oligodesoxynukleotide nicht binden können (Gen B, z.B. α -Aktinin oder Myosin). Bei einer ausreichenden Duplexformierung kommt es zu einer Hemmung der Translation (modifiziert nach Schlingensiepen, Brysch, Schlingensiepen: Antisense – From Technology to Therapy ¹¹⁷).

4.1 Material

4.1.1 Zellen

Es wurden drei Kulturen frisch isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten von adulten Wistar-Ratten verwendet (Isolierung und Kultur siehe Kapitel III, 1 und 2).

4.1.2 Phosphorothioat-Oligodesoxynukleotide (S-ODN)

Oligodesoxynukleotide (ODN) werden aufgrund der im Serum enthaltenen Nukleasen schnell abgebaut. Der Einbau von Phosphorothioatgruppen in die ODN, wobei ein nicht-bindendes Sauerstoffatom durch ein Schwefelatom ersetzt wird, führt zu einer entscheidenden Verlängerung der Halbwertszeit. Alle hier verwendeten ODN waren Phosphorothioat-modifiziert (S-ODN).

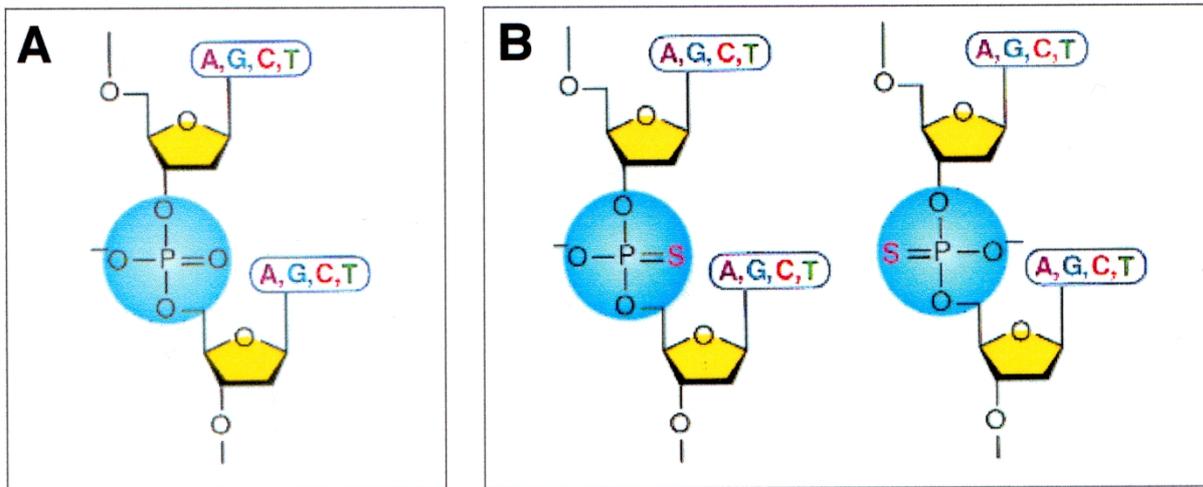


Abb. 11: DNA-Baustein

(A) DNA-Bausteine bestehen aus einer Base (A, T, C und G stehen für die Basen Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin), einem Zucker (Desoxyribose) und einer Phosphatgruppe.

(B) Einbau einer Phosphorothioatgruppe als stabilisierende Modifizierung. In der DNA wird ein nicht-bindendes Sauerstoffatom durch ein Schwefelatom ersetzt.

Bei den Antisense S-ODN handelt es sich um drei verschiedene 21 Basen lange, synthetische, einzelsträngige DNA-Sequenzen (BIG Biotech) mit einem durchschnittlichen GC-Gehalt. Sie sind komplementär zu zwei unterschiedlichen Regionen der mRNA von Titin (zentrale I-Band-Region und A-I-Übergangsregion). Da in der zentralen I-Band Region extensives differentielles Spleißen stattfindet¹¹⁸ und somit wenig 'stem-loops' vorliegen, welche durch ihre Auffaltung die Hybridisierung der kurzsträngigen S-ODN mit der mRNA erschweren, wurde diese Region für zwei S-ODN gewählt (siehe Abb. 13).

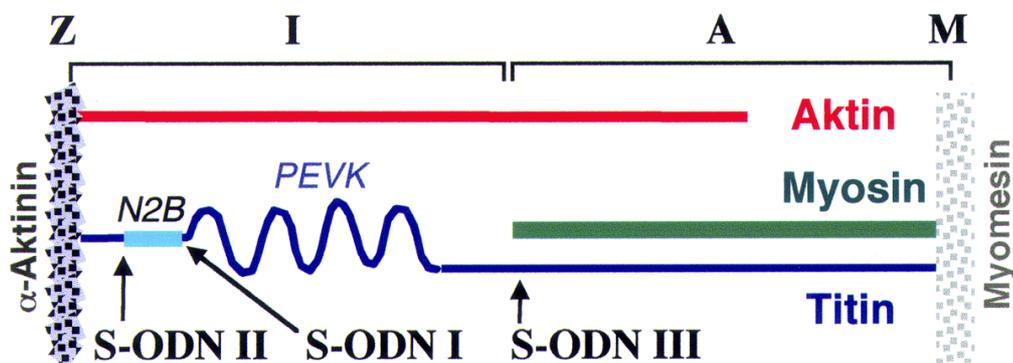


Abb. 12: Schematische Zeichnung der S-ODN Positionen im Halbsarkomer

Rattentitin cDNA-Sequenzen der zentralen I-Band-Region wurden aus einer Rattenskelettmuskel-Bibliothek (benutzte Genbank: Clontech, RL3003b) von Herrn Prof. Labeit und seinen Mitarbeitern vom EMBL (European Molecular Biology Laboratory) in Heidelberg isoliert, kloniert und sequenziert. Sie identifizierten ein 1086 bp-Fragment, welches für das Rattentitin in der differentiell gespleißten, zentralen I-Band-Region (N2-B-Region) kodiert. Die Sequenz ist in den Datenbanken 'EMBL/GenBank/DDBJ' unter der Zugriffsnummer AJ401157 erhältlich. Aus diesem cDNA-Fragment wurden von Herrn Prof. Labeit die entsprechenden Sequenzen für S-ODN I und II abgeleitet und freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Abb. 13 und 14).

Antisense S-ODN I: 5'- AGG TGA ATT TGG CTA GGT GGC - 3'

Antisense S-ODN II: 5'- GTA AGT TCC TTC GTC CTC AGG - 3'.

Die Anmerkungen in der Datenbank zu AJ401157 weisen auf den Ort der partiellen Ratten-cDNA innerhalb des I-Band-Titins und erleichtern den Vergleich zu den humanen Titinsequenzen x90568 und x90569⁷. Das Fragment kodiert Ig-Domänen I15-I27, die von Freiburg et al.¹¹⁸ beschrieben wurden. Antisense S-ODN-I korrespondiert mit der Ig-Domäne I27 und Antisense S-ODN II mit I15, welche in der Skelettmuskulatur im Gegensatz zur Herzmuskulatur direkt zusammen gespleißt wurden (Abb. 14).

```

II      1 gaagccttcc ctgaggacga aggaacttac gctttcgttg ctaataatgc tgtgggccaa
      61 gtgtccagca ccgccaccct gagactggaa gcccttgagt caattttaca tgagcagatc
     121 tgccagcaaaa ttgaaatgga gatgaaagct gccctgtga tcaaaggag aattgagccc
I      181 ttggaagtag ctctgggcca cctagccaaa ttcacctttg agatccaagg agcccccaat
     241 gtccggttcc agtggttcaa agctggcaga gagatztatg agagcgacaa gtgttccatt
     301 cgatcttcga actacatctc cagcctggag atcctgagga cccaggtegt tgactgtggc
     361 gagtatacct gcaaagcctc caacgagtat ggcagtgtca gctgcaccgc cagcgtgacc
     421 gtgacagagg cgtatccacc aacctttctc tccaggccca agtccttac gactttcgtg
     481 ggtaaggcag ccaagtttct ctgcacagtg tcagggactc cggtgattga gaccatctgg
     541 cagaaagacg gtactgccct gtcgccgtca cctgactgcc ggatcacaga cgcagacaac
     601 aagcacagtt tagaactctc aaatcttact gttcaggaca ggggtgttta ctcttgaag
     661 gcttctaaca aattcggagc agatatctgc caagccgagt tgaccatcat tgacaaacc
     721 cacttcatta aagagttgga gcctgtgcag tccgccatca ataagaagat ccacctgaa
     781 tgccaagtag atgaggatag gaaagttagc atcacgtgga gcaaagatgg gcaaaaactg
     841 cccgctggga aagactacaa gatctatttt gaagataaaa tagcatcact tgagattcct
     901 ctggccaaac tcaaagattc gggaacctat tcatgcacag cttccaatga ggctgggagc
     961 agttcctcgt ctgccacagt cgcgggtccga gaaccgcat ccttcgtgaa agaaggtgga
    1021 tscctcttat ttaatgctcc cgggcgaatc agcgcgcctc cattgcaagc tgaagggtc
    1081 acctgt

```

Abb. 13: Die Sequenz des 1086 bp cDNA-Fragments ist in den Datenbanken unter der Nummer AJ401157 angemeldet. Von den markierten Sequenzen wurden Antisense S-ODN I (I: bp: 217-197) und II (II: bp: 30-10) abgeleitet (komplementär und in umgekehrter Reihenfolge).

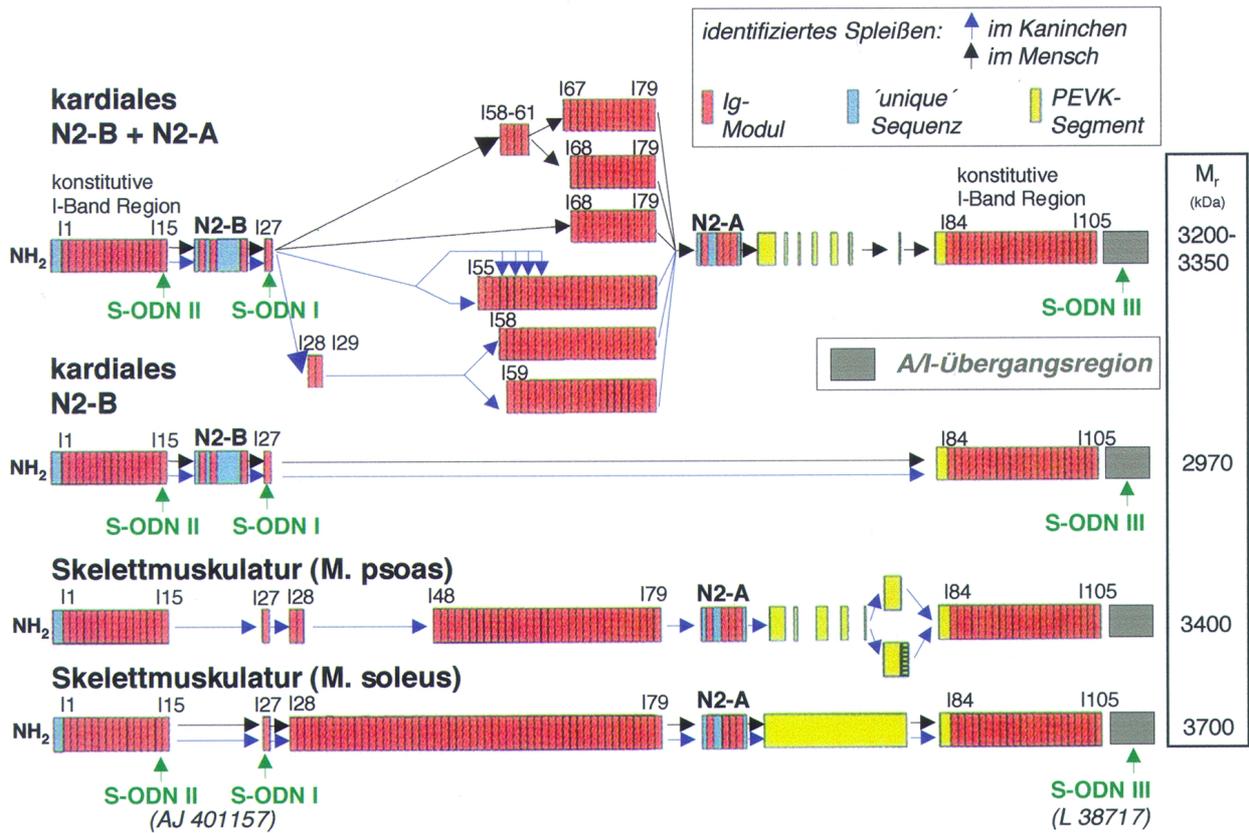


Abb. 14: Überblick über differentielle Spleißvorgänge in der I15-I84-Region (zentraler I-Band-Bereich) der Herz- und Skelettmuskulatur. Identifizierte Spleißrouten sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Molekulargewichte der verschiedenen Isoformen sind rechts angegeben. Alle Isoformen besitzen das I27-Exon, gewebespezifische Varianten treten 5' und 3' dieses Exons auf (modifiziert nach Freiburg et al. ¹¹⁸).

Das cDNA-Fragment mit der Zugriffsnummer AJ401157 (Datenbank) wurde von Herrn Prof. Labeit isoliert. Von diesem Fragment leiten sich die Antisense S-ODN I und II ab. Die Zugriffsnummer L38717 ¹¹⁹ kodiert für ein cDNA Fragment, von dem das in dieser Studie verwendete Antisense S-ODN III abgeleitet wurde.

```

III      1 atgtctgccc ctgcaacggt cctgaccca ccagagaatg taaagtggag agacagaact
        61 gccaacagca ttttctgac ctgggatcct ctaaaaaatg atggtggctc acgcatcaaa
       121 ggatacatag ttgaaaaatg tccacgtggt tctgataaat ggggtgcttg tggggaacct
       181 gttccagata caaaaatgga agtgacaggt ctagaagagg gaaaatggta cgcctaccgc
       241 gtgaaggcct tgaacaggca aggagctagc aagccaagca aaccacagag agaaatccag
       301 gcggtggaca ctcaggaggc toctgagatc ttccttgatg tgaagctcct ggctggcctc
       361 actgtgaaag ctggaacaaa gatcgaactt cctgctacgg tgactggaaa accggagccc
       421 aaaataactt ggacaaaggc tgataccctt ctgaggccag accaaagaat caccattgaa
       481 aatgttctta agaaatccac agtgacaatc acggacagca agagaagtga tacgggcaca
       541 tatatcatag aagctgtgaa cgtctgcggc cgggccactg ctgtggtgga agtgaatgct
       601 ttagataaac ccggaccgcc a
    
```

Abb. 15: Antisense S-ODN III wurde aus einer cDNA-Sequenz abgeleitet (III: bp 21-1) (komplementär und in umgekehrter Reihenfolge), die in den Datenbanken unter der Zugriffsnummer L38717 registriert ist.

Ein drittes Antisense S-ODN gegen Rattentitin wurde anhand einer cDNA-Sequenz entworfen, die Ig/Fn3 Domänen innerhalb der A-I-Übergangsregion von Titin kodiert und in den Datenbanken unter der Zugriffsnummer L38717¹¹⁹ abzurufen ist (Abb. 14 und 15).

Antisense S-ODN III: 5'- GAC CGT TGC AGG GGC AGA CAT - 3'.

Als Kontrolle wurden Random S-ODN verwendet, die die gleiche Basenkomposition wie ihre zugehörigen Antisense S-ODN aufwiesen, jedoch in veränderter Reihenfolge:

Random S-ODN I: 5'- GCG TGG GTT TCA GTG AAT GAG - 3'

Random S-ODN II: 5'- CTA ACT TGG TTG CTG GTC ACC - 3'

Random S-ODN III: 5'- CAG GCT GCG ACC GTG ATA GAG - 3'.

Diese Sequenzen wurden mit den existierenden cDNA-Einträgen des Rattentitins in der EMBL Datenbank verglichen, um eine mögliche Bindung auszuschließen.

4.1.2.1 Fluorescein-markierte S-ODN

Zur Demonstration der Aufnahme der S-ODN durch die Kardiomyozyten wurden 5-Fluorescein-markierte S-ODN (Antisense und Random) in Vorversuchen verwendet.

4.1.2.2 Fluorescein- und Cholesterol-markierte S-ODN

Um die Effizienz der S-ODN-Aufnahme zu erhöhen, wurden 5'-Fluorescein, 3'-Cholesterol-markierte S-ODN (Antisense und Random) in Vorversuchen eingesetzt.

4.1.3 Antikörper

Die Zellen wurden mit folgenden Antikörpern angefärbt:

Tab. 5: Primärantikörper:

Name	Klon	Wirt	Konz.	Firma
α -Aktinin	EA-53	Maus	1:200	Sigma
Myosin	NOQ7.5.4D	Maus	1:250	Sigma
Titin	anti-z1z2	Kanin-chen	1:10	freundlichst überlassen von Herrn Prof. Labeit

Tab. 6: Sekundärantikörper in den Versuchen mit markierten S-ODN

Name	Wirt	Konz.	Firma
Rhodamine-conj. AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG	Ziege	1:50	Jackson ImmunoResearch
Cy3-conjugated Donkey Anti-Rabbit	Esel	1:200	Chemicon

Die Färbung mit Phalloidin entfiel bei diesen Experimenten.

Tab. 7: Sekundärantikörper in den Versuchen mit unmarkierten S-ODN

Name	Wirt	Konz.	Firma
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG	Esel	1:100	Jackson ImmunoResearch
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG	Esel	1:200	Jackson ImmunoResearch

Desweiteren wurden die Zellen für F-Aktin unter Verwendung von TRITC-konjugiertem Phalloidin (Sigma) in einer Konzentration von 1:1000 angefärbt. Als Detektions- bzw. Verstärkungssystem diente Cy-2 Streptavidin (Rockland) in einer Verdünnung von 1:100.

4.1.4 Mikroskope und Bildverarbeitung

In Kultur wurden die Zellen mit dem oben beschriebenen Phasenkontrastmikroskop beurteilt. Die gefärbten Präparate wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop (LEICA TCS SP) ausgewertet. Die Bildverarbeitung der konfokalen Datensätze wurde mit den Programmen Imaris und Selima (Bitplane) an einer Indy-Workstation (Silicon Graphics) durchgeführt.

4.2 Methoden

4.2.1 Versuchsprotokoll der S-ODN-Experimente

Die Kardiomyozyten wurden gemäß des Protokolls (siehe III, 2) frisch isoliert und in Kultur gebracht. Zellen einer Isolierung wurden in drei Gruppen unterteilt, um die drei Antisense S-ODN an derselben Kultur testen zu können. Als Kontrollpräparate dienten Random S-ODN behandelte und unbehandelte Zellen. Ab dem 5. Tag nach der Isolierung (Tag 0) wurden jeden zweiten Tag 10 μmol S-ODN in das Medium, das zum Mediumwechsel bestimmt war, pipettiert. Es

wurden 250 μ l Medium ausgetauscht. Am 8., 12. und 16. Tag wurden die Kardiomyozyten fixiert und immunzytochemisch gefärbt (Tab. 8).

Tab. 8: Versuchsprotokoll der S-ODN Behandlung. Die Zeitpunkte sind durch Kreuze gekennzeichnet.

Tag	0	3h	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Medium- wechsel		×		×			×		×		×		×		×		×	
10 μ mol S-ODN							×		×		×		×		×		×	
Unter- suchung										×				×				×

Die im Vorfeld durchgeführte Dosis-Wirkungskurve ergab, daß 10 μ mol S-ODN alle 48 Stunden die deutlichste Wirkung bezüglich der reduzierten Titinmarkierung, der veränderten Myosininkorporation und der Überlebenszeit der Zellen erzielte. Niedrigere Dosen (0,5, 2 und 5 μ mol S-ODN) waren weniger oder nicht effektiv, höhere Dosen als 10 μ mol S-ODN zeigten Vergiftungserscheinungen, die sich durch die Bildung von zahlreichen zellulären Vakuolen und herabgesetzter Überlebenszeit äußerten. Diese toxischen Effekte waren ebenfalls bei Random S-ODN zu beobachten.

4.2.2 Immunzytochemie

4.2.2.1 Experimente mit markierten S-ODN

Je zwei Kompartimente wurden mit dem entsprechenden Antikörper gefärbt (Tab. 5), ein Kompartiment diente als Negativkontrolle. Während Titin und Myosin auf demselben Objektträger getestet (drei Kompartimente/Antikörper) wurden, wurde α -Aktinin separat gefärbt. Da die S-ODN mit einem grünen Farbstoff (Fluorescein) markiert waren, wurde eine Einzelfärbung mit einem Sekundärantikörper, der mit einem roten Farbstoff (Rhodamin, Cy-3) konjugiert war (Tab. 6), durchgeführt. Die Färbung für F-Aktin mittels Phalloidin entfiel in diesem Falle. Im Kapitel 'Immunzytochemie' III, 5.2.1 werden das Färbeprotokoll und Informationen zu den einzelnen Schritten ausführlich beschrieben.

4.2.2.2 Experimente mit unmarkierten S-ODN

Das Färbeprotokoll entspricht dem Protokoll aus Kapitel III, 5.2.1 unter Verwendung der in Tabelle 5 angegebenen Primärantikörpern und den in Tabelle 7 angegebenen Sekundärantikörpern. Außerdem wurde F-Aktin mit Phalloidin

angefärbt, so daß in diesem Fall eine Doppelfärbung vorlag. Die Kardiomyozyten wurden ebenfalls im Doppelansatz mit Negativkontrolle gefärbt, wobei Titin und Myosin auf einem Objektträger kombiniert wurden (drei Kompartimente/Antikörper) und α -Aktinin separat gefärbt wurde.

4.2.3 Konfokale Lasermikroskopie und Bildverarbeitung

Von den unterschiedlich behandelten und gefärbten Kardiomyozyten wurden am 8., 12. und 16. Tag mit Hilfe des Konfokalen Mikroskops Bilder erstellt. Von den Zellen wurde in der Z-Ebene Schichtbilder (sogenannte Serien) im Abstand von 0,2-0,5 μm hergestellt. Diese digitalen optischen Schnitte wurden auf die Indy-Workstation zur weiteren Bearbeitung übertragen. Mit dem Softwareprogramm Imaris ist es möglich, einen 'extended focus' zu erstellen, d.h. die in der Z-Dimension aufgenommenen Einzelschnitte werden in einer Fokusebene abgebildet, wobei jeder Punkt im Endbild mit der im gesamten Datensatz maximal vorkommenden Helligkeit dargestellt wird. Der Ausdruck der Bilder erfolgte mit einem Tintenstrahldrucker (Epson). Weiterhin konnten Schattenprojektionen erstellt werden, die einen dreidimensionalen Eindruck vermitteln. Um speziell die Aufnahme der S-ODN in die Kardiomyozyten zu zeigen, wurde die Funktion 'section mode' angewendet. Mit diesem Modus ist es möglich, optische Schnitte durch die zu untersuchende Zelle zu legen und die Schnittflächen der beiden Achsen im Längs- und Querschnitt - in diesem Fall das Zytoplasma und die Zellkerne - zu betrachten.

4.2.4 Quantitative Analyse der Fläche der Myosinquerstreifung zur Gesamtzellfläche

Am 12. und 16. Tag wurde das Verhältnis zwischen der Gesamtfläche von Myosin in quergestreifter Form und der Gesamtzellfläche von 40 Zellen aus jeder Gruppe, sowohl Antisense S-ODN als auch Random S-ODN behandelte und unbehandelte Zellen, bestimmt. Zehn zufällig ausgewählte Gesichtsfelder wurden mit dem 40x Objektiv erfaßt, und je vier Zellen, die folgende Kriterien erfüllten, wurden ausgewertet: ausgebreitet mit einer Zellfläche $> 1000 \mu\text{m}^2$, positiv bei der F-Aktin-Färbung mit Phalloidin, Vorhandensein von Myosinquerstreifung. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des konfokalen Mikroskops (Leica TCS 4D) und der integrierten Software LEICA SCANware 05.1b. Die Daten wurden in das Programm Macintosh Excel überführt, und die statistische Analyse wurde entweder mit ANOVA und Bonferroni's Multiplen Vergleichstest oder dem Kruskal-Wallis Test mit anschließendem multiplen Vergleich durch den Dunn's Test durchgeführt.

4.2.4.1 Quantitative Analyse der Gesamtzellflächen

Die in III, 4.2.4 erhaltenen Werte der Gesamtzellflächen der einzelnen Gruppen wurden miteinander verglichen. Die durchschnittliche Gesamtzellfläche der unbehandelten Zellen betrug 100% und diente somit als Vergleichswert für die S-ODN-behandelten Zellen. Die statistische Analyse wurde wie in Kapitel III, 4.2.4 durchgeführt.

5. Immunzytochemie

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.

5.1 Material

5.1.1 Antikörper

5.1.1.1 Primäre Antikörper

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene monoklonale (Wirtstier: Maus) und polyklonale (Wirtstier: Kaninchen) Antikörper verwendet (siehe auch Kapitel III, 3.1.3 und 4.1.3):

Tab. 9: Primäre Antikörper

Name	Klon	Wirt	Konz.	Firma
α -Aktinin	EA-53	Maus	1:200	Sigma
Myosin	NOQ7.5.4D	Maus	1:250	Sigma
Titin	T42	Maus	1:5	freundlichst überlassen von Herrn Prof. Fürst
Titin	anti-z1z2	Kaninchen	1:10	freundlichst überlassen von Herrn Prof. Labeit
Myomesin	B4	Maus	1:5	freundlichst überlassen von Herrn Prof. Eppenberger

Monoklonale Antikörper zeichnen sich durch ihre hohe Spezifität aus, da sie nur gegen eine Determinante des Antigens gerichtet sind im Gegensatz zu polyklonalen

Antikörpern, die auf unterschiedliche Determinanten ansprechen, was jedoch eine Steigerung der Reaktivität bei diesen Antikörpern bewirkt.

5.1.1.2 Sekundäre Antikörper

Es wurden abhängig vom jeweiligen Versuch verschiedene Sekundärantikörper verwendet:

Tab. 10: Sekundäre Antikörper

Name	Wirt	Konz.	Firma
Rhodamine-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG	Ziege	1:50	Jackson ImmunoResearch
Cy3-conjugated Donkey Anti-Rabbit	Esel	1:200	Chemicon
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG	Esel	1:100	Jackson ImmunoResearch
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG	Esel	1:200	Jackson ImmunoResearch

Die ersten beiden Sekundärantikörper, beide mit roten Farbstoffen (entweder Rhodamin oder Indocarbocyanin) konjugiert, fanden in der unten beschriebenen indirekten Methode Anwendung. Die biotinylierten Sekundärantikörper wurden in der indirekten Avidin-Biotin-Methode eingesetzt.

5.1.1.3 Detektionssystem bei der Anwendung biotinylierter Sekundärantikörper

Tab. 11: Detektionssystem

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

Bei Cy-2 handelt es sich um ein grünfluoreszierendes Carbocyanin. Es ist aufgrund seines sehr hohen Extinktionskoeffizienten sehr leuchtintensiv. Von Vorteil ist seine Langzeitstabilität, da die immunzytochemisch gefärbten Präparate relativ instabil sind (Ausbleichen). 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.

5.1.1.4 Puffer

PBS, pH 7,4:

Für die Stammlösung wurden 397,4 g NaCl, 10 g KCl, 10 g H₂PO₄ und 88,75 g Na₂HPO₄ * H₂O in fünf Litern A. dest. aufgelöst.

Die gebrauchsfertige, auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellte Lösung bestand aus 500 ml der Stammlösung und 4500 ml A. dest..

4% PFA, pH 7,4

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

Inkubationspuffer:

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

Mowiol:

Das schwer lösliche Mowiol (Hoechst) wird bis zu 16 Stunden in PBS gerührt. Anschließend wird es bei 12000 rpm abzentrifugiert und der Überstand im Kühlschrank bei 8°C gelagert.

Instrumente:

Eine Wasserstrahlpumpe mit Pasteurpipette zum Aspirieren der Lösungen aus den Kompartimenten, feuchte Kammer, Pipetten und Spitzen, verschiedene Standküvetten, Deckgläschen (25 x 50 mm) (Marienfeld).

5.2 Methoden

In dieser Studie wurden ausschließlich 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. Diese Methode kam bei den Versuchen zur Demonstration der Aufnahme Fluorescein-markierter S-ODN in die Kardiomyozyten zum Einsatz. Hier handelte es sich um eine Einzelfärbung, da nur ein Protein dargestellt wurde.

Bei den anderen Experimenten (Kapitel III, 3.2.2 und III, 4.2.2.2) wurde die indirekte Avidin-Biotin-Methode durchgeführt, die zugleich eine Doppelfärbung darstellt, da neben dem eigentlichen Protein eine F-Aktin-Färbung mit Phalloidin durchgeführt wurde. Avidin, ein Hühnereiweiß-Glykoprotein, hat eine hohe Bindungsaffinität zu dem Vitamin Biotin. Avidin kann durch Streptavidin, ein

Protein von *Streptomyces avidinii*, ersetzt werden. Bei der hier vorgestellten Methode ist der sekundäre Antikörper biotinyliert. Im nächsten Schritt bindet Streptavidin konjugiert mit Cy-2 (grünfluoreszierendes Carbocyanin) an den biotinylierten Sekundärantikörper. Es kommt zu einer Verstärkung des Signals, da mehrere Cy-2-Streptavidin-Komplexe an Biotin (vier Bindungsstellen) binden können.

5.2.1 Färbeprotokoll

Die Objektträger wurden während der Inkubationszeiten in einer feuchten Kammer aufbewahrt, um ein Verdunsten der Lösungen und ein Ausbleichen zu verhindern. Schritte Nr. 9 b, 11 und 12 wurden bei der indirekten Avidin-Biotin-Methode (siehe Kapitel III, 3.2.2 und 4.2.2.2) zusätzlich durchgeführt. Der Plexiglaskompartiment-aufbau wurde vom Objektträger nach Schritt Nr. 8 abgenommen.

Tab. 12: Protokoll für die immunzytochemische Färbung

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	RT	3 h
9b	zusammen mit 9 a	Phalloidin (1:1000)		
10	Spülen	PBS	RT	3 x 3 min
11	Inkubation	Streptavidin	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 Hintergrundreaktion (Background) zu erhalten.

Inkubation der Kardiomyozyten mit dem Primärantikörper

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

Negativkontrolle

Die Kardiomyozyten, die als Negativkontrolle zur Überprüfung der Methode dienen sollten, wurden gleichermaßen behandelt, jedoch ohne Einsatz des Primärantikörpers, statt dessen wurde Inkubationspuffer verwendet.

Inkubation der Kardiomyozyten 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 (Primärantikörper + F-Aktin) wurde TRITC-konjugiertes Phalloidin zusammen mit dem Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet.

Eindecken 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 aufbewahrt. Das Mowiol kann hierbei auspolymerisieren, und die Präparate werden vor dem Ausbleichen geschützt.

6. Konfokale Lasermikroskopie und Bildverarbeitung

6.1 Material

6.1.1 Konfokale Lasermikroskope

In dieser Studie kamen zwei verschiedene Konfokale Lasermikroskope der Firma Leica zum Einsatz. Das ältere Modell LEICA TCS 4D, das einen Argon-Krypton-Mischgaslaser beinhaltet 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 Wellenlängebereiche 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' (beide von LEICA).

Die Wellenlängen der Anregungsbereiche der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe betragen wie folgt: FITC 494 nm, TRITC 554 nm, Cy-2 489 nm, Cy-3 550 nm.

6.1.2 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 und Selima (Bitplane) ausgestattet. Die erstellten Bilder wurden mit einem Tintenstrahldrucker (Epson) ausgedruckt.

6.2 Methoden

6.2.1 Erklärung des konfokalen Prinzips

Mittels dreier grundlegender Merkmale liefern Konfokale Mikroskope ein hochaufgelöstes Bild einer beliebigen Ebene des Präparats:

- Beleuchten eines sehr kleinen Areal
- Fokussieren des von dort emittierten Lichts auf die Öffnung einer brennpunktgleich (konfokal) ausgerichteten Blende
- Abtasten des Präparats im Rasterverfahren

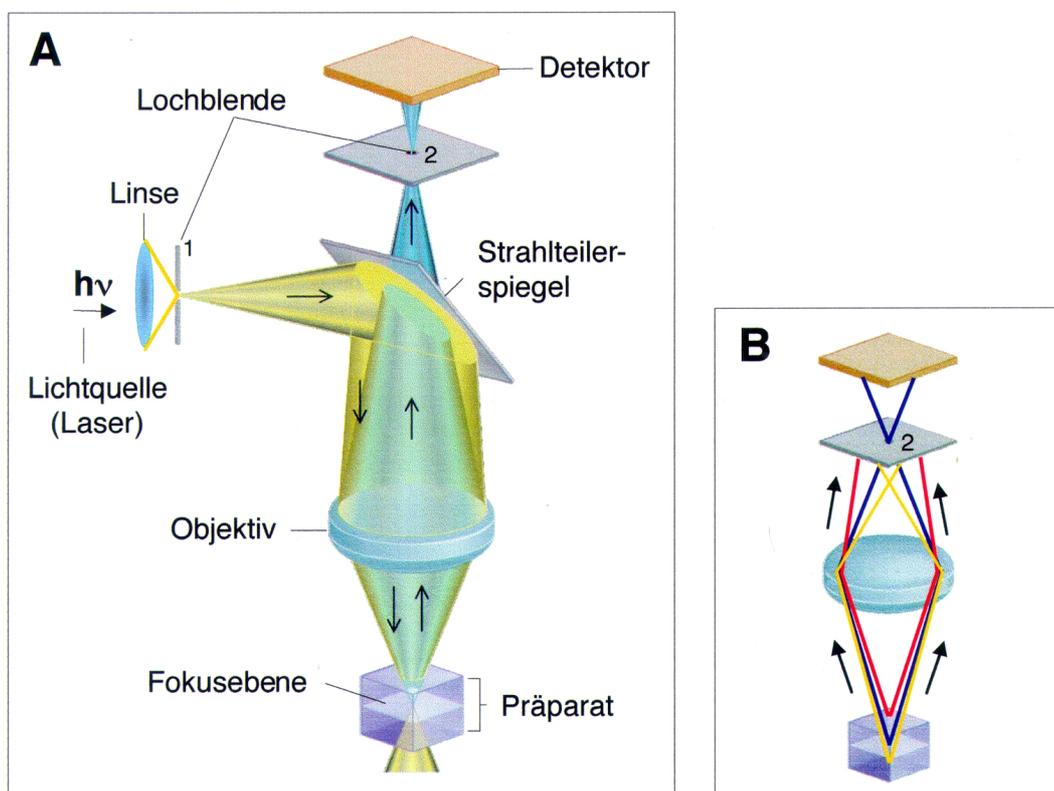


Abb. 16 Das konfokale Prinzip (modifiziert nach Lichtman: Konfokale Mikroskopie ¹²⁰)

(A) Laserstrahlen werden mit einer Linse in die Öffnung einer Lochblende (1) fokussiert. Mit Hilfe eines Spiegels werden sie in das Objektiv weitergeleitet, welches sie auf einen Punkt in der gewünschten Tiefe des Präparats bündelt. Das vom Präparat emittierte Licht (blau) wird vom Objektiv erfasst und durch den Strahlenteilerspiegel auf die Öffnung einer Lochblende (2) fokussiert, hinter der sich der Detektor befindet. Die Vorrichtung für die Rasterung ist nicht dargestellt.

(B) Die Lochblende (2) schirmt Strahlen, die von höher (rot) oder tiefer (gelb) gelegenen Schichten kommen, zum größten Teil ab. Dieses Licht würde in der Abbildung eine Unschärfe hervorrufen.

Ein Spiegel lenkt die aus einer Lochblende kommenden, zur Anregung von Fluoreszenz verwendeten Laserstrahlen in ein Objektiv, das sie wiederum auf einen Punkt in der gewünschten Tiefe des Präparats bündelt. Das von dort emittierte Licht wird vom Objektiv erfaßt und durch den als Strahlenteiler fungierenden Spiegel auf die Öffnung einer weiteren Lochblende fokussiert, hinter der sich der Detektor befindet. Diese konfokale Blende ist entscheidend für eine scharfe Abbildung, da sie unerwünschtes Streulicht abschirmt (Abb. 16).

Zur Wiedergabe einer kompletten Fläche wird der Laserlichtstrahl im Rasterverfahren sehr schnell über das Präparat bewegt.

6.2.2 Dreidimensionale Bildverarbeitung

Während der Rasterung des Präparats in der Z-Ebene (Tiefe) entsteht ein Stapel von Schichtbildern. Diese optischen Schnitte werden als digitalisierte Datensätze auf die Indy-Workstation übertragen. Die durch die drei räumlichen Koordinaten (x, y und z) bezeichneten Bildelemente eines Objektvolumens nennt man Voxel in Anlehnung an Pixel (picture elements) einer zweidimensionalen Abbildung. Das Programm 'Imaris' ermöglicht durch Verarbeitung des Voxel-Datensatzes die dreidimensionale Darstellung des untersuchten Präparats. Diese räumliche Darstellung ist beliebig drehbar und mit Hilfe von optischen Schnitten (Quer- und Längsschnitte) von allen Seiten für den Betrachter zugänglich.

Eine andere Möglichkeit der Bilddokumentation bietet der sogenannte 'extended focus'. Es handelt sich hierbei um eine Maximumprojektion aller aufgenommenen Schnitte eines Präparats in einer zweidimensionalen Darstellung, wobei für jede xy-Koordinate der jeweils größte Helligkeitswert aus allen Schnitten ausgewählt wird. Fluoreszenzpunkte aus unterschiedlichen Ebenen des Präparats werden somit nebeneinander projiziert.

Im Programm 'Selima' werden die erstellten Bilder gespeichert und dokumentiert. Die Bilder wurden mit den Graphikprogrammen Adobe® Illustrator und Adobe® Photoshop weiterbearbeitet und mit einem Tintenstrahldrucker (Epson) ausgedruckt.

IV. ERGEBNISSE

1. Analyse der Phänotypen und des sarkomeren Musters

1.1 Quantitative Analyse

ARC in Langzeitkultur unterliegen einem komplexen De- und Redifferenzierungsprozeß, der zudem durch eine ausgeprägte Transformation der Größe und Form der ARC von der ursprünglich stäbchenförmigen *in vivo* Struktur zu einem flach ausgebreiteten, polygonalen Phänotyp gekennzeichnet ist.

Die Phasenkontrastmikroskopbilder der Abbildung 17, A-D zeigen frisch isolierte, stäbchenförmige Kardiomyozyten und das anschließende abgekugelte Stadium der ersten Tage in Kultur. In den konfokalen Bildern der Abbildung 18, A-F und 20 sind repräsentative Zellen dargestellt, die die morphologischen Veränderungen vom Zeitpunkt des Ausplattierens frisch isolierter Kardiomyozyten und während der anschließenden Kulturperiode aufzeigen (Zellform mit TRITC-Phalloidin (rot) dargestellt). Aufgrund der heterogenen Verteilung der zellulären Phänotypen (Abb. 20) wurden drei unabhängige Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten quantitativ analysiert. In Abbildung 19 ist dies dargestellt, wobei die Resultate als Mittelwerte \pm SD angegeben sind.

Am Tag der Isolierung (Tag 0) kurz nach dem Ausplattieren waren ungefähr 80% stäbchenförmige Zellen (Länge: 70-130 μm , Breite: 15-20 μm) mit klar abgegrenzten, treppenartigen Enden, die an die ehemaligen Glanzstreifen erinnern (Abb. 17, A-C), und 20% abgerundete, hyperkontrahierte Kardiomyozyten vorhanden. Einige der abgerundeten Zellen waren stechapfelförmig von zahlreichen kugeligen Zellpartikeln bedeckt und stellten abgestorbene Zellen dar (siehe Pfeile in Abb. 17, C).

In der sich anschließenden Kulturperiode rundete sich der Großteil der stäbchenförmigen ARC ab, so daß am 3. Tag nur noch $13 \pm 5\%$ stäbchenförmige vorhanden waren, die die für Tag 3 charakteristischen runden, glatten Enden aufwiesen (Abb. 18, B). Im Gegensatz dazu waren $24 \pm 6\%$ abgerundete und $62 \pm 11\%$ sich ausbreitende Zellen mit einer totalen Zellfläche von $< 6000 \mu\text{m}^2$ vorhanden (Abb. 18, D). Die Zellfläche der sich ausbreitenden Zellen betrug durchschnittlich ungefähr $500 \mu\text{m}^2$, da die abgekugelten Zellen in dieser Phase der beginnenden Ausbreitung nur von einem sehr begrenzten Saum von Pseudopodien umgeben sind. Stäbchenförmige Kardiomyozyten sind mit Ausnahme von einigen

toten stäbchenförmigen Zellen, den sogenannten ‘second layer’-Zellen (Zellen der sekundären Lage) (Abb. 18, E, rechte Zelle) nach dem 5. Tag nicht mehr vorhanden. Die ‘second layer’-Zellen persistierten dagegen in ihrer typischen Form bis zum 28. Tag, wo noch ungefähr 3% in der Kultur präsent waren.

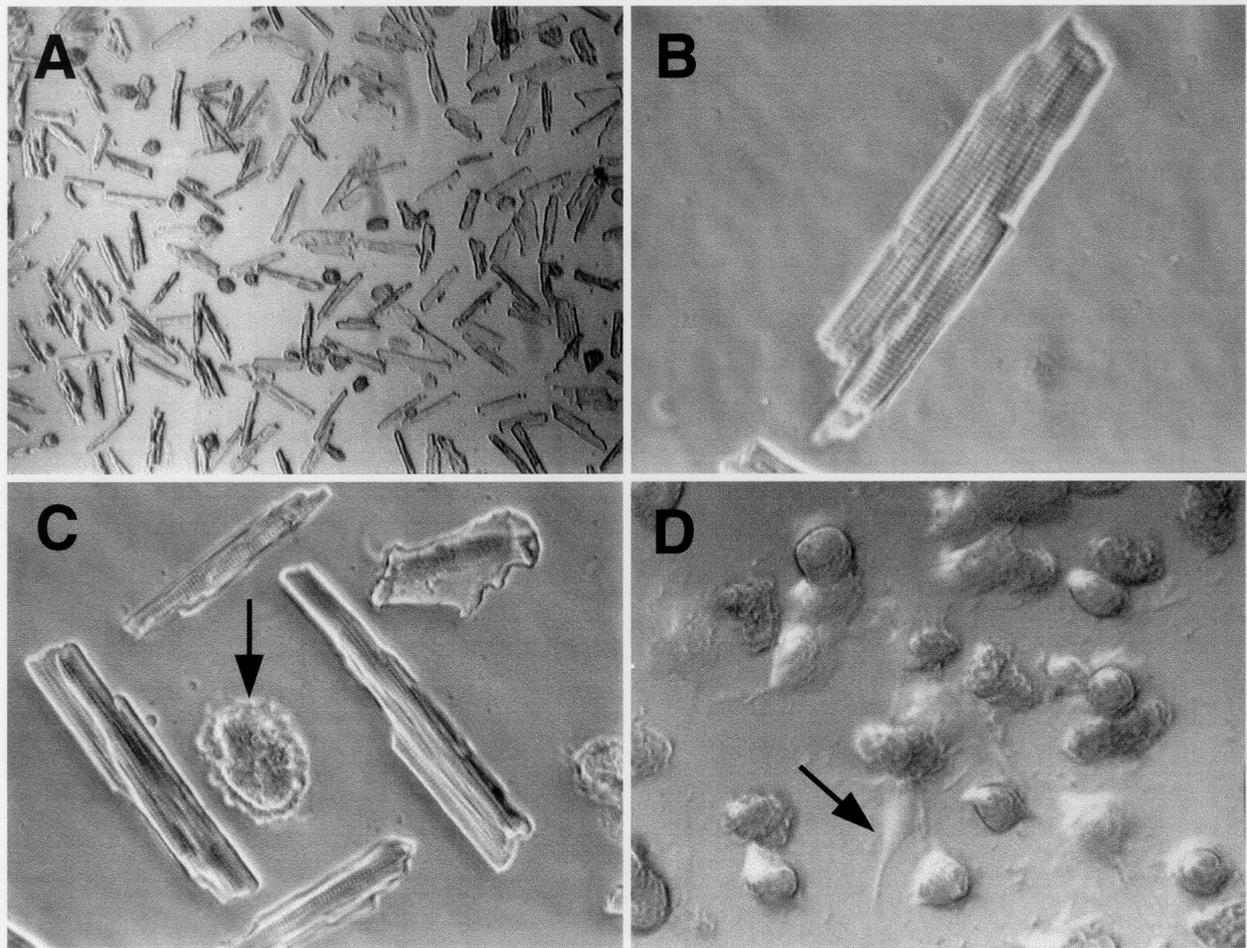


Abb. 17: Nativpräparate kultivierter Kardiomyozyten, ungefärbt

(Phasenkontrastmikroskop).

(A) Tag 0, 100-fache Vergrößerung: 80-90% der frisch isolierten Zellen liegen in Stäbchenform vor. Einige Zellen sind abgerundet.

(B) Tag 0, 250-fache Vergrößerung. Der frisch isolierte Kardiomyozyt läßt eine regelmäßige Querstreifung heller und dunkler Banden erkennen.

(C) Tag 0, 200-fache Vergrößerung: Bei abgerundeten Zellen, welche von zahlreichen kugeligen bzw. abgerundeten Zellpartikeln bedeckt sind (siehe Pfeil), handelt es sich um tote Zellen. Die länglichen Zellen zeigen regelmäßige Querstreifung, während die abgerundeten lebenden Zellen (ohne kugelige Zellpartikel) diese nicht aufweisen. Rechts oben befindet sich eine hyperkontrahierte Zelle.

(D) Tag 5, 200-fache Vergrößerung: Die Zellen liegen in abgerundeter Form vor, und der Großteil der Zellen besitzt Pseudopodien-artige Ausläufer (siehe Pfeil). In der Zellmitte sind diese Zellen noch immer 10 μm hoch. Querstreifung ist nicht erkennbar.

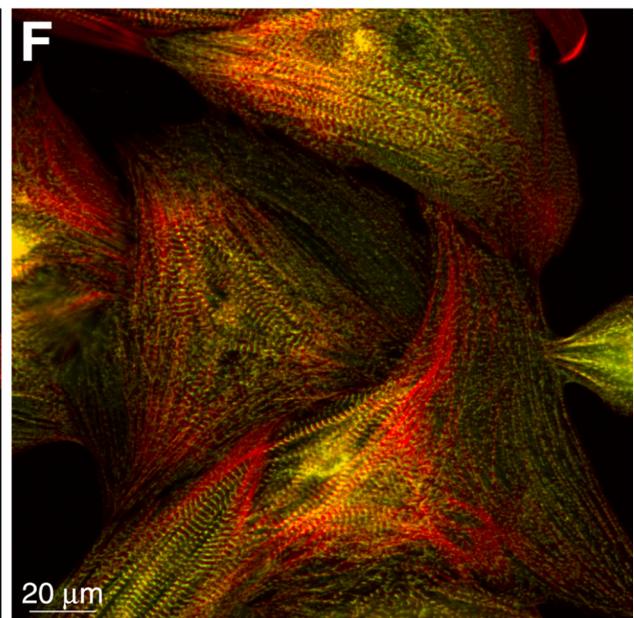
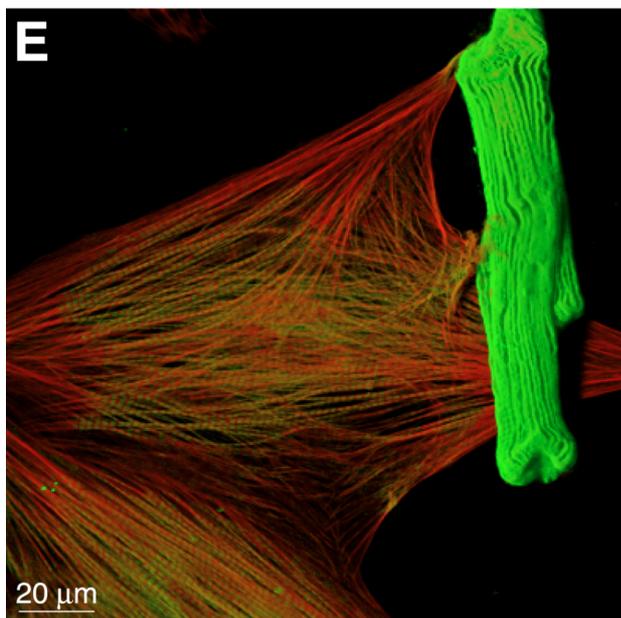
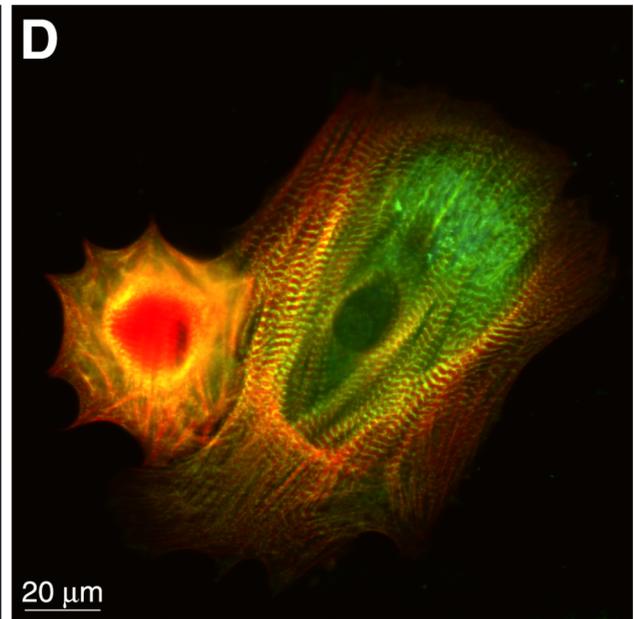
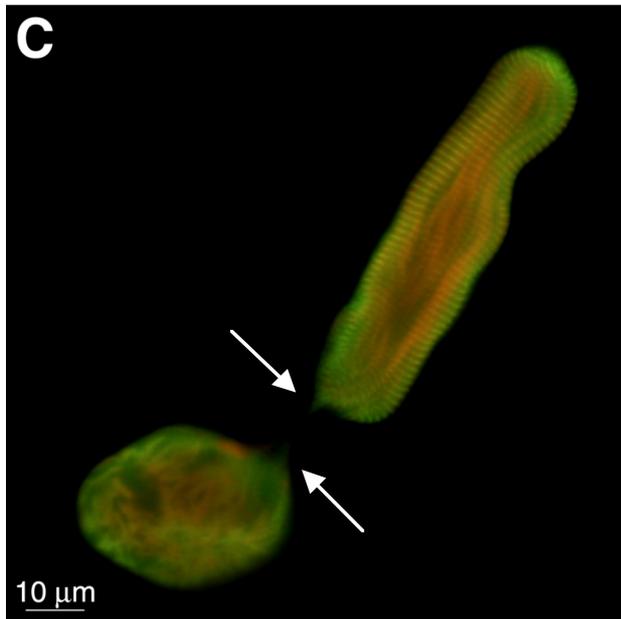
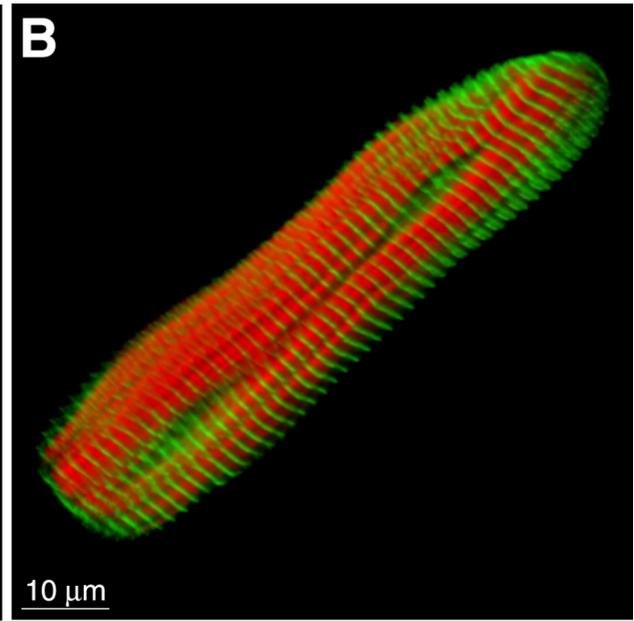
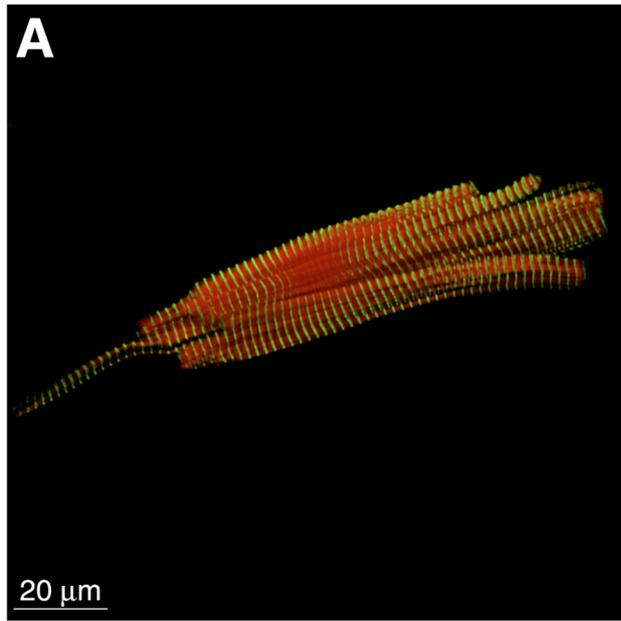


Abb. 18: Demonstration der Veränderung der verschiedenen Phänotypen von ARC an repräsentativen konfokalen Bildern (grün: sarkomere Proteine, rot: F-Aktin).

(A) Tag 0, α -Aktinin: Frisch isolierter Kardiomyozyt mit typischer in vivo Stäbchenform und treppenartigen Zellenden. Eine regelmäßige Querstreifung für das sarkomere Protein ist in der ganzen Zelle vorhanden.

(B) Tag 3, T42: Die Zellenden sind abgerundet, die Querstreifung für Titin ist regelmäßig ausgeprägt.

(C) Tag 5, T42: Während die rechte Zelle eine zylindrische Form mit abgerundeten Enden aufweist, liegt die linke Zelle in abgerundeter Form vor. Beide Zellen deuten den Beginn einer Pseudopodienbildung an (siehe Pfeile). Im Gegensatz zu der stäbchenförmigen Zelle, wo Titin und Aktin in einem quergestreiften Muster vorliegen, präsentieren sich diese Proteine in der abgerundeten Zelle als fibroamorphe Masse (myofibrilläre Degradierung).

(D) Tag 8, α -Aktinin: Verschiedene Ausbreitungsmuster. Die linke abgerundete Zelle mit konzentriertem sarkomeren Material im Zentrum ist von einem schmalen, zirkulären Pseudopodiensaum umgeben. Die rechte sich ausbreitende Zelle hat sich vermutlich aus einer stäbchenförmigen Zelle ohne Abrunden entwickelt. Beide Zellen enthalten im Zentrum fibroamorphes sarkomeres Material. Die stärker ausgebreitete rechte Zelle weist zusätzlich Querstreifung für α -Aktinin auf.

(E) Tag 12, Myosin: Deutliche Demonstration der Phänotypveränderung. Während sich die linken Zellen flach ausgebreitet haben, verharret die rechte 'second layer'-Zelle in ihrer stäbchenförmigen Struktur. Es handelt sich hierbei um eine tote Zelle, da sie sich nicht mit Phalloidin anfärbt.

(F) Tag 16, α -Aktinin: Bildung eines Zellrasens durch interzellulären Kontakt mehrerer Zellen.

Die Zahl der abgerundeten Zellen nahm allmählich bis zum vollständigen Verschwinden am 20. Tag ab. Die Anzahl der Zellen mit einer Zellfläche von $< 6000 \mu\text{m}^2$ reduzierte sich ebenfalls allmählich, wobei noch $7 \pm 2\%$ am 28. Tag vorhanden waren. Sich ausbreitende Zellen mit einer Zellfläche zwischen $6000\text{-}12000 \mu\text{m}^2$ nahmen von $4 \pm 3\%$ am 5. Tag bis $49 \pm 5\%$ am 28. Tag zu. ARC mit einer Zellfläche $> 12000 \mu\text{m}^2$ waren am 8. Tag mit $8 \pm 1\%$ vertreten und erreichten $27 \pm 3\%$ am 28. Tag (Abb. 18, E, F und 19).

Diese Analyse diente als Standardisierung für die nachfolgend beschriebenen Antisense-Oligodesoxynukleotid-Experimente.

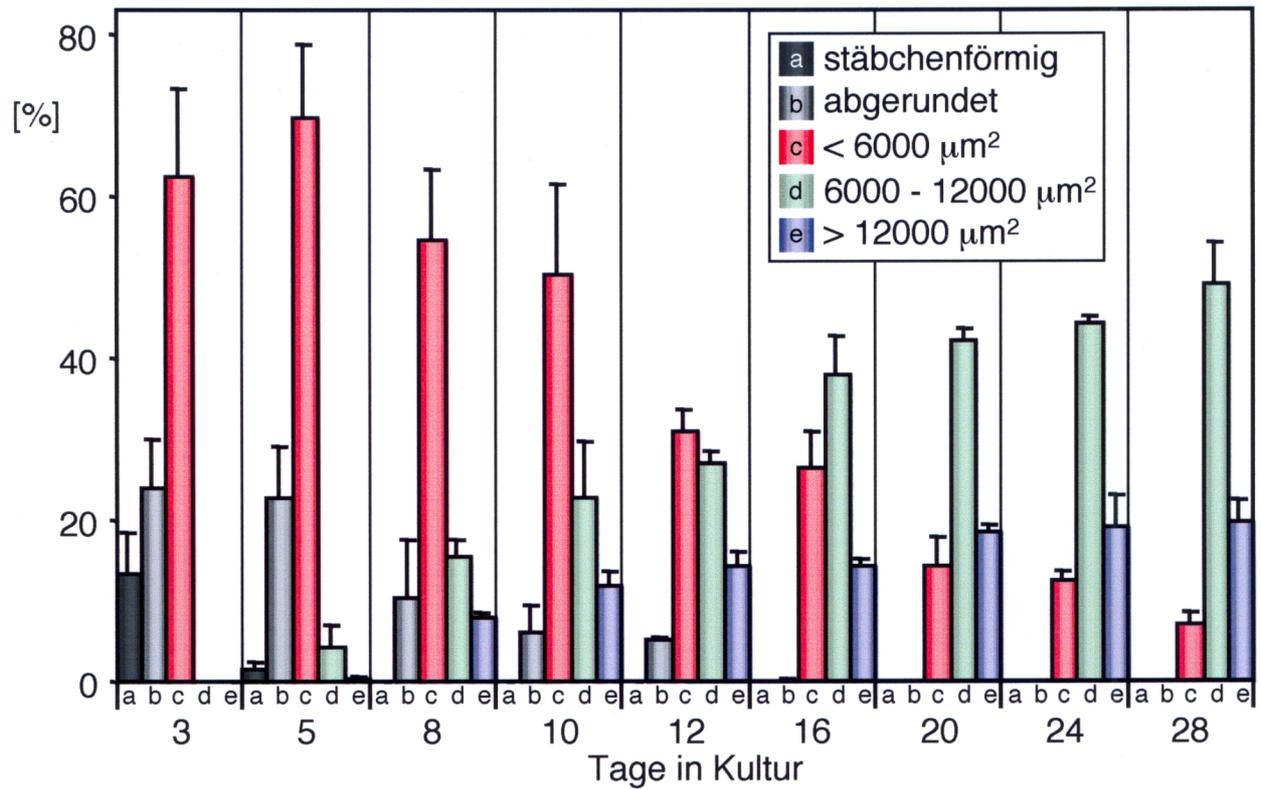


Abb. 19: Die quantitative Analyse von ARC zu verschiedenen Zeitpunkten zeigt eine Abnahme der Zahl stäbchenförmiger und abgerundeter Zellen und eine Zunahme der sich ausbreitenden Zellen. Die Resultate sind als Mittelwerte \pm SD angegeben.

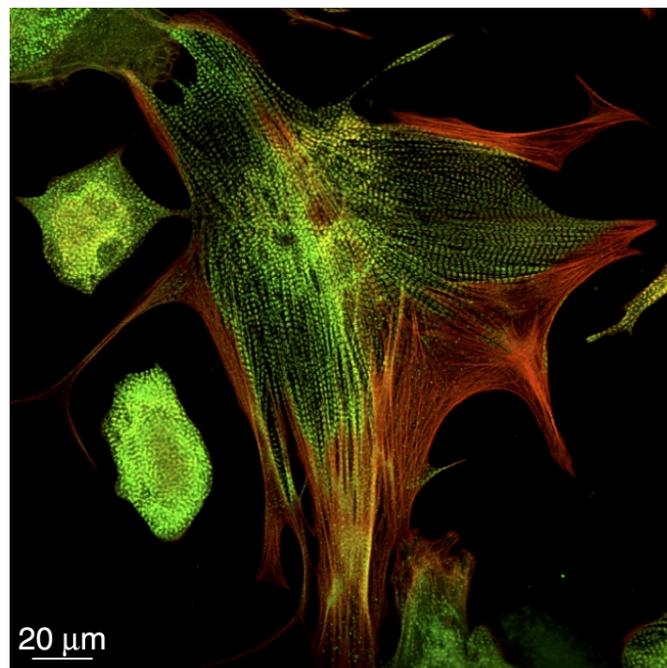
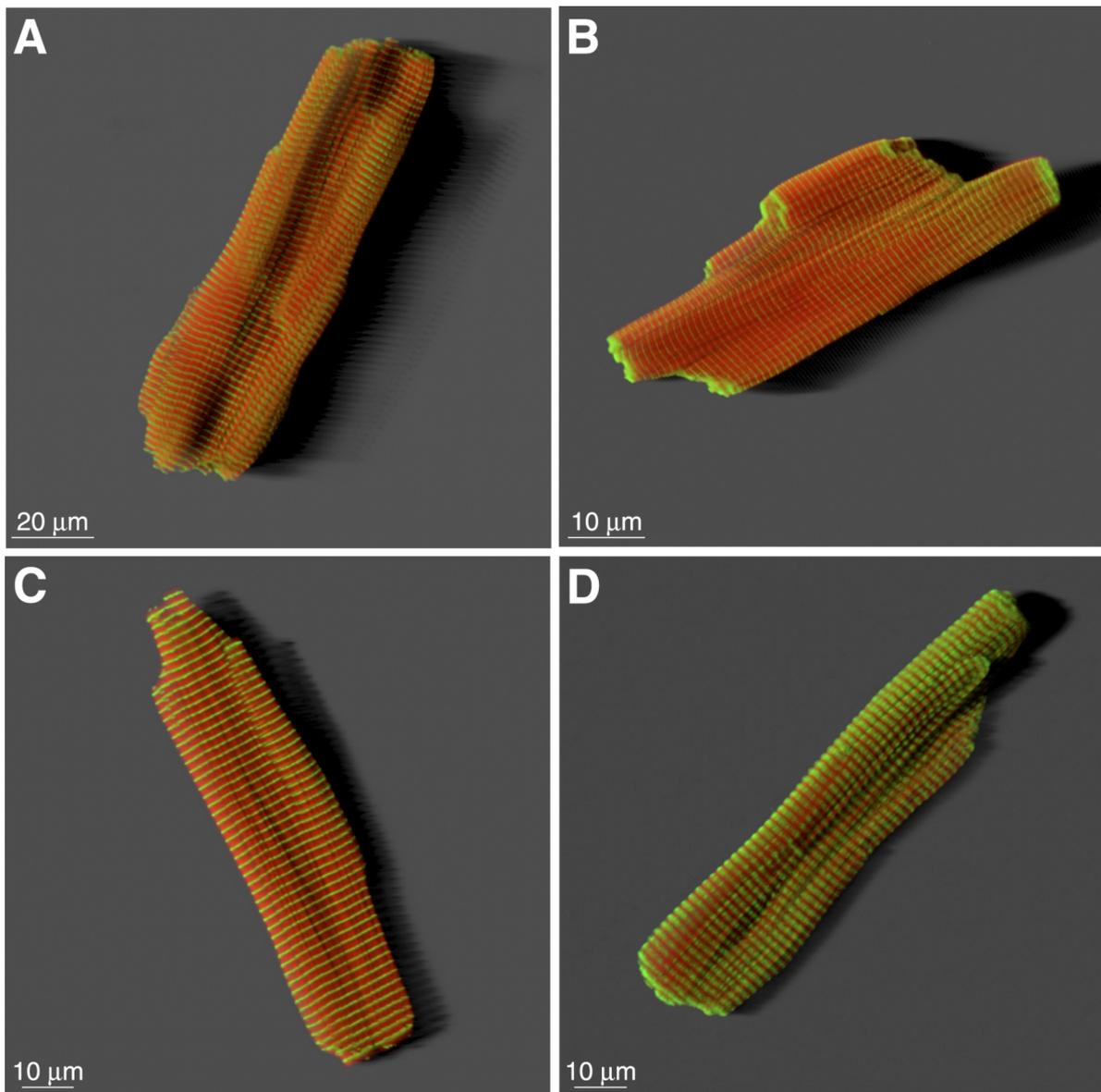


Abb. 20: Dieses konfokale Bild zeigt die Heterogenität bezuglich des Ausbreitungsmusters, eine Koexistenz wenig ausgebreiteter und stark ausgebreiteter Zellen (Tag 12, grün: Titin 42, rot: F-Aktin).

1.2 Sarkomerogenese

Frisch isolierte, stäbchenförmige Zellen zeigten eine deutliche Querstreifung durch die ganze Zelle hindurch für die verschiedenen in dieser Studie verwendeten Antikörper (Abb 21, A-D).



*Abb. 21: Konfokale Bilder frisch isolierter Kardiomyozyten
Es wurde eine 3D-Rekonstruktion und eine Schattenprojektion durchgeführt. Aktin ist mit TRITC-Phalloidin rot dargestellt. Die Zellen weisen regelmäßige Querstreifung für die verschiedenen Proteine (grün) auf. Diese Regelmäßigkeit der Sarkomeren weist darauf hin, daß die Myofibrillen auch nach der Isolierung intakt vorliegen.*

- (A) α -Aktinin*
- (B) Titin (anti-z1z2)*
- (C) Myomesin*
- (D) Myosin*

Während die stäbchenförmigen Kardiomyozyten des 3. Tages noch eine klare Querstreifung durch die ganze Zelle zeigten (Abb 22, C), stellten sich die Myofibrillen der abgerundeten Zellen als fibroamorphe Masse dar, die ein klares quergestreiftes Muster nicht erkennen ließen, was wiederum auf eine Degradierung der Myofibrillen hindeutet (Abb. 18, C, linke Zelle).

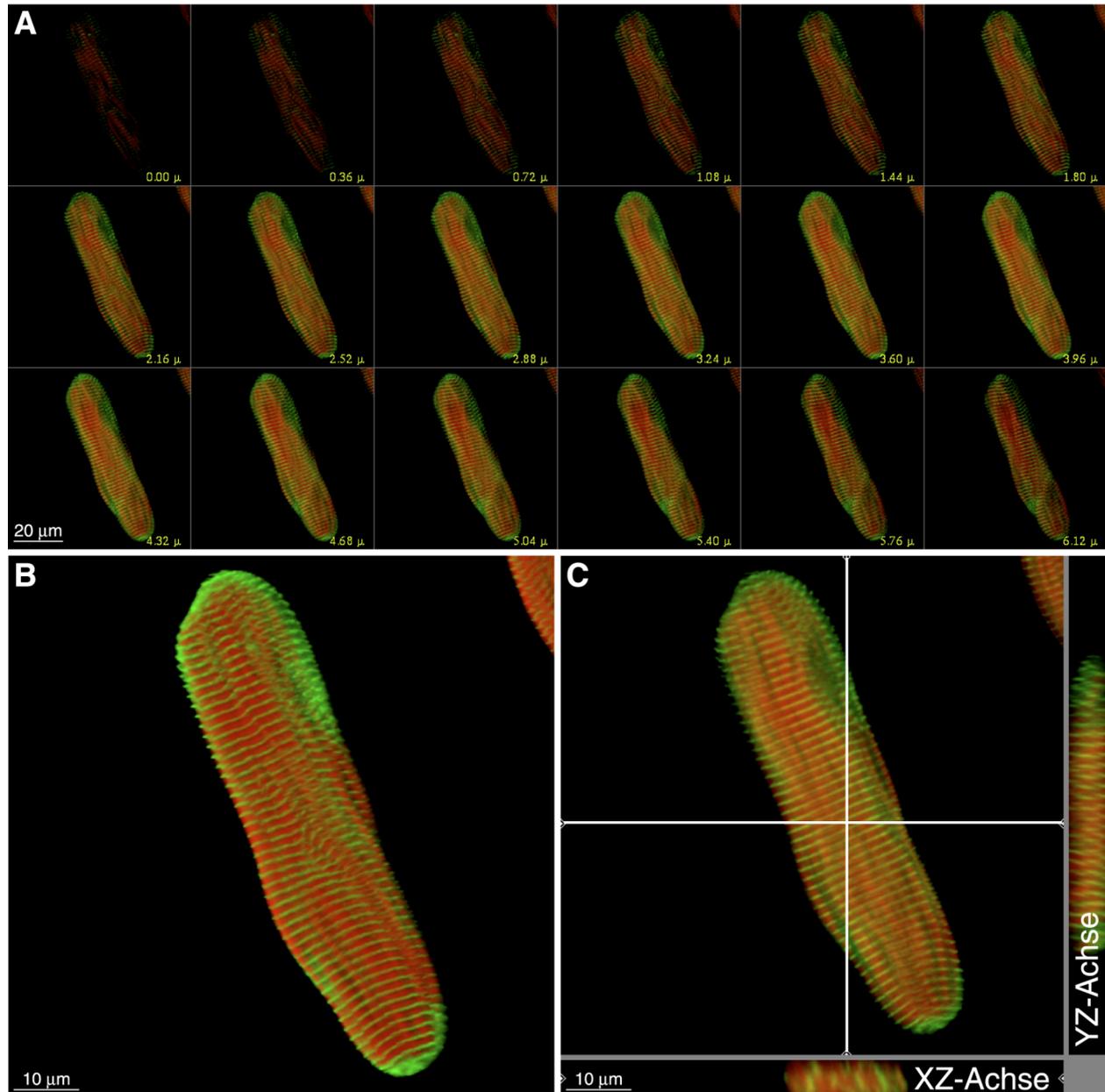


Abb. 22: Darstellung der Addition der verschiedenen Schnitte durch eine Zelle (grün: T42, rot: F-Aktin)

(A) Kardiomyozyt, 3 Tage in Kultur. Von dieser Zelle wurden von oben nach unten 18 Schnittbilder im Abstand von $0,36 \mu\text{m}$ aufgenommen und als Gallerie dargestellt. (B) Aufgrund der Addition dieser Schnittbilder entsteht ein dreidimensionaler Eindruck, der durch die Funktion 'Schattenprojektion' (Imaris) noch verstärkt wird. (C) Quer- und Längsschnitte durch die Zelle (XZ- und YZ-Achse) demonstrieren die regelmäßige Querstreifung des Antikörpers auch im Zellinnern.

Der Verlust des sarkomeren Apparats der Myofibrillen kennzeichnete die Phase der Dedifferenzierung. Dies äußerte sich in dem beschriebenen amorphen Erscheinungsbild der Proteine und der fehlenden Querstreifung. Das sich anschließende Ausbreiten der Zellen begann entweder bei stäbchenförmigen oder in den meisten Fällen bei abgerundeten Myozyten. Die Redifferenzierung war charakterisiert durch die Bildung neuer funktioneller Sarkomere in sich ausbreitenden Zellen, die eine erneute Kontraktionsfähigkeit der in den ersten Tagen quieszenten Zellen bewirkte.

Sich ausbreitende Zellen wiesen ein deutlich punktiertes bzw. perlenartiges Muster für α -Aktinin in den pseudopodienartigen Zellausläufern bis zur Peripherie auf. Diese Punkte befanden sich in unregelmäßigem, im Vergleich zur Querstreifung (Z-Streifen) vermindertem Abstand zueinander (Abb. 23, A und B).

Titin war hauptsächlich in quergestreifter Form sichtbar. Der verwendete Antikörper 'anti-z1z2' färbt ein Epitop nahe des Z-Streifens. Die Vergrößerung zeigte auch einige punktartige Markierungen verglichen mit α -Aktinin, jedoch in viel schwächerer Ausprägung (Abb. 23, C und D).

Myomesin, welches die M-Bande färbt, zeigte zwar eine etwas verwaschene Markierung in den Spitzen der Zellausläufer (Abb. 19, E), die Vergrößerung demonstrierte jedoch einen abrupten Abbruch der Querstreifung auf den Streifsfaser-ähnlichen Strukturen. Der Übergang zu einem punktförmigen Muster war nicht ersichtlich (Abb. 23, F).

Die auffallend breiten Markierungen des Myosins, welche die A-Bande markierten, (Abb. 23, G und H) waren in den ersten Ausläufern nicht vorhanden. Ähnlich wie bei Myomesin endete das regelmäßige, für diesen Antikörper typisch breite Querstreifungsmuster abrupt ohne Übergang.

Die Neubildung der Sarkomeren vollzog sich in erster Linie im Zentrum der Myozyten, um sich dann anschließend zur Peripherie hin auszudehnen (Abb. 19, E und G). Neben der vorwiegend zentralen Lokalisation der Neubildung waren auch einige Stellen in der Peripherie zu erkennen, wo Sarkomerenneubildung stattfand (Abb. 23, E und G).

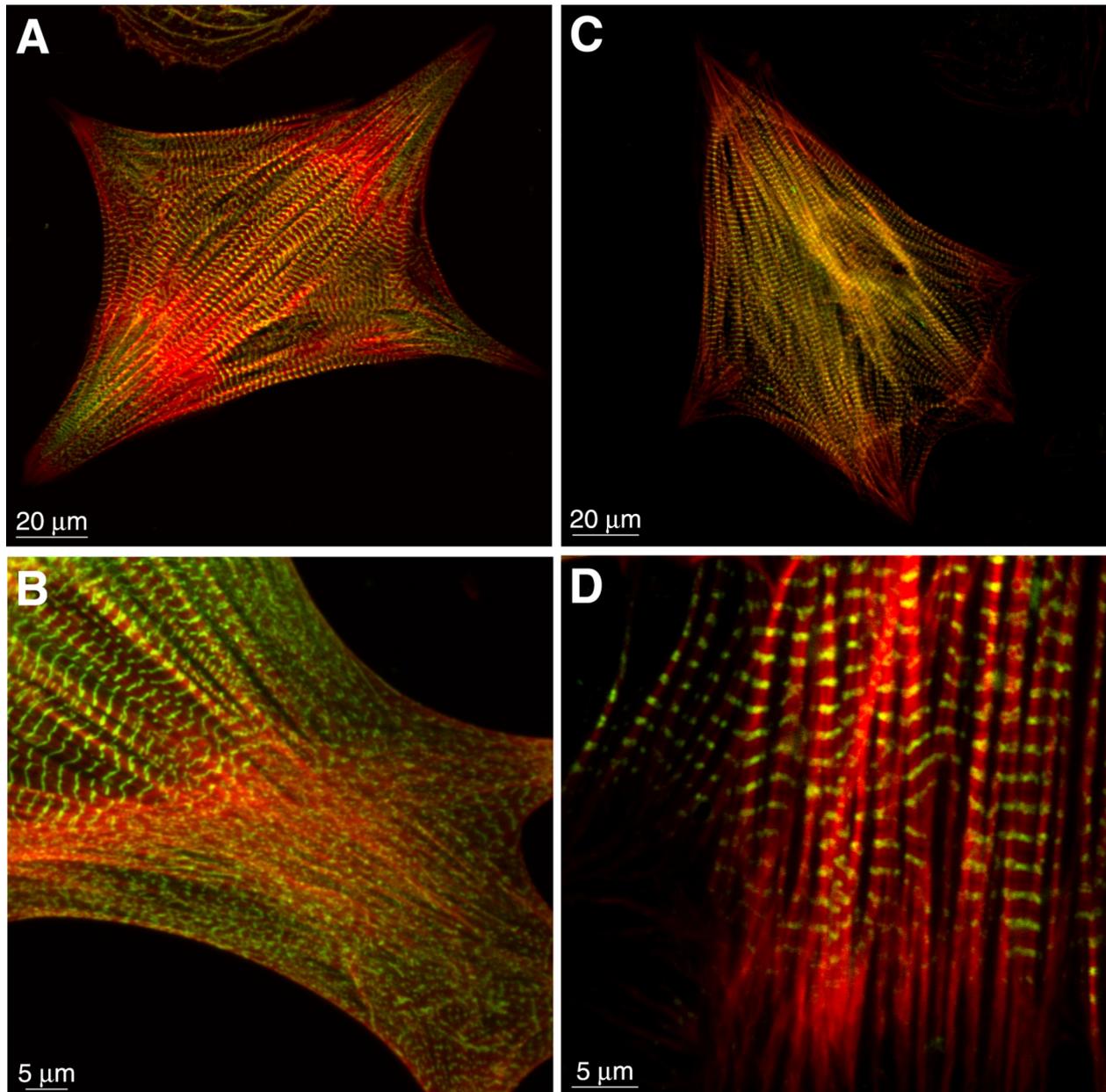
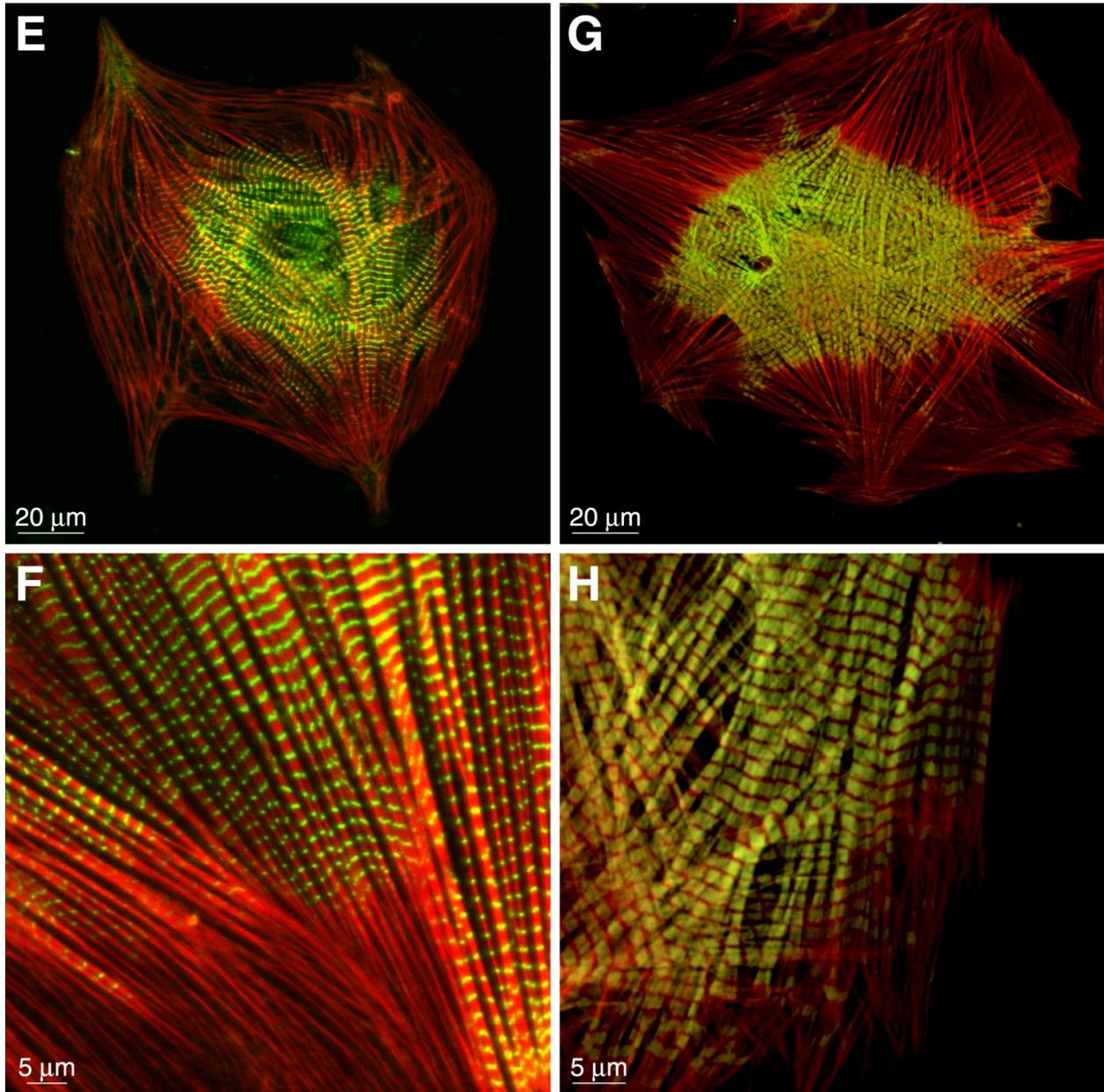


Abb. 23: Darstellung des typischen sarkomeren Musters von α -Aktinin, Titin, Myomesin und Myosin in ARC am 12. Tag (rot: F-Aktin, grün: sarkomere Proteine). (A) ARC mit deutlicher Querstreifung für Aktinin. In den Spitzen der Zellausläufer liegt die Markierung punktförmig vor. (B) Die Vergrößerung zeigt den Übergang des punktförmigen zum quergestreiften Muster von α -Aktinin. (C) Die regelmäßig quergestreifte Titinmarkierung dehnt sich fast bis zur Zellperipherie aus. (D) Die Vergrößerung der Übergangsregion von gestreiften zu nicht-gestreiften Myofibrillen offenbart eine punktförmige Färbung, die im Vergleich zu der von α -Aktinin schwächer ausgeprägt ist.



Fortsetzung von Abb. 23:

(E) Die für Myomesin markierte Zelle weist kein erkennbares punktförmiges Muster auf. Die deutlich im Zentrum beginnende Querstreifung deutet auf den Anfangsort der Sarkomerogenese hin.

(F) Die Vergrößerung zeigt die abrupte Beendigung der Myomesinmarkierung auf den SFLS.

(G) Die Myosin-gefärbte Zelle zeigt eine ähnliche Ausbreitung des Querstreifungsgebietes wie Myomesin. Neben der zentralen Lokalisierung der Sarkomerenneubildung sind auch peripher einige umgrenzte Bereiche mit regelmäßiger Querstreifung detektierbar.

(H) Die Vergrößerung demonstriert, daß die Myosinmarkierung ähnlich der von Myomesin abrupt endet. Punktförmige Strukturen sind nicht zu erkennen.

TRITC-Phalloidin färbt sowohl die β - und γ -Aktinfilamente in den Strebfaser-ähnlichen Strukturen (SFLS), als auch das polymerisierte α -Aktin, aus welchem die dünnen Filamente bestehen. Aufgrund der Unterschiedlichkeit der Färbemuster der SFLS und der dünnen Filamente sind diese beiden Strukturen jedoch gut zu unterscheiden. Das sarkomere Muster der Myofibrille ist regelmäßig unterbrochen, während sich die SFLS kontinuierlich für Phalloidin anfärben (Abb. 24, B). Eine ausgeprägte periodische Organisation von F-Aktin wurde hauptsächlich in späteren Stadien der myofibrillären Reorganisation beobachtet. Diese Periodizität endete jedoch immer in den terminalen, peripheren Enden der nicht-gestreiften Fibrillen.

Die Doppelmarkierungen demonstrierten deutlich eine Kolokalisierung der Sarkomere und der Phalloidin-markierten F-Aktin-Filamentbündel (Abb. 23, B, D, F, H und 24, A).

Bei näherer Betrachtung der Reorganisation von α -Aktinin in Relation zu F-Aktin wurde deutlich, daß α -Aktinin in bestimmten Regionen periodisch vorlag, während F-Aktin sich in einem Stadium von nicht-gestreiften Fibrillen präsentierte. Dies gilt auch für die anderen verwendeten Antikörper.

Es war offensichtlich, daß während der Phase der Redifferenzierung α -Aktinin das erste Protein war, das auf den schon existierenden Strebfaser-ähnlichen Strukturen erschien, und daß sowohl Titin, als auch Myomesin und Myosin zeitlich nachgeordnet waren. Die Strebfaser-ähnlichen Strukturen scheinen beim Sarkomerenzusammenbau als grundlegende Matrize zu dienen (Abb. 23).

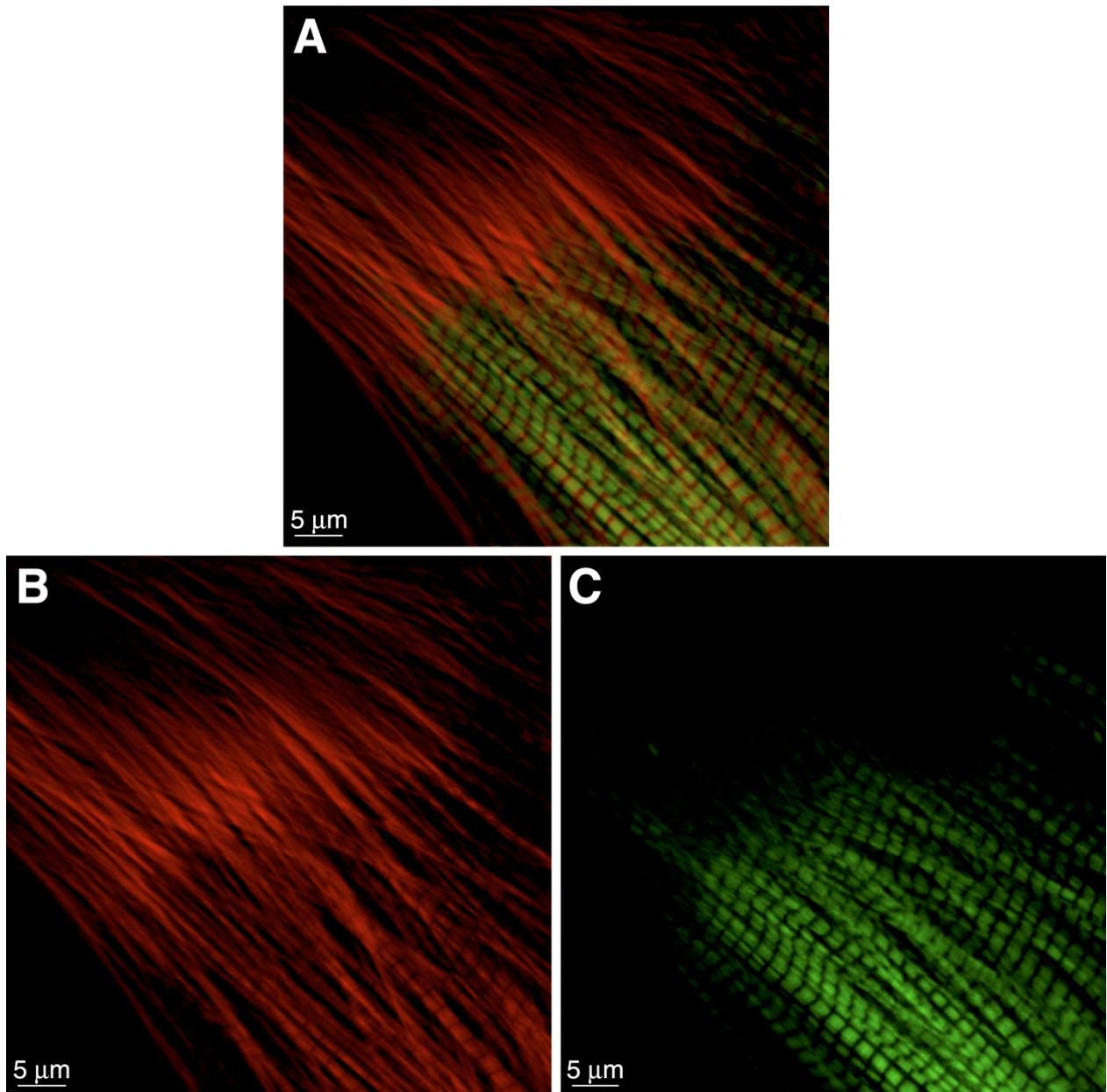


Abb. 24: Demonstration des Übergangs quergestreifter Myofibrillen (sarkomeres Aktin der dünnen Filamente) zu nicht-gestreiften Myofibrillen (Aktin der Streiffaser-artigen Strukturen).

(A) Ausschnitt aus dem Randbereich einer Zelle, welche für Aktin (rot) und Myosin (grün) markiert wurde (Zweikanalbild).

(B) Hier wurde der grüne Kanal ausgeblendet, um den Übergang der quergestreiften zu den nicht-gestreiften, kontinuierlich gefärbten Myofibrillen zu verdeutlichen.

(C) In diesem konfokalen Bild fehlt der rote Kanal. Die breiten Banden der Myosinmarkierung, welche abrupt enden, sind klar zu erkennen.

1.3 Kontraktilität

Eine geringe Anzahl von frisch isolierten Kardiomyozyten kontrahierte sich in unregelmäßigen zeitlichen Abständen nach dem Ausplattieren auf die Zellkulturobjektträger. Diese Zellen wurden einige Stunden später quieszent, d. h. sie kontrahierten sich nicht mehr. Die Myozyten verblieben in diesem ruhigen, unbeweglichen Zustand bis zum 8. Tag, an welchem einige der Zellen abhängig vom jeweiligen Status der Redifferenzierung wieder anfangen, sich zu kontrahieren. Zu einem späteren Zeitpunkt, z.B. Tag 12, war oftmals eine synchrone Kontraktion verschiedener Myozyten zu beobachten, die über Zell-Zell-Kontakte (Glanzstreifenartige Strukturen) miteinander verbunden waren. Zwischen dem 12. und 16. Tag waren die Kontraktionen in der Zellkultur am häufigsten. Die Frequenz war dabei recht unterschiedlich. Ab dem 16. Tag nahm die Häufigkeit allmählich ab, so daß am 28. Tag nur selten eine kontrahierende Zelle zu finden war.

2. Antisense-Oligodesoxynukleotid-Experimente

2.1 S-ODN-Aufnahme

2.1.1 Fluorescein-markierte S-ODN

S-ODN wurden von den Kardiomyozyten aufgenommen und konnten intrazellulär mittels Fluorescein-markierter S-ODN beobachtet werden. Während am 8. Tag in Kultur nur wenige Zellen S-ODN im Zytoplasma aufwiesen, zeigten am 12. und 16. Tag die Mehrzahl der ARC deutlich positive Signale im Zytoplasma und/oder in den Kernen (Abb. 25, A-D).

2.1.2 Fluorescein- und Cholesterol-gekoppelte S-ODN

Der Versuch mit 5'-Fluorescein-, 3'-Cholesterol-markierten S-ODN resultierte im gleichen Ergebnis wie in 2.1.1 beschrieben. Es wurde keine schnellere Aufnahme dieser S-ODN im Vergleich zu Fluorescein-konjugierten S-ODN beobachtet, deshalb wurde in den eigentlichen Antisense-Oligodesoxynukleotid-Experimenten auf eine Cholesterol-Konjugation verzichtet.

2.2 Auswirkungen der Transfektion

2.2.1 Einfluß auf das Verhalten von α -Aktinin

Eine Beeinträchtigung der α -Aktininmarkierung, die als Indikator für Zellintegrität fungierte, war bei der Transfektion mit Antisense S-ODN I, II oder III nicht feststellbar. Die Querstreifung und das charakteristische gepunktete Muster in den Zellausläufern waren erhalten (Abb. 25, A).

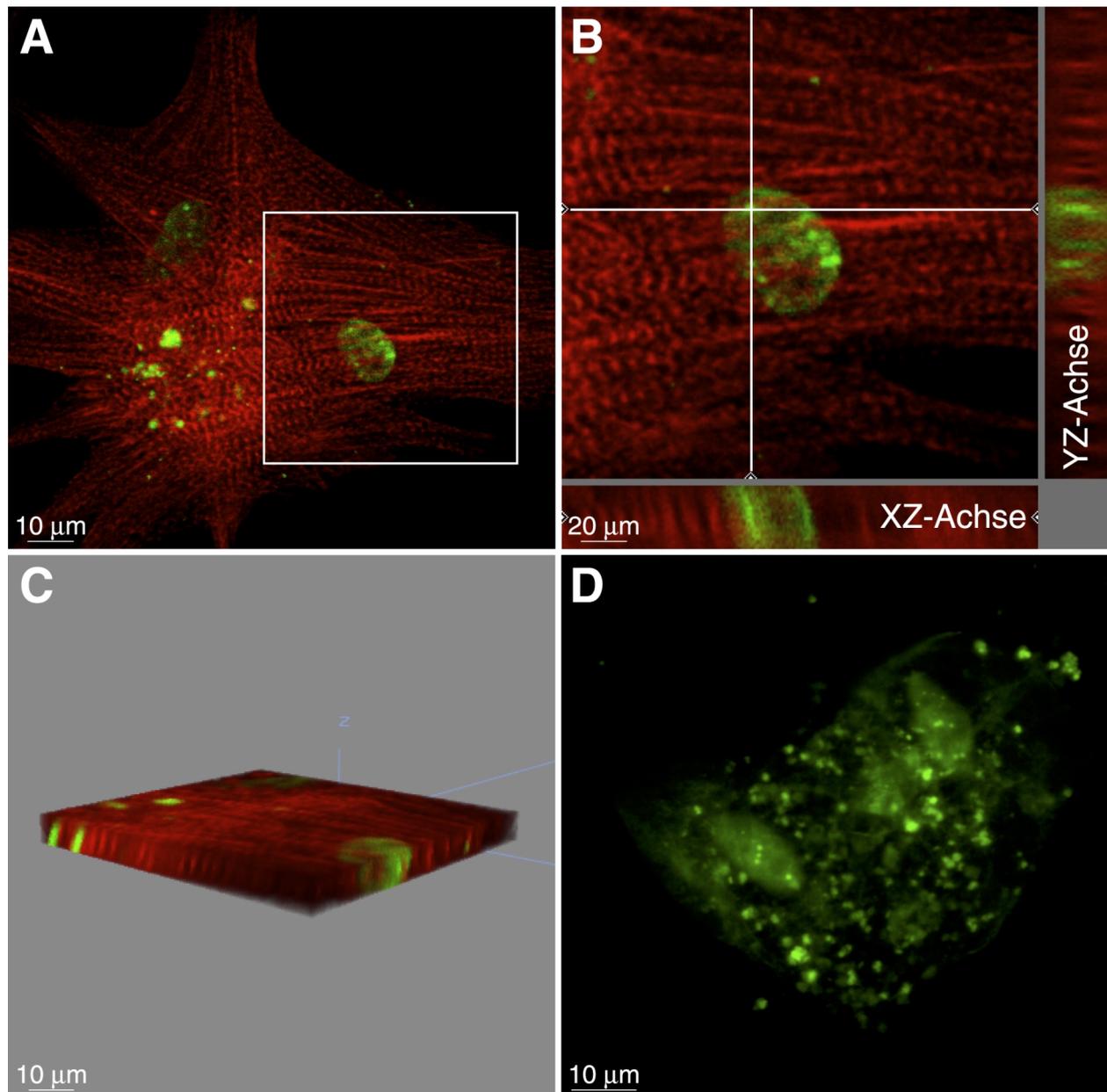


Abb. 25: Demonstration der zellulären Aufnahme Fluorescein-markierter Antisense S-ODN I (grün), (rot: α -Aktinin). Die Bilder sind repräsentativ für alle hier verwendeten Oligodesoxynukleotide (Antisense und Random S-ODN I-III)

(A) Die 5'-FITC-markierten S-ODN sind als grüne Punkte im Zytoplasma und in den Zellkernen erkennbar. Das charakteristische Erscheinungsbild von α -Aktinin (Querstreifung und gepunktete Strukturen) wird nicht beeinflusst.

(B) Subregion von (A) (siehe markierten Bereich). Die vertikalen Schnitte (XZ- und YZ-Achse) demonstrieren die S-ODN Aufnahme in die Zelle bzw. in den Zellkern.

(C) Perspektivische Projektion eines zentralen Bereichs von (A), der beide Kerne miteinschließt. Deutlich erfassbar sind die, sowohl im Plasma als auch im Zellkern liegenden, Fluoreszenzsignale der S-ODN.

(D) Konfokales Bild von ARC ohne zusätzliche Färbung eines sarkomeren Proteins. Die Zellform ist zu erahnen, da die S-ODN gleichmäßig im Zytoplasma verteilt sind. Auch hier sind intranukleär Fluoreszenzsignale vorhanden.

2.2.2 Einfluß auf das Verhalten von F-Aktin

Die Streißfaser-artigen Strukturen wurden in ihrem Erscheinungsbild ebenfalls nicht beeinflußt (Abb. 26, B und D). Eine Querstreifung (sarkomeres Aktin) war nur im Bereich vorhandener Titinquerstreifung zu finden (Abb. 26, B).

2.2.3 Einfluß auf die Titinexpression

Der Bereich der Titinmarkierung war in Zellen, die Antisense S-ODN I, II oder III ausgesetzt waren, im Vergleich zu Kontrollzellen (Random S-ODN I, II oder III behandelte und unbehandelte Zellen) deutlich vermindert. Nur im Zentrum der Zellen war eine in ihrem Ausmaß geringe Markierung in quergestreifter Form festzustellen, was auf eine erfolgreiche Hemmung der Titinexpression durch die Antisense S-ODN hinweist (Abb. 26, B).

2.2.4 Einfluß auf die Inkorporation der Myosinfilamente in die Sarkomeren

Der Grad der Inkorporation der Myosinfilamente in die Sarkomere diente als Indikator für eine fortgeschrittene Sarkomerogenese (Myofibrillogenese).

Am 8. Tag bestanden keine Unterschiede zwischen Kardiomyozyten, die mit Antisense oder Random S-ODN behandelt wurden oder unbehandelt waren.

Am 12. und 16. Tag hingegen zeigte die Mehrzahl der mit Antisense S-ODN I, II und III behandelten ARC eine vollständig diffuse Myosinmarkierung (Abb. 26, D) im Vergleich zu Kontrollzellen (Random S-ODN I, II, III und unbehandelt), welche sich durch große Areale typischer quergestreifter Myosinmarkierung auszeichneten (Abb. 26, C). Die Inkorporation der Myosinfilamente war somit hochgradig gestört. Auffällig war, daß der Bereich der diffusen Myosinmarkierung in seiner Ausdehnung dem Bereich der quergestreiften Markierung von Kontrollzellen entsprach, was auf eine ungestörte Expression von Myosin hindeutet. Ungefähr 10% der Antisense S-ODN behandelten Zellen zeigten einen variabel begrenzten Bereich der Myosinquerstreifung umgeben von diffuser Myosinmarkierung. Diese qualitative Auswertung wurde ergänzt durch die quantitative Bestimmung der Fläche der Querstreifung zur Zellfläche.

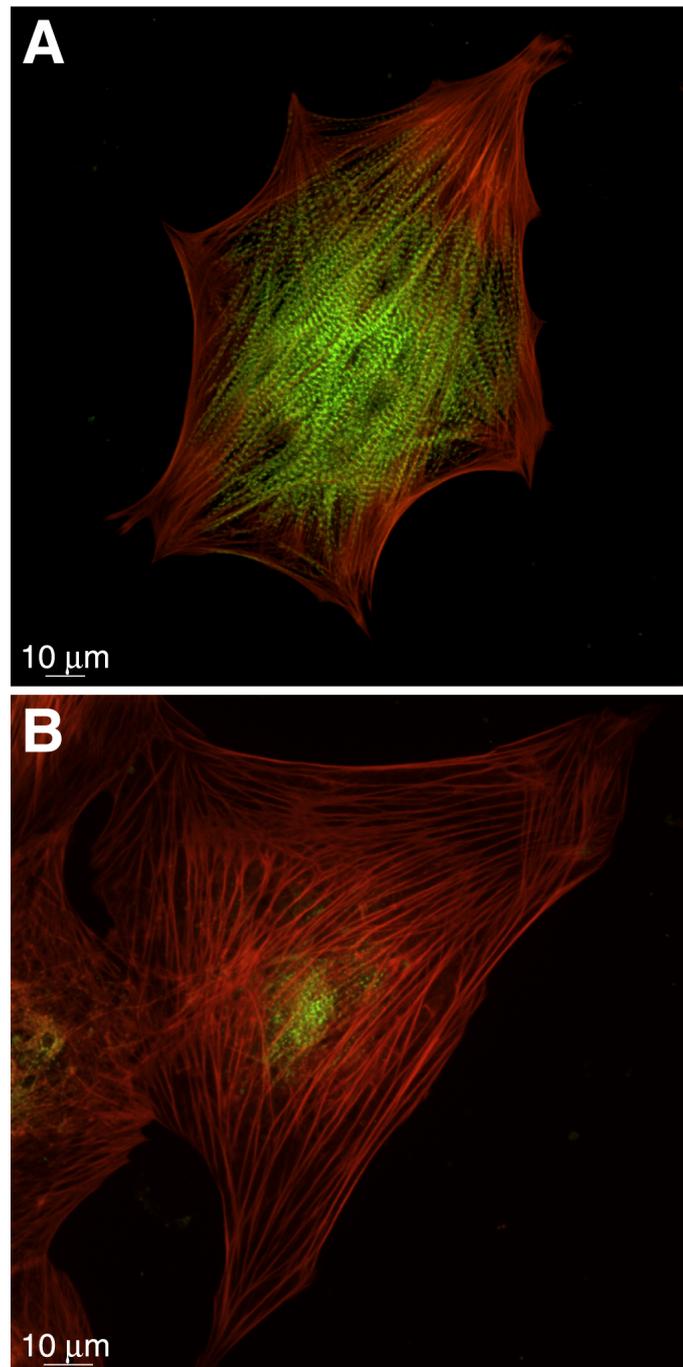
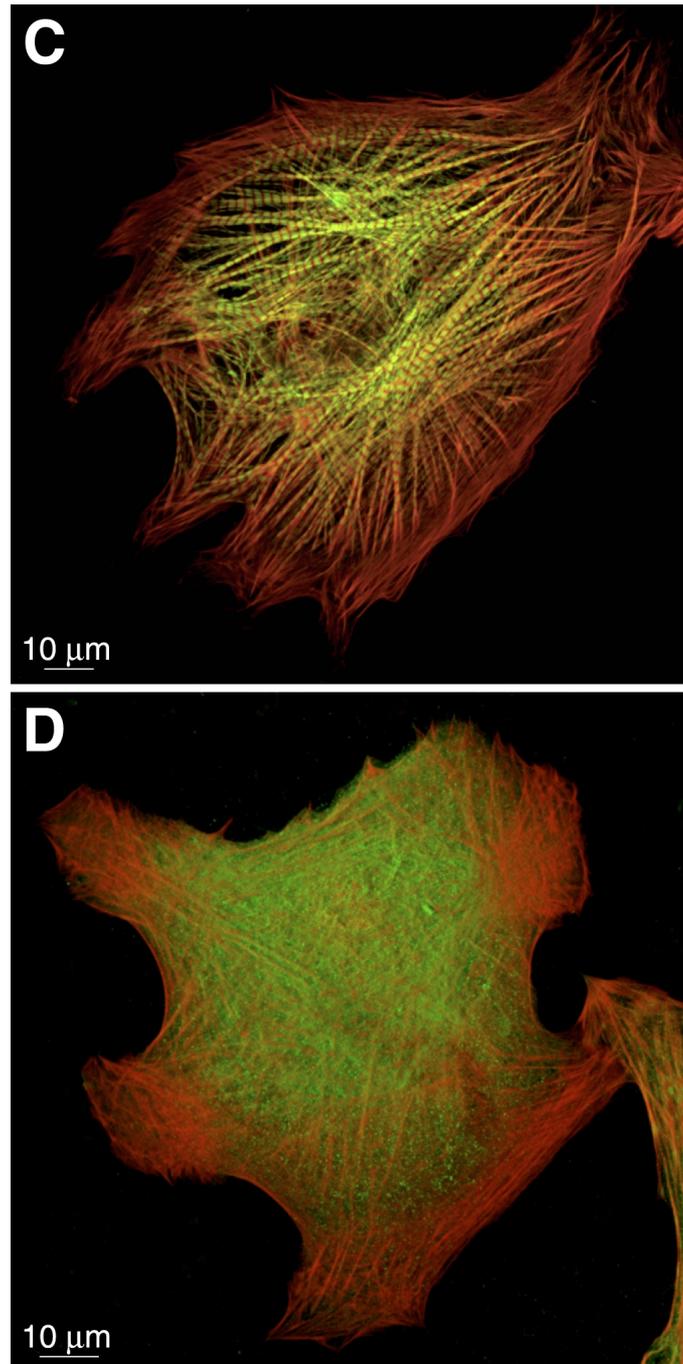


Abb. 26: Auswirkungen der Antisense S-ODN I Behandlung.

Die Ergebnisse sind repräsentativ für alle verwendeten S-ODN (Antisense und Random S-ODN I-III) (grün: Titin bzw. Myosin, rot: Aktin).

(A) Die Kontrollzelle (Random S-ODN behandelt) besitzt zahlreiche Myofibrillen, die eine deutlich regelmäßige Querstreifung für Titin bis in die Nähe der Peripherie aufweisen.

(B) Die Antisense S-ODN behandelte Zelle ist nur in einem begrenzten Bereich im Zentrum für Titin markiert, wo auch sarkomeres Aktin detektierbar ist. Die Streiffaser-artigen Strukturen erscheinen unverändert.



Fortsetzung von Abb. 26:

(C) Die Kontrollzelle weist eine ausgeprägte regelmäßige Querstreifung für Myosin auf, die fast bis zur Peripherie reicht.

(D) Bei der Antisense S-ODN behandelten Zelle reicht der markierte Bereich für Myosin ebenfalls fast bis zur Peripherie, jedoch ist keine Querstreifung dieses Proteins erkennbar. Myosin liegt in vollständig diffuser Markierung vor, wobei der Markierungsbereich in seiner Ausdehnung dem der Kontrollzelle entspricht. Die Streiffaser-artigen Strukturen präsentieren sich unverändert in ihrer typischen filamentösen Struktur, sarkomeres Aktin ist nicht erkennbar.

2.3 Quantitative Bestimmung der Fläche quergestreiften Myosins zur Gesamtzellfläche

Bei Zellen, die Myosinquerstreifung aufwiesen, wurde eine quantitative Analyse des Bereichs der Myosinquerstreifung in Prozent der Gesamtzellfläche am 12. Tag und 16. Tag durchgeführt (Abb. 27 und 28).

Am 12. Tag fielen die Werte ($p < 0,05$) von $75 \pm 4\%$ in Kontrollzellen (Random S-ODN I: 71%, Random S-ODN II: 77%, Random S-ODN III: 73,8%, unbehandelt: 78,2%) auf 47,6% in mit Antisense S-ODN III behandelten Zellen, auf 22,1% in Zellen, die mit Antisense S-ODN I, und auf 17,7% in Zellen, die mit Antisense S-ODN II behandelt wurden, ab (Abb. 27).

Am 16. Tag war eine Abnahme der Werte von $70 \pm 9\%$ in Kontrollzellen (Random S-ODN I: 63%, Random S-ODN II: 71,1%, Random S-ODN III: 69,3%, unbehandelt: 78,3%) auf 14,2% bei Antisense S-ODN I und auf 13,8% bei Antisense S-ODN II behandelten Zellen zu verzeichnen. Zellen, die Antisense S-ODN III ausgesetzt waren, zeigten eine Herabsetzung des Wertes auf 55,3%. Sämtliche Werte waren statistisch unterschiedlich signifikant, $p < 0,05$ (Abb. 28).

Ein Vergleich der Werte vom 12. und 16. Tag ließ eine weitere signifikante Abnahme des Bereichs der Myosinquerstreifung in Prozent der Zellfläche bei Antisense S-ODN I und II erkennen ($p < 0,05$).

2.4 Auswirkungen auf die Kontraktilität der Zellen

Unbehandelte Zellen verhielten sich entsprechend der Standardisierung (im Kapitel IV, 1.3 beschrieben), d.h. sie waren die erste Woche in Kultur quieszent und begannen vom 8. Tag an, sich zu kontrahieren. Diese zeitlich unregelmäßigen Kontraktionen konnten deutlich noch am 16. Tag, dem Ende des Experiments, beobachtet werden. Random S-ODN I, II oder III behandelte Zellen verhielten sich ähnlich, wobei Kontraktionen einen Tag früher zu beobachten waren und außerdem besonders in späteren Kulturperioden (Tag 12-16) ein vermehrtes Vorkommen an Kontraktionen verglichen mit den unbehandelten Zellen festzustellen war. Zellen, die Antisense S-ODN I, II oder III ausgesetzt waren, verhielten sich zu Beginn der Kultur wie die Random S-ODN I-III behandelten Zellen, d.h. einzelne Zellen begannen, sich am 7. Tag zu kontrahieren. Auffällig war jedoch, daß vom 11. Tag an in keiner der drei Antisense-Kulturen Kontraktionen beobachtet werden konnten. Die Zellen waren wieder quieszent.

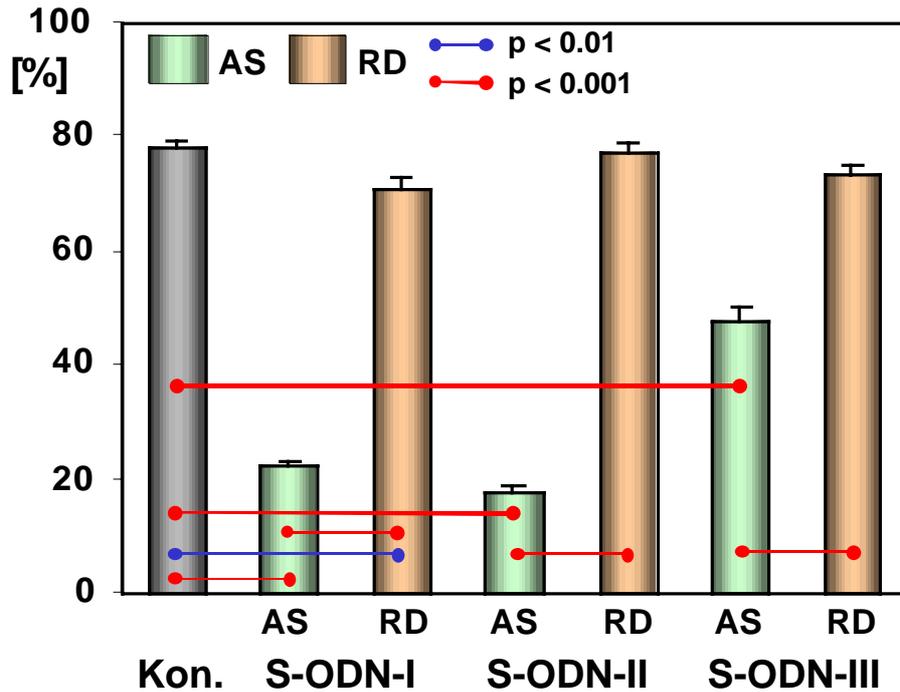


Abb. 27: Die quantitative Analyse des Grades der Myosinfilamentinkorporation ergab am 12. Tag eine signifikante Reduzierung der Fläche der Myosinquerstreifung in Prozent der gesamten Zellfläche bei S-ODN I-III. Die Daten sind als SEM angegeben.

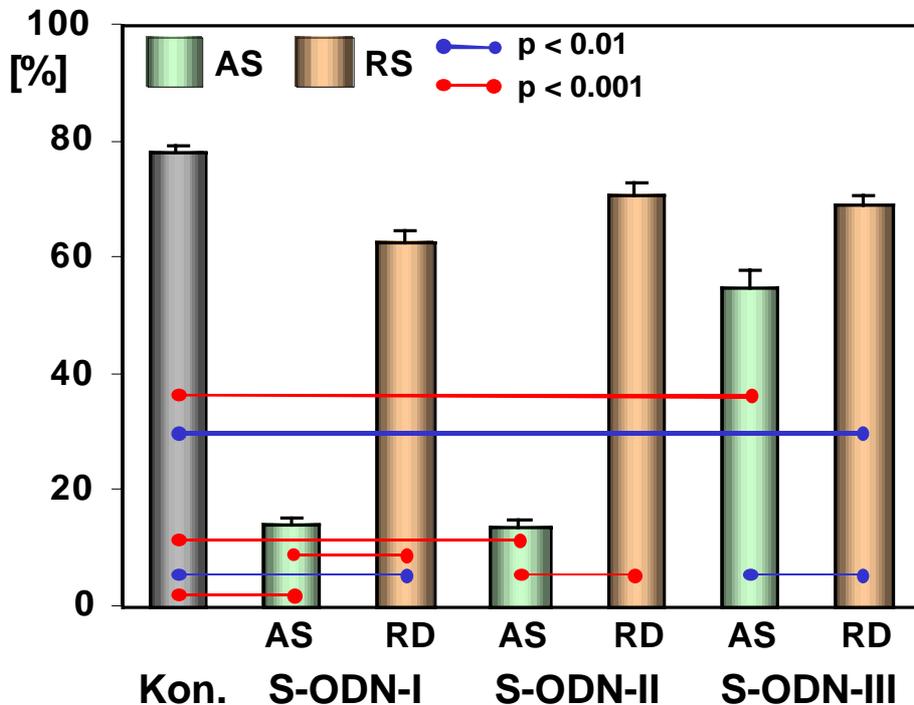


Abb. 28: Die quantitative Analyse des Grades der Myosinfilamentinkorporation ergab am 16. Tag ebenfalls eine signifikante Reduzierung der Fläche der Myosinquerstreifung in Prozent der gesamten Zellfläche. Die Myosinquerstreifung war bei Verwendung von S-ODN I und II stärker reduziert als bei S-ODN III. Die Daten sind als SEM angegeben.

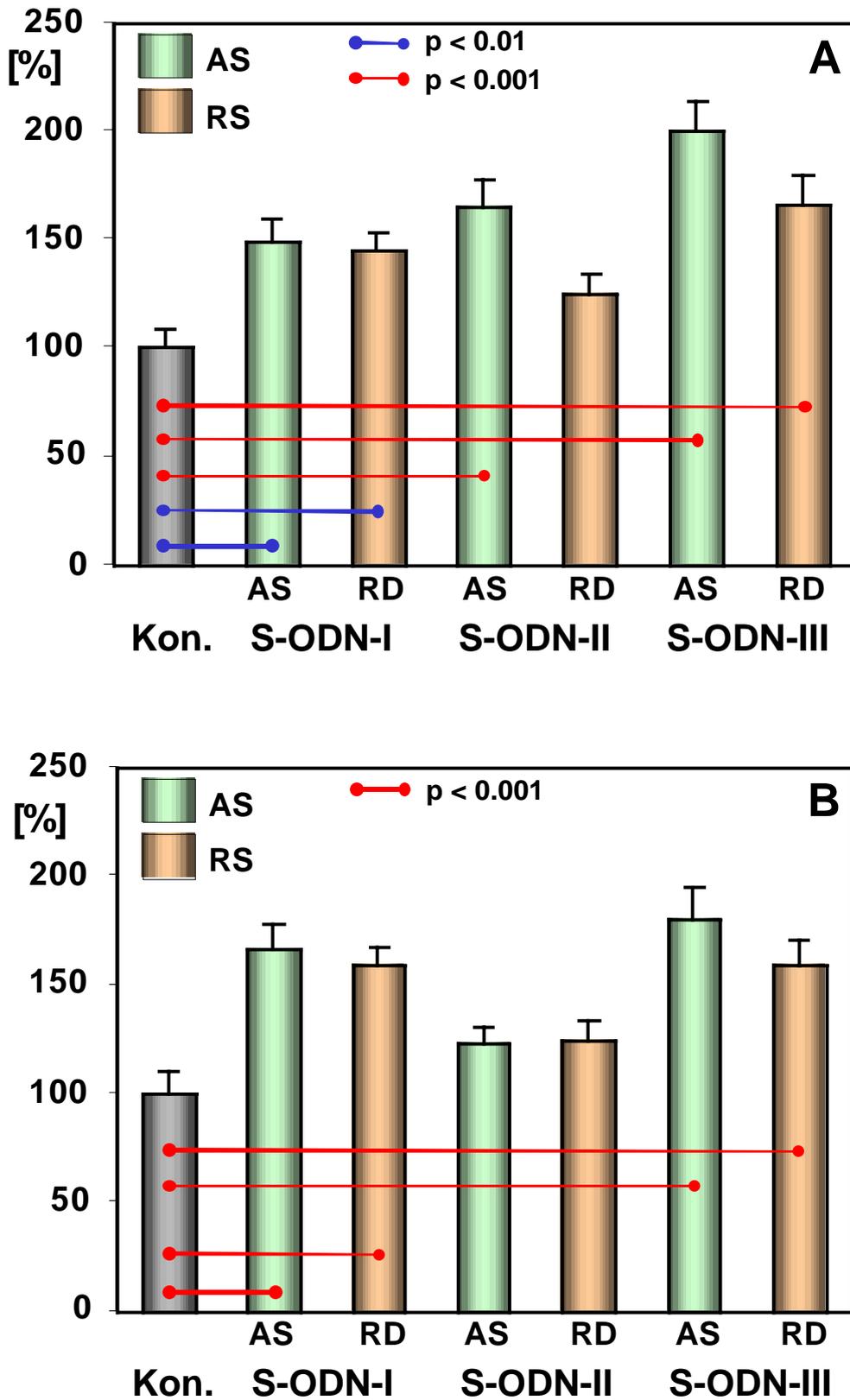


Abb. 29: Die quantitative Analyse der Zellgröße zeigte am 12. und 16. Tag einen signifikanten Anstieg sowohl bei Random- als auch bei Antisense S-ODN behandelten Zellen. Die Daten sind als SEM angegeben.

2.5 Quantitative Analyse der Zellflächen

Beim Vergleich der Größe der Zellflächen der unterschiedlichen Gruppen (Antisense S-ODN I-III, Random S-ODN I-III und unbehandelt) wurde deutlich, daß die durchschnittliche Zellgröße von Zellen, die 12 und 16 Tage kultiviert und während dieser Zeit entweder mit Antisense oder Random S-ODN behandelt wurden, 1,5-2,0 fach größer war als die von unbehandelten Zellen. Ein Vergleich der Werte vom 12. und 16. Tag ergab keinen weiteren signifikanten Anstieg bezüglich der Zellgröße (Abb. 29).

3. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte die Hypothese getestet werden, daß die Anwesenheit und Organisation von Titin eine Voraussetzung für die Sarkomerogenese ist. In diesem Zusammenhang wurde der Einfluß einer Titinexpressionsstörung auf die Inkorporation der Myosinfilamente in die Sarkomeren mittels spezifischer Antisense-Oligodesoxynukleotide untersucht. ARC in Langzeitkultur erwies sich hierbei zur Untersuchung des Myosineinbaus als geeignetes Modell.

a) Im ersten Teil der Untersuchung wurde die prozentuale Verteilung der unterschiedlichen zellulären Phänotypen der ARC in Langzeitkultur über 28 Tage bestimmt. Auf der Basis dieser Daten wurde das Entwicklungsstadium der Zellen am 12. und 16. Tag für weitere Untersuchungen gewählt. Zu diesem Zeitpunkt sind die Zellen ausgebreitet und im fortgeschrittenen Prozeß der Redifferenzierung, d.h. die Zellen weisen eine Vielzahl neuer Sarkomeren auf. Immunzytologisch konnte gezeigt werden, daß α -Aktinin in der Sarkomerogenese sehr früh erscheint, gefolgt von Titin, Myomesin und Myosin.

Die immunzytochemischen Ergebnisse und die erneute Kontraktilität in der Zellkultur signalisieren den Beginn der Redifferenzierung nach einer Woche. Diese Voruntersuchungen stellen die Grundlage für die Antisense-Oligodesoxynukleotid-Experimente dar.

b) Mit Hilfe von Fluorescein-markierten S-ODN konnte veranschaulicht werden, daß Kardiomyozyten S-ODN aufnehmen. Eine zusätzliche Konjugation mit Cholesterol führte nicht zu einer effizienteren Aufnahme in die Zellen.

- c) Kardiomyozyten, die 12 und 16 Tage kultiviert und während dieser Zeit entweder mit Antisense S-ODN I-III oder Random S-ODN I-III transfiziert wurden, zeigten einen 1,5-2,0 fachen Anstieg der durchschnittlichen Zellgröße im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen.
- d) Die Markierungen für α -Aktinin und F-Aktin (SFLS) eigneten sich als Indikator für Zellintegrität, da sie durch die Antisense S-ODN Behandlung nicht beeinflusst wurden.
- e) Die Expression von Titin war gegenüber Kontrollzellen (Random S-ODN und unbehandelt) in Antisense behandelten Zellen erheblich reduziert. Dies war deutlich sichtbar anhand der hochgradig verminderten Titinmarkierung.
- f) Im Vergleich zu Kontrollzellen, die sich durch große Areale typischer quergestreifter Myosinmarkierung auszeichneten, zeigte die Mehrzahl der mit Antisense S-ODN I-III transfizierten ARC ein fast vollständiges Fehlen der Querstreifung für Myosin, das nur noch diffus verteilt in der Zelle vorkam, während einige Zellen noch einen begrenzten Bereich der Myosinquerstreifung, umgeben von diffuser Myosinmarkierung, aufwiesen. Die spezifische Hemmung der Titinexpression führte somit zu einer gestörten Inkorporation der Myosinfilamente in die Sarkomeren.
Der Bereich der veränderten Myosinmarkierung in Antisense S-ODN transfizierten Zellen entsprach in seiner Ausdehnung dem Gebiet der Myosinmarkierung in quergestreifter Form von Kontrollzellen. Die Myosinexpression war somit nicht beeinträchtigt.
- g) Die quantitative Bestimmung des Gebiets der Myosinquerstreifung in Prozent der Zellfläche bei Zellen, die Querstreifung aufwiesen, zeigte im Vergleich zu Kontrollzellen am 12. Tag einen signifikant reduzierten Bereich regelmäßiger Querstreifung in ARC, die mit Antisense S-ODN I-III behandelt wurden. Am 16. Tag war eine weitere signifikante Abnahme dieses Parameters bei Antisense S-ODN I und II zu erkennen.

Schlußfolgerung:

Die Hemmung der Titinexpression durch Antisense-Oligodesoxynukleotide resultiert in einer Störung der Myosinfilamenteingliederung in die Sarkomeren. Die hier vorgestellten Ergebnisse bestätigen die Hypothese, daß die Anwesenheit und Organisation von Titin eine Voraussetzung für die Sarkomerogenese ist.

V. DISKUSSION

In der vorliegenden Studie wurde mit Hilfe von Antisense-Oligodesoxynukleotid-Experimenten die Hypothese untersucht, daß die Expression von Titin Voraussetzung für die Bildung neuer Sarkomere in adulten Kardiomyozyten ist.

Die Ergebnisse belegen erstmals, daß es möglich ist, die Translation von Titin durch Antisense-Oligodesoxynukleotide zu beeinflussen und daß dies in Folge zu einer Störung der Inkorporation von Myosinfilamenten in die Sarkomeren führt.

Desweiteren wird im wesentlichen die in der Literatur bereits geäußerte Meinung unterstützt, daß Titin als "molekulares Lineal" die aufeinanderfolgenden Ereignisse in der Sarkomerogenese bestimmt ⁷⁵.

In der Literatur finden sich diverse Studien über Antisense-Oligodesoxynukleotide, jedoch wurden diese Antisense-Oligodesoxynukleotid-Experimente fast ausschließlich an neonatalen Kardiomyozyten in Kultur oder diversen anderen Zelllinien durchgeführt ¹²¹⁻¹²⁵. Die vorliegende Studie präsentiert somit erstmalig Auswirkungen von Antisense-Oligodesoxynukleotiden auf die Sarkomerogenese adulter Rattenkardiomyozyten (ARC) in Kultur.

1. Redifferenzierungsmodell von ARC in Langzeitkultur

1.1 Zwei Methoden der Kultur von ARC

Isolierte ARC in Kultur stellen ein geeignetes experimentelles Modell zur Untersuchung des molekularen und zellulären Verhaltens von Herzzellen dar. Da adulte Kardiomyozyten physikalisch eng miteinander durch Glanzstreifen (Disci intercalares) und extrazelluläre Matrix verknüpft sind, gestaltet sich die Isolierung dieser Zellen äußerst schwierig. Erst im Jahre 1976 konnte eine Technik zur Isolierung lebender adulter ventrikulärer Myozyten beschrieben werden ¹²⁶, und adulte Zellen wurden zum ersten Mal 1977 kultiviert ¹²⁷.

Zwei grundsätzlich unterschiedliche Methoden der Kultur adulter ventrikulärer Myozyten wurden entwickelt ¹²⁸:

- a) Im "schnellen Anheftungsmodell" (rapid attachment model) werden die Zellen in einem serumfreien Medium in beschichtete Kulturschalen verbracht. Die Zellen heften sich schnell an und behalten die zylindrische Form und die Querstreifung frisch isolierter Kardiomyozyten bis zu einer Woche, erlangen aber nur selten

spontanes Kontraktilitätsvermögen. Dieses Modell wird oft für Kurzzeitexperimente, z.B. für metabolische oder pharmakologische Studien, verwendet.

b) In der „Redifferenzierungsmethode“, die auch in dieser Dissertation verwendet wurde, können Myozyten in einem mit Serum angereicherten Medium Wochen und sogar Monate gehalten werden^{127,129,130}. Die frisch isolierten zylindrischen Kardiomyozyten durchlaufen eine morphologische Veränderung, in dem sie sich abrunden (dedifferenzieren) und später nach erfolgter Anheftung mit pseudopodienartigen Fortsätzen auf der beschichteten Fläche der Kulturschale ausbreiten und ihr Zytoskelett reorganisieren (redifferenzieren). In der Dedifferenzierungsphase wird dabei der vorhandene, voll ausgebildete myofibrilläre Apparat degradiert (Verlust der Sarkomeren) und in der Redifferenzierungsphase wieder allmählich aufgebaut (*de novo* Myofibrillogenese)¹³¹. Präexistierende Proteine werden während dieses Prozesses zumindest teilweise wiederverwendet. Während des weiteren Ausbreitungsprozesses, der eine Zellhypertrophie auf das zwei- bis dreifache bewirkt, treten Veränderungen in der Ultrastruktur auf, die auf eine Differenzierung hindeuten, deshalb wurde diese Kulturtechnik als Redifferenzierungsmethode beschrieben^{113,132-134}. Diese Zelltransformation und die Hypertrophie konnten in der vorliegenden Studie ebenfalls gezeigt werden.

Die Beschichtung, d.h. die Extrazellulärmatrix, ist ebenfalls von großer Bedeutung für das Wachstum der Zellen. Fibronectin, Laminin und Kollagen IV sind die häufigsten verwendeten Proteine. In der vorliegenden Studie wurde Laminin verwendet. Es besitzt mit einem langen und drei kurzen Armen eine kreuzartige Form und ist aus drei Ketten, eine A-Kette (400 kDa) und zwei kürzeren Ketten B1 und B2 (beide 200 kDa), aufgebaut¹³⁵.

Die Myozyten neigen nach einiger Zeit in der Kultur zu spontanen Kontraktionen^{127,128,136,137}. Wenn sich Kontakte zwischen benachbarten Zellen bilden, treten synchrone Kontraktionen dieser Zellen auf, was als Hinweis für die Reexpression funktioneller „Gap junctions“ zu werten ist^{128,138}.

In der vorliegenden Studie konnten nach ungefähr einer Woche Kontraktionen beobachtet werden, die sich im Falle eines Zellkontaktes auf Nachbarzellen fortsetzten. Diese spontanen Kontraktionen können mit der kontraktilen Aktivität von intaktem fetalen Gewebe verglichen werden. Sie entstehen vermutlich durch die Wirkung von Katecholaminen und anderer positiv inotroper Bestandteile, die sich im Serum befinden. Das Serum stellt in diesem Zusammenhang ein Problem dar, da es unbekannte Konzentrationen von vielen Wachstumsfaktoren und Hormonen beinhaltet, welche unterschiedliche Auswirkungen auf die Myozyten haben¹³⁹. Aus diesem Grund wurde über die ganze Versuchsdauer nur eine

bestimmte Charge von FCS verwendet, um die gleichen Bedingungen zu gewährleisten. Desweiteren kann auch die Myozytendichte die Kontraktilität der Zellen *in vitro* beeinflussen. In dicht ausgesäten Kulturen mit einem hohen Anteil an interzellulären Kontakten kommt es zu spontanen Kontraktionen ohne den Zusatz von β -adrenergen Agonisten ¹³⁹.

Guo et al. ¹³² stellten kontraktile Aktivität schon nach vier bis sechs Tagen fest. Diese Diskrepanz zu den eigenen Ergebnissen von einer Woche kann auf verschiedenen Faktoren wie z.B. unterschiedliches Beschichten der Kulturobjektträger, Zellmedium oder Zelldichte begründet sein. Bei einer höheren Zelldichte der Kardiomyozyten sind Kontraktionen der Zellen etwas früher zu beobachten. Im wesentlichen stimmen die Ergebnisse jedoch überein, da zu Anfang eine Dedifferenzierungsphase ohne erkennbare kontraktile Aktivität vorliegt, gefolgt von der Redifferenzierung mit sich ausbreitenden, wieder kontrahierenden Kardiomyozyten, welche neu gebildete Sarkomere erkennen lassen.

Dieses Redifferenzierungsmodell ermöglicht somit die Evaluation adaptiver regulatorischer Prozesse, die in Kurzzeitkulturen nicht in Erscheinung treten. In der Langzeitkultur ist es jedoch möglich, die Plastizität der hochdifferenzierten adulten Kardiomyozyten und die Fähigkeit, ihren myofibrillären Apparat vollständig wiederherzustellen, zu untersuchen ¹³⁹.

1.2 Vorteile und Nachteile der Langzeitkultur von ARC

Die Mehrzahl der Langzeitstudien, die sich mit kultivierten Myozyten befassen, wurden an embryonalen und neonatalen Kardiomyozyten durchgeführt ¹⁴⁰⁻¹⁴². Jedoch sind mit Rücksicht auf die *in vivo* Situation Studien an adulten Kardiomyozyten vorzuziehen, denn neonatale Kardiomyozyten sind im Gegensatz zu den enddifferenzierten adulten Zellen in der Lage zu proliferieren und besitzen ein ausgeprägteres Anpassungspotential. Außerdem stellen Veränderungen zum Beispiel in der Expression kontraktiler Proteinisoforamen, wie sie in embryonalen und neonatalen kultivierten Myozyten bekannt sind, eine Problematik für die Interpretation und die Übertragung der Ergebnisse auf die ausdifferenzierte adulte Herzmuskulatur dar.

Vorteile der Kardiomyozyten in Langzeitkultur sind mit Sicherheit darin zu sehen, daß die Eigenschaften der Myozyten unter einer kontrollierten Umgebung ohne Beeinflussung von anderen Zellen (wie Fibroblasten und endothelialen Zellen) über Tage und Wochen erforscht werden können. In der vorliegenden Dissertation wurde ein Dichtegradient mit Percoll durchgeführt, um Fibroblasten und die durch die Isolierung beschädigten und abgerundeten Kardiomyozyten von der intakten

Zellfraktion (stäbchenförmige Kardiomyozyten) zu separieren. Anschließend wurde dem Medium Cytosin Arabinosid zugesetzt, um noch möglicherweise vorhandene Fibroblasten in ihrer Proliferation zu hemmen.

Den Myozyten bietet sich in der Langzeitkultur die Möglichkeit, Schäden und Irritationen, die während der enzymatischen Isolierung auftreten können, zu reparieren und geschädigte Membranproteine (z. B. Rezeptoren und Ionenkanäle) wieder zu reexprimieren. Zusätzlich zu diesen experimentellen Vorteilen sprechen auch ethische und praktische Gründe für die Langzeitkultur von Kardiomyozyten, da zum einen weniger Tiere für die Versuche herangezogen werden müssen und zum anderen zeitliche und finanzielle Einsparungen bezüglich der Isolierung möglich sind.

Natürlich können Kardiomyozyten in Kultur trotz der erwähnten Vorteile nur ein Ersatz bzw. ein Modell für das Tier oder für intakte Herzpräparationen darstellen. Die Myozyten passen sich an die zweidimensionale Umgebung in der Zellkultur in der Weise an, daß sich zytoskelettäre Komponenten und kontraktile Proteine reorganisieren. Jedoch können viele *in vivo* Eigenschaften der adulten Herzmuskulatur auch in den stark morphologisch veränderten Phänotypen beobachtet werden¹³⁷. Die Fähigkeit der Herzzellen, an Glanzstreifen Pseudopodien zu bilden, ist auch *in vivo* bei einer Läsion von großer Wichtigkeit. Bei einer Läsion werden lebende Kardiomyozyten von nekrotischen abgetrennt. Die lebenden Zellen müssen dann in der Lage sein, die alte Glanzstreifenregion abzubauen und zu remodellieren, damit neue Kontakte (neue Glanzstreifen) zu anderen Zellen möglich sind¹⁴³.

Aufgrund der Vorzüge der Kardiomyozyten in Kultur repräsentieren diese Zellen ein geeignetes adultes *in vitro* Modell für verschiedene Studien, insbesondere für Langzeitstudien.

1.3 Vergleich der *in vivo* und *in vitro* Studien

Wie in der Einleitung (Kapitel II, 3) beschrieben, stimmen die Ergebnisse der Entwicklungsmuster der unterschiedlichen Proteine der *in vivo* und *in vitro* Studien größtenteils überein, jedoch gibt es auch Unterschiede zwischen den beiden Systemen. Ursache hierfür könnte die unterschiedliche Zeitdauer im Ablauf der Prozesse sein, da die Sarkomerogenese im Embryo sehr viel schneller abläuft als das in einem *in vitro* System der Fall ist. Allerdings bietet sich hiermit aber auch die Gelegenheit, Übergangsstadien, die im Embryo vielleicht nur wenige Minuten andauern, im *in vitro* System sichtbar zu machen, da sie hier mehr Zeit in

Anspruch nehmen. Eine zweite Möglichkeit für Diskrepanzen könnten die unterschiedlichen Antikörper sein, die in den verschiedenen Studien verwendet wurden. Zum Beispiel können die Färbemuster im Falle des riesigen Moleküls Titin stark differieren, wenn unterschiedliche Epitope für die Färbung gewählt wurden.

1.4 Phänotypen von ARC

Das Redifferenzierungsmodell der ARC eignet sich aus den genannten Gründen zur Untersuchung der Sarkomerogenese. Es bestehen allerdings große Unterschiede zwischen den einzelnen Zellen bezüglich des Ausbreitungsverhaltens und des Erscheinens sarkomerer Strukturen (eigene Beobachtung, ^{129,130}). Deshalb wurde eine quantitative Bestimmung der ARC Phänotypen an konkreten Zeitpunkten durchgeführt, um das typische Wachstums- bzw. Ausbreitungsmuster dieser Zellen zu dokumentieren.

Genaue quantitative Bestimmung des Wachstumsmusters der Myozyten in Abhängigkeit von der Zeit und die Standardisierung dieses Musters waren Grundlage für die Untersuchung der Auswirkungen von Oligodesoxynukleotiden auf die Sarkomerogenese der Kardiomyozyten.

Die bei der Wachstumsmusteranalyse erhaltenen Daten, vervollständigt durch die Befunde der Expression spezifischer Marker des kontraktilen Apparates und die wiedergewonnene kontraktile Aktivität in Kultur, weisen auf einen Beginn der Redifferenzierung nach einer Woche in Kultur hin. Dies bestätigt die Ergebnisse anderer Forschergruppen, die ebenfalls den Anfang der Redifferenzierungsphase der kultivierten Kardiomyozyten nach ungefähr einer Woche beschreiben ^{134,144}.

2. Sarkomerogenese

Die vorliegenden Ergebnisse stimmen mit Studien überein, die das Vorhandensein von typischen quergestreiften Myofibrillen im Zentrum der Zellen und nicht-gestreifte Myofibrillen in der Zellperipherie beschreiben ¹³³. Allerdings wurden auch Zellen beobachtet, bei denen sich die Querstreifung der Myofibrillen bis zur Peripherie ausdehnte, so daß die gesamte Zelle angefüllt mit Sarkomeren in regelmäßiger Querstreifung erschien. Dies war gehäuft ab dem 12. Tag in Kultur zu beobachten und stellte somit ein fortgeschrittenes Stadium der Sarkomerenneubildung dar, da die Bildung neuer Sarkomere, erkennbar an der Querstreifung, in erster Linie im Zentrum der Zellen begann.

Während die Myofibrillen in frisch isolierten Kardiomyozyten longitudinal parallel zueinander angeordnet sind, liegen sie in ausgebreiteten, kultivierten Zellen unregelmäßig angeordnet vor, wobei sie sich in Richtung der jeweiligen Zellfortsätze zu orientieren scheinen¹³³. Dies konnte ebenfalls in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Bis jetzt ist jedoch unklar, ob die quergestreiften Myofibrillen im Zellzentrum *de novo* synthetisiert wurden oder ob sie nicht-degradierte originale Myofibrillen repräsentieren.

2.1 Titin und α -Aktinin

Die ersten Zellausläufer oder Pseudopodien-ähnlichen Fortsätze, die die beginnende Ausbreitung signalisieren, färben sich für Titin und vor allem für α -Aktinin in einem punktierten, perlenartigen Muster an, wobei die Abstände der Punkte zueinander unregelmäßig und kürzer als die normale Sarkomerlänge (1,7-2,2 μm) sind. Sanger et al.⁹⁶ konnten mit Hilfe von fluoreszenzmarkiertem α -Aktinin, welches in embryonale Myotuben und Kardiomyozyten injiziert wurde und sich daraufhin in die Z-Banden der Myofibrillen einlagerte, zeigen, daß die eng angeordneten Punkte α -Aktinin enthalten, die sich im weiteren Verlauf zu Z-Banden differenzieren. Sie nannten diese spezielle Formation mit den kurzen Distanzen von 0,3-1,3 μm 'Mini-Sarkomeren'. Diese Mini-Sarkomeren waren linear angeordnet und färbten sich außerdem für Skelettmyosin an. Dies steht im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen, die die punktförmige Anordnung von α -Aktinin als unregelmäßig und selten linear beschreiben und eine Myosinquerstreifung ausschließlich im quergestreiften Bereich von Titin bzw. α -Aktinin finden. Das bedeutet, daß Myosin erst in Erscheinung tritt, wenn der Ausbreitungs- und Redifferenzierungsprozeß fortgeschritten ist.

Nag et al.¹³⁴ studierten ebenfalls den Wiederaufbau des kontraktiven Apparates an adulten Kardiomyozyten (Katze, Ratte). Sie beobachteten punktartige Strukturen, welche aus einem amorphen α -Aktininpool auftauchten. Fast zur gleichen Zeit ließ sich eine periodische Lokalisation von Titin erkennen, die in enger Verbindung zu α -Aktinin zu stehen schien. Diese Komplexe stellten laut Nag et al. zukünftige Z-Linien dar, an die sich die Aktinfilamente anlagern und somit die sogenannten IZI-Strukturen bilden. Allerdings unterscheiden sich diese Titin-assoziierten Komplexe von den IZI-Komplexen, die in embryonalen Herzmuskelzellen^{108,109} und in embryonalen Skelett- und Herzmuskelzellen anderer Autoren^{20,22,97,112} gefunden wurden, da in diesen Studien Titin nicht vorkam. Nag et al. konnten jedoch in ihrer Studie zeigen, daß Titin- und α -Aktinin-Markierungen koexistent waren, was wiederum auf die räumliche und zeitliche Nähe des Erscheinens dieser

beiden Proteine in frühen Stadien der Myofibrillogenese hindeutet. Bis zu einem gewissen Grad war dies auch in der vorliegenden Studie der Fall, wobei jedoch α -Aktinin in den Zellausläufern in größerer Menge vertreten war. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß sich IZI-Komplexe mit muskelspezifischen Antikörpern anfärben¹³⁴. Dies wurde auch in embryonalen Herzmuskelzellen beobachtet²¹ und unterstützt die Vermutung, daß sich die Proteine aus dem fibroamorphen Pool der degradierten Proteine rekrutieren. Nag et al. beschrieben sowohl bei jüngeren als auch bei älteren Zellen das Vorhandensein einer fibroamorphen Masse. Dies kann nur teilweise bestätigt werden, da im Gegensatz zu den jüngeren gerade ältere Zellen keinen amorphen Proteinpools mehr aufweisen, sondern eine klare Querstreifung der Myofibrillen präsentieren, wie die konfokalen Bilder verdeutlichen.

2.2 F-Aktin

Die hier untersuchten Proteine α -Aktinin, Titin, Myomesin und Myosin waren deutlich mit Aktinfilamentbündeln assoziiert, welche sich mit TRITC-Phalloidin anfärben ließen und durch das gesamte Zytoplasma der Zelle zogen. In ihrem Erscheinungsbild ähnelten sie den Streifefaser-artigen Strukturen, die von Dlugosz et al.¹¹⁰ in embryonalen Hühnerkardiomyozyten beschrieben wurden. TRITC-Phalloidin färbt sowohl die β - und γ -Aktinfilamente in den SFLS, als auch das polymerisierte α -Aktin, aus welchem die dünnen Filamente bestehen. Da aber die Färbemuster der SFLS und der dünnen Filamente sehr unterschiedlich sind, sind diese beiden Strukturen gut zu unterscheiden. Das sarkomere Muster der Myofibrille ist regelmäßig gestreift, während sich die SFLS kontinuierlich mit TRITC-Phalloidin anfärben.

Die Doppelmarkierung von α -Aktinin und Aktin (F-Aktin und α -Aktin) machte deutlich, daß das Erscheinen und die periodische Anordnung von α -Aktinin denen von Aktin vorausgehen. Dies impliziert eine Rolle für α -Aktinin als Ansatzpunkt für Titin und Aktin zur Bildung der Titin-assoziierten IZI-Strukturen, an denen dann wiederum die anderen sarkomeren Proteine anlagern können.

Dlugosz et al. postulierten, daß die SFLS, die ersten Fibrillen, die sich in der Peripherie einer sich ausbreitenden Herzzelle bilden, als erste Matrize für den Sarkomerenaufbau dienen. Laut ihren Befunden bestanden sie aus Nichtmuskelisofomen von Aktin, Myosin und α -Aktinin, die sich allmählich in neue Myofibrillen durch Austausch dieser Nichtmuskelpoteine mit Muskelproteinen verwandeln. Allerdings konnte in der hier vorliegenden Studie gezeigt werden, daß adulte Kardiomyozyten schon in den frühen

Sarkomerogenesestadien muskelspezifische Proteine exprimieren, deshalb trifft dieses Modell nur bedingt zu, jedoch kann auch in ARC das Vorkommen von SFLS als Matrize bestätigt werden.

Andere Gruppen konnten zeigen, daß Strukturen aus α -Aktinin, Aktin und Titin, die sogenannten IZI-Komplexe, eng assoziiert mit den SFLS sind und dadurch nicht-gestreifte Myofibrillen (NSMF) entstehen. Einige Forschergruppen glauben, daß die IZI-Strukturen und die A-Banden (Myosin) gleichzeitig auf den SFLS assemblieren^{97,145,146}, während andere die Idee vorschlagen²² oder unterstützen¹⁴⁷⁻¹⁴⁹, daß frühe Sarkomere durch die Zusammenlagerung von unabhängig voneinander assemblierten dicken Filamenten und IZI-Strukturen entstehen. Studien an Skelettmuskelzellen, die mit Mikrotubuli-depolymerisierenden und -stabilisierenden Reagenzien behandelt wurden, kamen zum gleichen Ergebnis^{20,147}. Dieser Vorschlag des unabhängigen Zusammenbaus von zwei strukturellen Einheiten würde offensichtlich eine Art Schablone benötigen. Diese Aufgabe könnten die SFLS erfüllen, und Titin könnte die IZI-Struktur mit dem dicken Filament in Verbindung bringen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen beide Hypothesen, da die Proteine einerseits deutlich mit den SFLS assoziiert sind und andererseits durch Blockieren der Translation von Titin das integrierende Element fehlt und folglich Myosin nicht an der vorgesehenen Stelle im Sarkomer eingelagert werden kann. Dies wird hier deutlich durch das diffuse Erscheinungsbild der Myosinfärbung in mit Antisense-Oligodesoxynukleotiden transfizierten Zellen gezeigt.

2.3 Myosin und Myomesin

Myosin und Myomesin erscheinen in periodischem Muster in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu α -Aktinin und Titin in einem verzögerten Zeitabstand. Außerdem waren bei beiden Proteinen keine punktartige Strukturen in den Zellausläufern zu erkennen. Dieser Befund stimmt somit mit *in vivo* Studien von Hühnerherzen^{18,19} und von embryonaler Skelettmuskulatur der Maus²² überein. In den Hühnerherzen wurden umschriebene Titinstrukturen beobachtet, während Myosin noch diffus in der Zelle verteilt vorlag. In murinem Skelettmuskelgewebe konnte Titin vor Myosin immunhistochemisch festgestellt werden. Auch von humanen Skelettmuskelzellen wurde berichtet, daß Titin und Myosin nicht simultan exprimiert werden, außerdem konnte klar gezeigt werden, daß Titinmarkierungen sich vor Myosinmarkierungen an die SFLS angelagert hatten¹⁴⁹.

Handel et al.¹¹¹ demonstrierten jedoch in ihrer Untersuchung an embryonalen

Hühnerkardiomyozyten *in vitro* Gegensätzliches. Sie fanden die zeitlich fast gleiche Expression von Titin, Myosin, Aktin und Tropomyosin in den sich entwickelnden Sarkomeren. Zu diesem Ergebnis kamen auch Hill et al. in einer Untersuchung der Skelettmuskelmyofibrillogenese *in vitro*, in der sie die gleichzeitige Synthese von Titin und Myosin in postmitotischen mononukleären Myoblasten zeigen konnten²⁰. Diese Diskrepanzen liegen vermutlich eher in technischen Details wie der mikroskopischen Auflösung und den unterschiedlichen Antikörpern begründet als in einem klaren Unterschied zwischen der *in vivo* und *in vitro* Situation.

Das zeitlich spätere Erscheinen von Myomesin im Vergleich zu α -Aktinin und Titin stimmt mit Studien anderer Autoren überein^{97,98,150}, die von einer relativ verzögerten Expression dieses M-Band-Proteins zu α -Aktinin, Titin und darüber hinaus zu den sarkomeren Isoformen von MHC (Myosin heavy chain) und Aktin berichteten. Auch diese Autoren zeigten, daß Myomesin nur in der M-Bande lokalisiert und zu keinem Zeitpunkt diffus im Zytoplasma verteilt war.

Seine Bindungseigenschaften weisen auf eine bedeutende Rolle im Zusammenbau der M-Bande und in der Stabilisierung des dicken Filamentes hin. Myomesin interagiert sowohl mit Titin als auch mit Myosin und könnte deshalb eine analoge Funktion wie α -Aktinin im Z-Streifen haben, d.h. es kann kontraktile Filamente, in diesem Fall Myosin, mit Titin verbinden⁵⁵.

Ein großer Unterschied zwischen embryonalen und adulten Kardiomyozyten ist sicherlich, daß in embryonalen Zellen die Myofibrillen aus neu synthetisierten myofibrillären Proteinen aufgebaut werden, während man in adulten Zellen zwei Quellen myofibrillärer Proteine in Betracht ziehen muß. Zum einen die präexistierende amorphe Form der myofibrillären Proteine, die durch die Degradation des sarkomeren Apparates in der Dedifferenzierungsphase entstanden ist, wie in dieser Studie und anderen^{134,151} gezeigt werden konnte. Zum anderen die in der transformierten Zelle neu synthetisierten myofibrillären Proteine. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit (turn-over) dieser Proteine *in vitro* ist anzunehmen, daß in erster Linie die *de novo* synthetisierten Proteine bei der Sarkomerogenese eine Rolle spielen.

Wie hier demonstriert werden konnte, beginnt der Zusammenbau der Sarkomere im Zentrum der Zellen, um sich anschließend peripher auszubreiten. Es wurden jedoch auch ektopische Stellen gefunden, die einige in regelmäßigem Abstand zueinander stehenden Sarkomere aufwiesen. Dies könnte als Hinweis auf die zweite Proteinquelle, nämlich die *de novo* Synthese, gewertet werden.

3. Hemmung der Titinexpression

3.1 Antisense-Strategie

Die im Kern befindliche doppelsträngige DNA enthält die genetische Information für alle Proteine. Bei der Transkription wird diese Information auf die einzelsträngige mRNA übertragen, welche anschließend ins Zytoplasma gelangt. Im Translationsschritt wird die Information der mRNA an den Ribosomen in Proteine umgesetzt (Proteinbiosynthese).

Antisense-Oligodesoxynukleotide sind kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle (15-25 Basen), die komplementär ("antisense"-Strang) zu einer spezifischen RNA- oder DNA-Sequenz ("sense"-Strang) einer Zelle synthetisiert werden. Ihre Funktion ist die sequenzspezifische Inhibierung der Translation bzw. Transkription und damit die Verhinderung der Biosynthese eines spezifischen Proteins ¹⁵².

Die Verwendung eines Oligonukleotids, welches komplementär zu einer DNA-Sequenz ist, nennt man Antigene-Strategie, wobei die Transkription durch Ausbildung einer Triplex-DNA (Hoogsteen-Bindung) unterbunden wird. Unter der Antisense-Strategie versteht man die komplementäre Bindung eines Antisense-Oligonukleotids an eine spezifische einzelsträngige RNA (prä-mRNA oder mRNA) durch Watson-Crick-Basenpaarbildung ¹⁵³. Diese Antisense-Strategie wurde erstmals 1978 von Zamecnik und Stephenson ¹⁵⁴ vorgestellt. Es gelang ihnen, die Expression des Rous Sarkoma Virus sequenzspezifisch in der Zellkultur zu hemmen.

Es wurden verschiedene Mechanismen der Antisense-Hemmung der Genexpression diskutiert, zum Beispiel die Hemmung der Proteinverlängerung durch eine sterische Blockade des Ribosoms durch die ODN (Verhinderung der Translation) ¹⁵⁵ oder die Bindung der ODN an die Initiationsregion der mRNA, welche die Bildung des ribosomalen Komplexes verhindert. Der häufigste Mechanismus ist vermutlich, daß die mRNA ein Substrat für das Enzym RNase H wird. Dieses Enzym erkennt die Fusion einer DNA mit einer mRNA (RNA/DNA Duplex) und spaltet den mRNA Strang, ohne das DNA-Oligonukleotid zu beeinflussen ^{152,156}.

In den letzten Jahren wurden Oligodesoxynukleotide vermehrt als potentielle therapeutische Wirkstoffe in klinischen Untersuchungen verwendet ¹⁵⁷. Es wurde von vielversprechenden Resultaten berichtet, wobei besonders die Behandlung maligner Zellen und virusinfizierter Zellen im Vordergrund stand ^{158,159}. Allerdings wird auch von Schwierigkeiten mit dieser Methode wie mangelhafte Stabilität der ODN im Organismus, unzureichende zelluläre Aufnahme und sequenzunabhängige

Effekte berichtet ¹⁶⁰. In der vorliegenden speziellen *in vitro* Anwendung ist diese Methode als zuverlässig zu betrachten, da die Instabilität durch eine Phosphorothioat-Modifikation überwunden werden konnte. Aufgrund der hohen Konzentration an S-ODN im Kulturmedium war auch die zelluläre Aufnahme der S-ODN gegeben. Sequenzunabhängige Effekte waren in der verstärkten Hypertrophie zu sehen. Da dies bei allen verwendeten S-ODN der Fall war, beruht dies möglicherweise auf einer unspezifischen Stimulation. Vorausgesetzt, daß auch *in vivo* diese Probleme beseitigt werden, könnte das Antisense-Konzept ein vielversprechender therapeutischer Ansatz aufgrund seiner Anwendbarkeit auf jegliches Genprodukt verbunden mit potentieller Spezifität darstellen.

3.2 S-ODN-Experimente

Als erster Schritt der S-ODN-Experimente mußte festgestellt werden, ob die Oligodesoxynukleotide von den Kardiomyozyten aufgenommen werden. Um dies zu zeigen, wurden Fluorescein-markierte Oligodesoxynukleotide in Vorversuchen eingesetzt. Diese konnten deutlich aufgrund ihrer Fluoreszenz in der überwiegenden Mehrheit der ARC im Zytoplasma und in den Zellkernen beobachtet werden. Dies weist auf einen aktiven Transportmechanismus hin. Die Oligodesoxynukleotide gelangen vermutlich über rezeptorvermittelte Endozytose nach Bindung an Zelloberflächenproteine in die Zellen ^{161,162}. Nach Eintritt in das Zytoplasma gelangen sie sehr rasch in den Zellkern. Dies konnte auch in der eigenen Studie beobachtet werden. Der eigentliche Transportmechanismus ist jedoch bis heute ungeklärt.

Um die Effizienz der Oligodesoxynukleotidaufnahme zu erhöhen, wurden Phosphorothioat-Oligodesoxynukleotide (S-ODN) verwendet, da diese Modifikation des Phosphodiester-Rückgrates zu einer erhöhten Widerstandskraft gegenüber Nukleasen führt und sie außerdem leichter in die Zellen gelangen sollen ¹⁶³⁻¹⁶⁵, was die vorliegende Studie bestätigen kann.

In der Literatur werden verschiedene Konjugationen von Oligodesoxynukleotiden mit einer großen Bandbreite von Molekülen, darunter Cholesterol ^{166,167}, kationische Lipide ^{125,159,168} und Liposomen ¹⁶¹ beschrieben. Diese konjugierten Oligodesoxynukleotide sollen laut Literatur zu einer effizienteren zellulären Aufnahme führen. In der vorliegenden Arbeit wurden Cholesterol- und Fluorescein-gekoppelte S-ODN verwendet, welche jedoch keine Verbesserung gegenüber den unkonjugierten S-ODN zeigten. Aufgrund der ausreichenden zellulären Aufnahme der unkonjugierten S-ODN konnte auf weitere Konjugationen verzichtet werden.

Als Kontrolloligodesoxynukleotide wurden in der hier vorliegenden Studie Random S-ODN verwendet, welche die gleiche Länge und die entsprechende Basenkomposition wie die Antisense S-ODN aufwiesen, jedoch in unterschiedlicher Reihenfolge. Auf die Verwendung von sense S-ODN wurde verzichtet, da die Möglichkeit besteht, daß sie an den Antisense-Strang der DNA binden und dadurch eine Hemmung der mRNA-Bildung (Transkription) verursachen ¹⁶⁹.

3.3 Auswirkungen der Transfektion mit Antisense S-ODN

Als Endpunkt der vorliegenden Studie wurde die Inkorporation der Myosinfilamente in die Sarkomeren gewählt, da Myosin im Vergleich zu Titin und anderen sarkomeren Proteinen später in die Sarkomeren eingebaut wird ^{170,171}. Folglich deutet das Vorhandensein von Myosin in quergestreifter Form auf die Beendigung dieses Prozesses hin. Dies wurde sowohl *in vitro* ^{130,134} als auch *in vivo* ^{22,28} beschrieben.

3.3.1 Einfluß auf das Verhalten von Titin und α -Aktinin

Die Antisense-Oligodesoxynukleotid-Experimente der vorliegenden Studie resultierten in einer deutlichen Abnahme der Expression von Titin, wie die immunzytologischen Untersuchungen belegen. Für das Vorhandensein der geringen Menge dieses Proteins in der Mehrheit der Zellen kommen zwei Möglichkeiten in Betracht. Zum einen könnte es sich um Überreste präexistierenden Proteins der ursprünglich stäbchenförmigen Zellen handeln (Halbwertszeit: ~70 Stunden ²³), da die Antisense S-ODN nur die *de novo* Synthese unterdrücken, und zum anderen könnte eine unvollständige Hemmung der Titinexpression vorliegen.

Im Gegensatz zu Titin wird die Ausprägung des quergestreiften Musters von α -Aktinin, das als Indikator der zellulären Integrität dient, durch diese Antisense-Behandlung nicht beeinflusst. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, daß sich der Zusammenbau und die Anordnung der IZI-Strukturen unabhängig von den dicken Filamenten vollziehen ¹⁷².

3.3.2 Einfluß auf das Verhalten von Myosin und Aktin

Die Myosininkorporation, sichtbar anhand der Querstreifung, war in Antisense S-ODN transfizierten Zellen (Antisense S-ODN I-III) minimal, während sie in Kontrollzellen ungefähr 75% der Zellfläche einnahm. Das Gebiet der diffusen Myosinmarkierung der Antisense S-ODN behandelten Zellen entsprach dem Gebiet der Myosinquerstreifung von Kontrollzellen. Diese Befunde deuten auf eine

ungestörte Expression von Myosin hin, wobei jedoch die Anordnung der Filamente in die Sarkomeren gestört ist. Die fehlende Lokalisierung des Myosins ist verantwortlich für die ebenfalls fehlende Kontraktilität von Antisense S-ODN behandelten Zellen, die ab dem 12. Tag festgestellt wurde.

Die Verringerung des Gebiets der Myosinquerstreifung (herabgesetzte Myosininkorporation) war bei Zellen, die Antisense S-ODN I und II ausgesetzt waren, stärker ausgeprägt als im Falle von Antisense S-ODN III behandelten Zellen. Eine mögliche Erklärung könnte in der unterschiedlich starken Auffaltung der mRNA begründet sein, die in der zentralen I-Banden-Region möglicherweise eine bessere Anbindung der Antisense-Oligodesoxynukleotide S-ODN I und II gewährleistet, da hier wenige "stem loops" (Auffaltung der mRNA) vorliegen. Die Auswahl von Zielsequenzen der mRNA spielt somit eine entscheidende Rolle. Häufig werden für die Antisense-Strategie Oligodesoxynukleotide gegen die Initiationsregion verwendet, da angenommen wird, daß um die 5'-Region das Startkodon für die Hybridisierung zugänglich ist. Für Titin sagen allerdings Programme ('RNA Fold') voraus, daß hier "stem loops" vorliegen, und außerdem sind keine Rattentitinsequenzen des 5'-Endes in der Datenbank verfügbar. Aufgrund dessen wurde die zentrale I-Banden Region gewählt, da hier extensives differentielles Spleißen stattfindet und die Exons dieser Region in allen Isoformen gefunden wurden¹¹⁸. Möglicherweise erleichtert diese Region die Hybridisierung der kurzsträngigen Antisense-Oligodesoxynukleotide mit der mRNA.

Van der Ven et al.¹⁷³ konnten in ihren Untersuchungen an BHK (Baby Hamster Kidney) - Zellen ähnliche Resultate bezüglich der Myosinfilamenteingliederung in die Sarkomere beobachten. Die BHK-Zellen sind in der Lage, Myofibrillen zu bilden. In ihren Studien verwendeten sie eine mutierte BHK-Zelllinie, die nur ungefähr 100 kDa am N-terminalen Ende des normalerweise 3 MDa großen Proteins exprimiert, da sie einen Defekt im Titingen aufweist. Auch diese Autoren beschrieben eine mangelhafte, diffuse Formation des dicken Filamentes, obwohl es in seiner Menge im Vergleich zu Kontrollzellen unverändert exprimiert wurde. Die Ergebnisse dieser Autorengruppe und die eigenen stimmen somit in den wesentlichen Punkten überein, jedoch sollte man dem Redifferenzierungsmodell adulter Rattenkardiomyozyten bei weiteren Studien den Vorzug geben, da dieses Modell der *in vivo* Situation näher kommt, als das Modell von Nierenzellen, welches die Übertragbarkeit der Ergebnisse aufgrund der unterschiedlichen Zellart erschweren kann.

Die Arbeitsgruppe um J.W. Sanger^{114,174} transfizierte embryonale Herz- und Skelettmuskelzellen mit einem Fusionskonstrukt, welches aus einem kurzen cDNA-Fragment der N-terminalen Region von Titin des Huhnes bestand, das mit

der cDNA für GFP (grün-fluoreszierendes Protein) verbunden war. Hierbei entstand ein dominant negativer Phänotyp für Titin, da die Titin-GFP-Fragmente mit dem nativen Titin um die Bindungsstellen im Z-Streifen konkurrierten. Zellen, die diese Titin-GFP-Fragmente überexprimierten, zeigten eine deutliche Disorganisation der Myofibrillen. Sowohl die Querstreifung der Z-Streifen und der A-Banden als auch die Kontraktilität gingen verloren. Turnacioglu et al.¹¹⁴ wiesen Titin deshalb in diesem Zusammenhang zwei grundsätzliche Aufgaben zu. Zum einen soll Titin Myosinfilamente in den Sarkomeren verankern, zum anderen soll es eine stabilisierende Funktion auf die Z-Streifen ausüben. In der vorliegenden Studie wurde ebenfalls eine ausgeprägte Desorganisation der Myosinfilamente gefunden, jedoch konnte eine Desorganisation der Z-Streifen in den mit Antisense S-ODN transfizierten Zellen nicht festgestellt werden. Dem Vorschlag einer stabilisierenden Funktion für die Z-Streifen kann deshalb nicht zugestimmt werden, jedoch ist der Einfluß der Titinfilamente für die Eingliederung der Myosinfilamente in die Sarkomere unübersehbar.

Wie schon in der Einleitung diskutiert, postulierten Ehler et al.²⁸ in ihrer Untersuchung an embryonalen Hühnerherzen, daß Titin, sobald sein C-Terminus lokalisiert ist, als Matrize bzw. Lineal für den sarkomeren Zusammenbau fungiert. Auch andere Autoren beschrieben, daß sich Titin zuerst mit seinem N-Terminus im Z-Streifen anordnet, um sich dann mit dem C-terminalen Ende zur M-Band-Region zu orientieren^{22,175}. Laut Ehler et al. verbindet es hierbei die dicken Filamente mit den Komplexen aus α -Aktinin, Aktinfilamenten und Titin (IZI-Komplexe), die als die ersten organisierten Strukturen der Myofibrillogenese in Erscheinung treten. Diese Hypothese stimmt mit einem Sarkomerogenesemodell an embryonalen Herzmuskelzellen in Kultur von Schultheiss et al.⁹⁷ und Komiyama et al.¹¹² überein, welches Titin als integrierendes Element in der Verbindung der Myosinfilamente mit den IZI-Strukturen beschreibt. Die in dieser Studie vorgestellten Antisense-Oligodesoxynukleotid-Experimente unterstützen diese Hypothesen, da die Inhibierung der Titinexpression und damit ein Mangel an Titinfilamenten in einer gestörten Myosinfilamentverteilung, in erster Linie gekennzeichnet durch eine diffuse Markierung, resultiert.

Die Formation und das typische Erscheinungsbild der SFLS waren nicht beeinflusst, allerdings war sarkomeres F-Aktin nur in der begrenzten Zone der Myosinquerstreifung, die sich hauptsächlich im Zellzentrum befand, sichtbar.

4. Hypertrophie

Studien über subzelluläre Veränderungen während der Differenzierung und Hypertrophie von Herzmuskelzellen sind wichtig für das Verständnis des Wachstums des Herzens, sowohl in der normalen Entwicklung als auch in Zuständen adaptiver, kompensatorischer Reaktionen. Im Verlauf dieser Anpassungsreaktionen unterliegt der kontraktile Apparat der Kardiomyozyten *in vivo* und *in vitro* strukturellen Veränderungen aufgrund der Bildung zusätzlicher Sarkomeren und teilweisem Abbau und Reorganisation der Myofibrillen.

In Langzeitkultur, wie in dieser Studie und in anderen^{133,142} beschrieben, nimmt die Zellgröße von unbehandelten adulten Kardiomyozyten um ein Vielfaches der ursprünglichen Größe zu, vergleichbar mit der kardialen Hypertrophie *in vivo*. Der signifikante Anstieg der Zellmasse (d.h. Proteinzunahme) spiegelt die hypertrophische Reaktion wider, die begleitet wird von einer Zunahme an myofibrillären Strukturen. Deshalb eignet sich dieses Modell auch sehr gut für das Studium der Sarkomerogenese, da es mit Hilfe von immunzytochemischen Methoden möglich ist, die einzelnen sarkomeren Proteine anzufärben und damit die verschiedenen Stadien näher zu beleuchten.

Eine weitere Besonderheit sowohl adulter ventrikulärer als auch neonataler ventrikulärer Kardiomyozyten in Langzeitkultur ist die Reexprimierung von Proteinen, die normalerweise nur während der fetalen Entwicklung des Herzens vorkommen, wie das α -Aktin der glatten Muskulatur (α -sm Aktin), α -Skelettmuskel-Aktin, die schwere Kette des β -Myosins (β -MHC) oder den Atrionatriuretischen Faktor (ANF)¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. Diese Reexpression 'fetalen Gene' findet auch während der kardialen Hypertrophie *in vivo* statt und wird als Marker für die hypertrophe Reaktion gewertet¹⁷⁹.

Mit Hilfe des Modells der Kardiomyozyten in Kultur konnten eine Anzahl von Faktoren wie Katecholamine, vasoaktive Peptide, Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone identifiziert werden, die als hypertrophe Stimulanzen auf die Kardiomyozyten wirken¹⁷⁷. Wie in der vorliegenden Studie demonstriert wurde, scheinen auch Oligodesoxynukleotide eine stimulative Wirkung auf das Größenwachstum der Kardiomyozyten auszuüben. Die Effekte der Antisense und Random S-ODN waren übereinstimmend bezüglich der Zunahme der Zellgröße und bezüglich der Toxizität beim Einsatz höherer Konzentrationen.

Es wurde im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine 1,5-2,0 fache Zunahme der Zellgröße bei Zellen festgestellt, die S-ODN ausgesetzt waren. Dies war sowohl bei

Antisense- als auch bei Random- S-ODN I-III der Fall. Dieser Effekt scheint also nicht unbedingt Sequenz-abhängig zu sein, da er bei sechs verschiedenen Oligodesoxynukleotiden auftrat. Vielmehr könnte dieses Phänomen darauf beruhen, daß es sich bei den S-ODN um negativ geladene Moleküle handelt, die sich wie Polyanionen verhalten, welche die Zellmorphologie verändern können ^{169,180,181}. Antisense S-ODN können außerdem, wenn sie in hoher Konzentration eingesetzt werden, sogenannte 'non-target mRNA', also mRNA, an die sie normalerweise nicht binden, spalten und weitere Nebeneffekte verursachen. Da verschiedene niedrigere Konzentrationen (0,5, 2,0, 5,0 µmol) von Antisense S-ODN die Translation von Titin nicht hemmen konnten, wurde die relativ hohe Konzentration von 10 µmol verwendet, die zu den beschriebenen Effekten führte. Es muß deshalb in Betracht gezogen werden, daß diese Konzentration und die polyanionische Natur für unspezifische Nebeneffekte wie die verstärkte Hypertrophie der ARC verantwortlich sein kann.

Eine andere Erklärung könnte die sequenzspezifische Bindung der S-ODN an zelluläre Proteine sein, die in Folge zu einer Beeinflussung des Zellverhaltens führen könnte ¹⁸². Da aber alle S-ODN den gleichen Effekt hervorrufen, ist diese Möglichkeit der Bindung eher unwahrscheinlich. Es könnte vielmehr sein, daß die Nukleoside und Nukleotide als Degradationsprodukte der S-ODN ¹⁸³ einen wachstumsstimulierenden Effekt auf die Kardiomyozyten ausüben. Da die S-ODN sowohl intra- als auch extrazellulär degradiert werden, könnten diese Abbauprodukte verantwortlich für den Nebeneffekt der Hypertrophie sein, vor allem da sie in sehr hoher Konzentration eingesetzt wurden.

5. Vergleichende Aspekte der mikroskopischen Technik

Verschiedene Mikroskope werden zur Beurteilung der Zellen eingesetzt. In der Vergangenheit waren es konventionelle Lichtmikroskope oder die auch heute noch vielfach verwendeten Scanning- bzw. Rasterelektronenmikroskope (REM). Nachteile dieser beiden Systeme sind sicher in der unzureichenden Auflösung der axialen Richtung des Objektivs zu suchen, die mangelhafte Bilder von Präparaten mit einer Dicke größer als 1 mm produziert. REM nimmt nur das Oberflächenbild der Zellen auf, da es mit sekundären Elektronen arbeitet, die nur 100 Angström unter der Oberfläche noch erfaßbar sind. Es entsteht durch die Abbildung der Punkte zwar ein dreidimensionales Bild, aber keine Abbildung des Zellinneren. Es kann demnach nur eine geringe Aussage über die interne Organisation des Zytoskeletts oder anderer Strukturen getroffen werden. Zusätzlich ist die Probenvorbereitung für das REM recht aufwendig, so daß das Präparat während

dieser Phase eventuell verändert werden kann. Diese Nachteile konnten jedoch mit Einführung des Konfokalen Laserscanning Mikroskops (CLSM) und der 3D-Rekonstruktion erzeugter Schichtbilder überwunden werden (siehe Erklärung des Prinzips in Kapitel III, 6.2). Das CLSM hat eine Auflösung von ca 250 nm nach lateral und 700 nm in axialer Richtung. Aufgrund der verbesserten axialen Resolution des CLSM ist man in der Lage, optische Schnitte durch das gesamte Präparat zu legen und somit zusätzlich zur Oberfläche auch interne Strukturen zu untersuchen. Verschiedene Proteine von ARC und 3D-Rekonstruktionen der Zellform konnten mit dieser Technik evaluiert werden¹³³. In der vorliegenden Arbeit war diese Methode von großem Vorteil zur Darstellung der Oligodesoxynukleotidaufnahme in die Kardiomyozyten. Es konnten deutlich die Fluoreszenzsignale der Fluorescein-markierten S-ODN innerhalb der Zellen demonstriert werden. Mit Hilfe des Computerprogrammes 'Imaris' ließ sich dies bildlich eindrucksvoll darstellen. Desweiteren lassen sich aufgrund der sehr guten Auflösung sehr nahe beieinanderliegende Strukturen durch Doppelmarkierungen mit verschiedenen Antikörpern unterscheiden. Die Möglichkeit, unterschiedliche Fluoreszenzmarkierungen miteinander zu kombinieren und im CLSM zu betrachten, ist im Vergleich zu REM ein wichtiger Vorteil. Zum Beispiel ermöglichte die Doppelfärbung von Aktin und Myosin in der vorliegenden Studie die Bestimmung der Myosinquerstreifungsfläche im Verhältnis zur Zellfläche.

6. Klinische Relevanz

Ein Protein, welches eine so bedeutende Rolle in der Sarkomerogenese und der passiven Spannung spielt, könnte bei bestimmten Erkrankungen mitbetroffen sein. Bisher sind keine Myopathien bekannt, die auf einem Fehlen von Titin beruhen. Diese Myopathien würden auch angesichts der Rolle, die Titin in der Myogenese einzunehmen scheint, letal enden²⁵. Allerdings wurde von einer Degradierung des Titins in unterschiedlicher Ausprägung bei verschiedenen Muskelerkrankungen berichtet.

Die Duchenne Muskeldystrophie (DMD) und die Becker Muskeldystrophie (BMD) zeichnen sich durch die abnorme Expression oder das vollständige Fehlen des Membranproteins Dystrophin aus. Im Verlauf der Krankheit sinkt jedoch auch die Titinmenge, und die Myofibrillen erscheinen in hohem Grade ungeordnet¹⁸⁴.

In der Tunesischen Duchenne-ähnlichen Muskeldystrophie ist im Gegensatz zu DMD und BMD Dystrophin unverändert, jedoch ist als Sekundärveränderung ebenfalls eine Degradierung und Disorganisation von Titin festzustellen¹⁸⁵.

Andere neuromuskuläre Erkrankungen wie die Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung, die amyotrophische Lateralsklerose und die myotonische Dystrophie weisen ebenfalls einen Verlust an Titin auf, der jedoch im Vergleich zu DMD schwächer ausgeprägt ist ^{25,186}.

In den frühen Stadien der Kongenitalen Muskeldystrophie vom Fukuyamatyp (FCMD), welche immer auch Defekte im ZNS aufweist, spielt die Degradierung von Titin eine wichtige Rolle ¹⁸⁶.

Auch an der Autoimmunkrankheit Myasthenia gravis (MG), die sich durch eine fortschreitende Muskelschwäche charakterisiert, ist Titin mitbeteiligt. Patienten mit dieser Krankheit und einer Thymushyperplasie (MGT) entwickeln in erster Linie Autoantikörper gegen den Acetylcholinrezeptor der motorischen Endplatte, aber auch gegen intrazelluläre Proteine quergestreifter Muskulatur, wobei Titin im Vordergrund steht (Antikörper gegen Epitop im I-Band-Titin: MIR - main immunogenic region) ^{187,188}. Desweiteren wurde von einer Titinmutation im Zusammenhang mit hypertropher Kardiomyopathie berichtet ¹⁸⁹.

Die Resultate, die in dieser Studie präsentiert werden, sind wichtig für die Interpretation der strukturellen Veränderungen, die in insuffizienten Herzen beobachtet wurden. Diese Herzen sind gekennzeichnet durch einen gleichzeitigen Verlust an Myofibrillen und Titinfilamenten ^{29-31,190}. Basierend auf diesen Untersuchungen wurde postuliert, daß Veränderungen des elastischen sarkomeren Proteins Titin eine wesentliche Rolle in der strukturellen und funktionalen Verschlechterung der Herzfunktion spielen, die letztendlich in Herzversagen resultieren ^{29,190}. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie befürworten diese Hypothese, da ein Fehlen des Titins eine gestörte Sarkomergenese hervorruft und die von diesen Veränderungen betroffenen Sarkomere nicht in der Lage sind, adäquat zu kontrahieren. Viele defekte Sarkomere resultieren in defekten Myozyten, was wiederum zu einer generellen kontraktile Insuffizienz des Organs führt.

7. Schlußfolgerung

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es durch den Einsatz von S-ODN möglich ist, physiologische Prozesse wie die Myofibrillogenese im Redifferenzierungsmodell adulter Kardiomyozyten der Ratte in Langzeitkultur zu untersuchen. Die Beeinflussung der Translation von Titin durch Antisense-Oligodesoxynukleotide resultiert in einer Störung der Myosinfilamenteingliederung in die Sarkomeren, sichtbar anhand der signifikant reduzierten Myosinquerstreifung und der

vorherrschenden diffusen Myosinmarkierung. Diese Ergebnisse liefern einen entscheidenden Hinweis für die Richtigkeit der Hypothese, daß Titin den Einbau der Myosinfilamente in die Sarkomeren koordiniert und folglich Voraussetzung für die Sarkomerogenese ist.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Rolle von Titin als "molekulare Matrize" in der Sarkomerogenese wird in der Literatur oft diskutiert. In der vorliegenden Studie, wurde die Hypothese untersucht, daß die Expression von Titin Voraussetzung für die Inkorporation der dicken Filamente in die Sarkomeren ist. Diese Untersuchung wurde mit Hilfe von Antisense-Oligodesoxynukleotiden, die die Translation von Titin beeinflussen, am Redifferenzierungsmodell adulter Kardiomyozyten der Ratte (ARC) in Langzeitkultur durchgeführt. (Eine detaillierte Auflistung der Ergebnisse ist im Kapitel IV, 3 auf den Seiten 67-68 angegeben.)

Vor der Durchführung der eigentlichen Antisense-Oligodesoxynukleotid-Experimente wurden das Wachstumsmuster und die Größe der Zelloberfläche der unterschiedlichen Phänotypen der ARC in Langzeitkultur bestimmt und standardisiert. Dies stellt die Grundlage für die Antisense-Oligodesoxynukleotid-Experimente dar, die mittels drei für Titin-mRNA-spezifischen Antisense Phosphorothioat Oligodesoxynukleotiden (Antisense S-ODN) in einer Konzentration von 10 µmol durchgeführt wurden.

In Vorversuchen mit Hilfe von Fluorescein-markierten S-ODN konnte die Aufnahme in die ARC im Konfokalen Lasermikroskop nachgewiesen werden. Desweiteren war sowohl bei Antisense als auch bei Random S-ODN eine signifikante Zunahme der Zellgröße im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen zu verzeichnen.

Die Antisense S-ODN-Behandlung verursachte am 12. und 16. Tag in Kultur eine deutlich reduzierte Expression von Titin und eine Störung der Myosininkorporation in die Sarkomeren. Diese Störung war überwiegend durch eine diffuse Myosinmarkierung und durch eine signifikante Abnahme der regelmäßigen Myosinquerstreifung im Verhältnis zur gesamten Zellfläche (Tag 12 und 16: Kontrolle 75%, Tag 12: S-ODN I und II 20%, Tag 16: S-ODN I und II 14%) gekennzeichnet. Die zelluläre Integrität, definiert durch das Vorhandensein des typischen α -Aktinin-Musters und der Streifefaser-artigen Strukturen, war nicht gestört.

Diese Ergebnisse liefern entscheidende Hinweise für die Richtigkeit der Hypothese, daß Titin eine Rolle als "molekulare Matrize" spielt, indem es die Inkorporation der Myosinfilamente in die Sarkomeren koordiniert. Die Anwesenheit von Titin ist somit eine Voraussetzung für die Sarkomerogenese.

VII. SUMMARY

An essential role of titin as a “molecular ruler” in sarcomerogenesis has been frequently discussed. In this study, we tested the hypothesis that the expression of titin is a prerequisite for thick filament incorporation into sarcomeres by utilizing an antisense oligodeoxynucleotide approach to interfere with titin translation in the redifferentiation model of adult rat cardiomyocytes (ARC) in long-term culture.

As a first step, the growth pattern ranging from rod shaped to round and later to spreading cells and the cell surface area of ARC were quantitatively evaluated and standardized. This represents the basis for experiments interfering with sarcomere formation using three different antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides (S-ODN) at a dosage of 10 μ M specific for titin mRNA.

The presence of fluorescein-labeled S-ODN in ARC indicated cellular uptake of antisense and random S-ODN, and both induced a significant increase in cell size as compared with untreated ARC serving as control.

At days 12 and 16 in culture, antisense S-ODN treatment resulted in reduced expression of titin and a disturbance of myosin incorporation into sarcomeres, which is evident by diffuse myosin labeling in the majority of cells and a significantly decreased area of regular myosin cross-striation (day 12 and 16: control 75%, day 12: S-ODN I and II 20%, day 16: S-ODN I and II 14%) as observed by laser scanning confocal microscopy. Cellular integrity indicated by the presence of α -actinin and F-actin was not disturbed.

These findings provide evidence for the role of titin as a molecular template for myosin incorporation and therefore titin is a prerequisite for sarcomerogenesis.

VIII. Abkürzungen

ARC	adulte Kardiomyozyten der Ratte
AS	Antisense
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Fn3	Fibronektin Typ III
g	Gramm
h	Stunden
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2'-Ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
Kon.	Kontrolle
Konz.	Konzentration
M	Molar (mol/l)
MDa	Megadalton
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
nm	Nanometer
ODN	Oligodesoxynukleotide, Oligonukleotide
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
RD	Random
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
SFLS	Streßfaser-artige Strukturen
S-ODN	Phosphorothioat-Oligodesoxynukleotide
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
U	Enzymaktivitätseinheit
µm	Mikrometer
3D	dreidimensional

IX. Literaturverzeichnis

1. Maruyama K, Murakami F, Ohashi K. Connectin, an elastic protein of muscle. *Comparative Biochemistry. Journal of Biochemistry*. 1977;82:339-45.
2. Wang K, McClure J, Tu A. Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76:3698-702.
3. Yates L, Greaser M. Quantitative determination of myosin and actin in rabbit skeletal muscle. *Journal of Molecular Biology*. 1983;168:123-141.
4. Maruyama K, Yoshioka T, Higuchi H, Ohashi K, Kimura S, Natori R. Connectin filaments link thick filaments and Z lines in frog skeletal muscle as revealed by immunoelectron microscopy. *Journal of Cell Biology*. 1985;101:2167-72.
5. Labeit S, Gautel M, Lakey A, Trinick J. Towards a molecular understanding of titin. *EMBO Journal*. 1992;11:1711-6.
6. Houmeida A, Holt J, Tskhovrebova L, Trinick J. Studies of the interaction between titin and myosin. *Journal of Cell Biology*. 1995;131:1471-81.
7. Labeit S, Kolmerer B. Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science*. 1995;270:293-6.
8. Obermann WM, Gautel M, Steiner F, van der Ven PF, Weber K, Fürst DO. The structure of the sarcomeric M-band: localization of defined domains of myomesin, M-protein, and the 250-kD carboxy-terminal region of titin by immunoelectron microscopy. *Journal of Cell Biology*. 1996;134:1441-53.
9. Trinick J, Tskhovrebova L. Titin: a molecular control freak. *Trends in Cell Biology*. 1999;9:377-80.

10. Wang K. Titin/connectin and nebulin: giant protein rulers of muscle structure and function. *Advances in Biophysics*. 1996;33:123-34.
11. Squire JM. Architecture and function in the muscle sarcomere. *Current Opinion in Structural Biology*. 1997;7:247-57.
12. Horowitz R. Passive force generation and titin isoforms in mammalian skeletal muscle. *Biophysical Journal*. 1992;61:392-8.
13. Linke WA, Stockmeier MR, Ivemeyer M, Hosser H, Mundel P. Characterizing titin's I-band Ig domain region as an entropic spring. *Journal of Cell Science*. 1998;111:1567-74.
14. Linke WA, Ivemeyer M, Mundel P, Stockmeier MR, Kolmerer B. Nature of PEVK-titin elasticity in skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95:8052-7.
15. Trinick J. Titin as a scaffold and spring. Cytoskeleton. *Current Biology*. 1996;6:258-60.
16. Helmes M, Trombitas K, Centner T, Kellermayer M, Labeit S, Linke WA, Granzier H. Mechanically driven contour-length adjustment in rat cardiac titin's unique N2B sequence: titin is an adjustable spring. *Circulation Research*. 1999;84:1339-52.
17. Bennett PM, Gautel M. Titin domain patterns correlate with the axial disposition of myosin at the end of the thick filament. *Journal of Molecular Biology*. 1996;259:896-903.
18. Tokuyasu KT, Maher PA. Immunocytochemical studies of cardiac myofibrillogenesis in early chick embryos. II. Generation of alpha-actinin dots within titin spots at the time of the first myofibril formation. *Journal of Cell Biology*. 1987;105:2795-801.

19. Tokuyasu KT, Maher PA. Immunocytochemical studies of cardiac myofibrillogenesis in early chick embryos. I. Presence of immunofluorescent titin spots in premyofibril stages. *Journal of Cell Biology*. 1987;105:2781-93.
20. Hill CS, Duran S, Lin ZX, Weber K, Holtzer H. Titin and myosin, but not desmin, are linked during myofibrillogenesis in postmitotic mononucleated myoblasts. *Journal of Cell Biology*. 1986;103:2185-96.
21. Wang SM, Greaser ML, Schultz E, Bulinski JC, Lin JJ, Lessard JL. Studies on cardiac myofibrillogenesis with antibodies to titin, actin, tropomyosin, and myosin. *Journal of Cell Biology*. 1988;107:1075-83.
22. Fürst DO, Osborn M, Weber K. Myogenesis in the mouse embryo: differential onset of expression of myogenic proteins and the involvement of titin in myofibril assembly. *Journal of Cell Biology*. 1989;109:517-27.
23. Isaacs WB, Kim IS, Struve A, Fulton AB. Biosynthesis of titin in cultured skeletal muscle cells. *Journal of Cell Biology*. 1989;109:2189-95.
24. Whiting A, Wardale J, Trinick J. Does titin regulate the length of muscle thick filaments? *Journal of Molecular Biology*. 1989;205:263-8.
25. Fulton AB, Isaacs WB. Titin, a huge, elastic sarcomeric protein with a probable role in morphogenesis. *Bioessays*. 1991;13:157-61.
26. Freiburg A, Gautel M. A molecular map of the interactions between titin and myosin-binding protein C. Implications for sarcomeric assembly in familial hypertrophic cardiomyopathy. *European Journal of Biochemistry*. 1996;235:317-23.
27. Gregorio CC, Granzier H, Sorimachi H, Labeit S. Muscle assembly: a titanic achievement? *Current Opinion in Cell Biology* 1999;11:18-25.

28. Ehler E, Rothen BM, Hammerle SP, Komiyama M, Perriard JC. Myofibrillogenesis in the developing chicken heart: assembly of Z-disk, M-line and the thick filaments. *Journal of Cell Science*. 1999;112:1529-39.
29. 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. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1994;26:1291-306.
30. Hein S, Schaper J. The cytoskeleton of cardiomyocytes is altered in the failing human heart. *Heart Failure*. 1996;12:128-132.
31. Morano I, Hadicke K, Grom S, Koch A, Schwinger RH, Bohm M, Bartel S, Erdmann E, Krause EG. Titin, myosin light chains and C-protein in the developing and failing human heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1994;26:361-8.
32. Person V, Kostin S, Suzuki K, Schaper J. Antisense experiments elucidate the essential role of titin in sarcomerogenesis. *Circulation*. 1999;100:1401(Abstr).
33. Mitcheson JS, Hancox JC, Levi AJ. Cultured adult cardiac myocytes: future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties. *Cardiovascular Research*. 1998;39:280-300.
34. Huxley AF, Niedergerke R. Structural changes in muscle during contraction. *Nature*. 1954;173:971-973.
35. Rayment I, R. RW, Schmidt-Bäse K, Smith R, Tomchick DR, Benning MW, Winkelmann DA, Wesenberg G, Holden HM. Three-dimensional structure of myosin-subfragment-1: a molecular motor. *Science*. 1993a;261:50-58.
36. Rayment I, Holden HM, Whittaker M, Yohn CB, Lorenz M, Holmes KC, Milligan RA. Structure of the acto-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science*. 1993b;261, 58-65:

37. Schauf C, Moffett D, Moffett S, Schubert E. Medizinische Physiologie: mit Repititorium. *de Gruyter Berlin-New York*. 1993;224, 242.
38. Stromer MH. The cytoskeleton in skeletal, cardiac and smooth muscle cells. *Histology and Histopathology*. 1998;13:283-91.
39. Kostin S, Heling A, Hein S, Scholz D, Klövekorn W-P, Schaper J. The protein composition of the normal and diseased cardiac myocyte. *Heart Failure*. 1998;2:245-260.
40. Small JV, Fürst DO, Thornell LE. The cytoskeletal lattice of muscle cells. *European Journal of Biochemistry*. 1992;208:559-72.
41. Trinick J. Titin and nebulin: protein rulers in muscle? *Trends in Biochemical Sciences*. 1994;19:405-9.
42. Trinick J. Interaction of titin/connectin with the thick filament. *Advances in Biophysics*. 1996;33:81-90.
43. Maruyama K. Connectin/titin, giant elastic protein of muscle. *FASEB Journal*. 1997;11:341-5.
44. Gautel M, Goulding D, Bullard B, Weber K, Fürst DO. The central Z-disk region of titin is assembled from a novel repeat in variable copy numbers. *Journal of Cell Science*. 1996;109:2747-54.
45. Sorimachi H, Freiburg A, Kolmerer B, Ishiura S, Stier G, Gregorio CC, Labeit D, Linke WA, Suzuki K, Labeit S. Tissue-specific expression and alpha-actinin binding properties of the Z-disc titin: implications for the nature of vertebrate Z-discs. *Journal of Molecular Biology*. 1997;270:688-95.
46. Sjöström M, Squire JM. Fine structure of the A-band in cryo-sections. The structure of the A-band of human skeletal muscle fibres from ultra-thin cryo-sections negatively stained. *Journal of Molecular Biology*. 1977;109:49-68.

47. Knappeis GG, Carlsen F. The ultrastructure of the M-line in skeletal muscle. *Journal of Cell Biology*. 1968;38:202-11.
48. Turner DC, Wallimann T, Eppenberger HM. A protein that binds specifically to the M-line of skeletal muscle is identified as the muscle form of creatine kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1973;70:702-5.
49. Wallimann T, Eppenberger HM. Localization and function of M-line-bound creatine kinase. M-band model and creatine phosphate shuttle. *Cell and Muscle Motility*. 1985;6:239-85.
50. Masaki T, Takaiti O. M-protein. *Journal of Biochemistry*. 1974;75:367-80.
51. Grove BK, Kurer V, Lehner C, Doetschman TC, Perriard JC, Eppenberger HM. A new 185,000-dalton skeletal muscle protein detected by monoclonal antibodies. *Journal of Cell Biology*. 1984;98:518-24.
52. Price MG. Skelemins: cytoskeletal proteins located at the periphery of M-discs in mammalian striated muscle. *Journal of Cell Biology*. 1987;104:1325-36.
53. Fürst DO, Osborn M, Nave R, Weber K. The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *Journal of Cell Biology*. 1988;106:1563-72.
54. Price MG. Striated muscle endosarcomeric and exosarcomeric lattices. *Advances in Structural Biology*. 1991;1:175-207.
55. Obermann WM, Gautel M, Weber K, Fürst DO. Molecular structure of the sarcomeric M band: mapping of titin and myosin binding domains in myomesin and the identification of a potential regulatory phosphorylation site in myomesin. *EMBO Journal*. 1997;16:211-20.

56. Auerbach D, Bantle S, Keller S, Hinderling V, Leu M, Ehler E, Perriard JC. Different domains of the M-band protein myomesin are involved in myosin binding and M-band targeting. *Molecular Biology of the Cell*. 1999;10:1297-308.
57. Vinkemeier U, Obermann W, Weber K, Fürst DO. The globular head domain of titin extends into the center of the sarcomeric M band. cDNA cloning, epitope mapping and immunoelectron microscopy of two titin-associated proteins. *Journal of Cell Science*. 1993;106:319-30.
58. Obermann WM, van der Ven PF, Steiner F, Weber K, Fürst DO. Mapping of a myosin-binding domain and a regulatory phosphorylation site in M-protein, a structural protein of the sarcomeric M band. *Molecular Biology of the Cell*. 1998;9:829-40.
59. Fürst DO, Obermann WM, van der Ven PF. Structure and assembly of the sarcomeric M band. *Reviews in Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. 1999;138:163-202.
60. Hanson J, Huxley HE. The structural basis of contraction in striated muscle. *Symposium of the Society of Experimental Biology*. 1956;9:228-264.
61. Sjöstrand F. The connections between A- and I-band filaments in striated frog muscle. *Journal of Ultrastructural Research*. 1962;7:225-246.
62. Nave R, Fürst DO, Weber K. Visualization of the polarity of isolated titin molecules: a single globular head on a long thin rod as the M band anchoring domain? *Journal of Cell Biology*. 1989;109:2177-87.
63. Labeit S, Barlow DP, Gautel M, Gibson T, Holt J, Hsieh CL, Francke U, Leonard K, Wardale J, Whiting A, et al. A regular pattern of two types of 100-residue motif in the sequence of titin. *Nature*. 1990;345:273-6.

64. Wang K. Purification of titin and nebulin. *Methods in Enzymology*. 1982;85:264-74.
65. Pan KM, Damodaran S, Greaser ML. Isolation and characterization of titin T1 from bovine cardiac muscle. *Biochemistry*. 1994;33:8255-61.
66. Granzier HL, Wang K. Gel electrophoresis of giant proteins: solubilization and silver-staining of titin and nebulin from single muscle fiber segments. *Electrophoresis*. 1993;14:56-64.
67. Eilertsen KJ, Keller TC, 3rd. Identification and characterization of two huge protein components of the brush border cytoskeleton: evidence for a cellular isoform of titin. *Journal of Cell Biology*. 1992;119:549-57.
68. Eilertsen KJ, Kazmierski ST, Keller TC, 3rd. Cellular titin localization in stress fibers and interaction with myosin II filaments in vitro. *Journal of Cell Biology*. 1994;126:1201-10.
69. Higgins DG, Labeit S, Gautel M, Gibson TJ. The evolution of titin and related giant muscle proteins. *Journal of Molecular Evolution*. 1994;38:395-404.
70. Machado C, Sunkel CE, Andrew DJ. Human autoantibodies reveal titin as a chromosomal protein. *Journal of Cell Biology*. 1998;141:321-33.
71. Wang SM, Greaser ML. Immunocytochemical studies using a monoclonal antibody to bovine cardiac titin on intact and extracted myofibrils. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 1985;6:293-312.
72. Ohtsuka H, Yajima H, Maruyama K, Kimura S. The N-terminal Z repeat 5 of connectin/titin binds to the C-terminal region of alpha-actinin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997;235:1-3.
73. Linke WA, Ivemeyer M, Labeit S, Hinssen H, Ruegg JC, Gautel M. Actin-titin interaction in cardiac myofibrils: probing a physiological role. *Biophysical Journal*. 1997;73:905-19.

74. Fürst DO, Nave R, Osborn M, Weber K. Repetitive titin epitopes with a 42 nm spacing coincide in relative position with known A band striations also identified by major myosin-associated proteins. An immunoelectron-microscopical study on myofibrils. *Journal of Cell Science*. 1989;94:119-25.
75. Labeit S, Kolmerer B, Linke WA. The giant protein titin. Emerging roles in physiology and pathophysiology. *Circulation Research*. 1997;80:290-4.
76. Politou AS, Gautel M, Improta S, Vangelista L, Pastore A. The elastic I-band region of titin is assembled in a "modular" fashion by weakly interacting Ig-like domains. *Journal of Molecular Biology*. 1996;255:604-16.
77. Horowitz R, Podolsky RJ. The positional stability of thick filaments in activated skeletal muscle depends on sarcomere length: evidence for the role of titin filaments. *Journal of Cell Biology*. 1987;105:2217-23.
78. Horowitz R, Podolsky RJ. Thick filament movement and isometric tension in activated skeletal muscle. *Biophysical Journal*. 1988;54:165-71.
79. Granzier HL, Irving TC. Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments. *Biophysical Journal*. 1995;68:1027-44.
80. Cazorla O, Freiburg A, Helmes M, Centner T, McNabb M, Wu Y, Trombitas K, Labeit S, Granzier H. Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circulation Research*. 2000;7:59-67.
81. Tskhovrebova L, Trinick J, Sleep JA, Simmons RM. Elasticity and unfolding of single molecules of the giant muscle protein titin. *Nature*. 1997;387:308-12.
82. Tskhovrebova L, Trinick J. Direct visualization of extensibility in isolated titin molecules. *Journal of Molecular Biology*. 1997;265:100-6.
83. Keller TCS. Molecular bungees. *Nature*. 1997;387:233-235.

84. Granzier H, Kellermayer M, Helmes M, Trombitas K. Titin elasticity and mechanism of passive force development in rat cardiac myocytes probed by thin-filament extraction. *Biophysical Journal*. 1997;73:2043-53.
85. Trombitas K, Greaser M, Labeit S, Jin JP, Kellermayer M, Helmes M, Granzier H. Titin extensibility in situ: entropic elasticity of permanently folded and permanently unfolded molecular segments. *Journal of Cell Biology*. 1998;140:853-9.
86. Gautel M, Goulding D. A molecular map of titin/connectin elasticity reveals two different mechanisms acting in series. *FEBS Letters*. 1996;385:11-4.
87. Linke WA, Ivemeyer M, Olivieri N, Kolmerer B, Ruegg JC, Labeit S. Towards a molecular understanding of the elasticity of titin. *Journal of Molecular Biology*. 1996;261:62-71.
88. Rief M, Gautel M, Oesterhelt F, Fernandez JM, Gaub HE. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science*. 1997;276:1109-12.
89. Lu H, Isralewitz B, Krammer A, Vogel V, Schulten K. Unfolding of titin immunoglobulin domains by steered molecular dynamics simulation. *Biophysical Journal*. 1998;75:662-71.
90. Blanchard A, Ohanian V, Critchley D. The structure and function of alpha-actinin. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*. 1989;10:280-9.
91. Endo T, Masaki T. Differential expression and distribution of chicken skeletal- and smooth-muscle-type alpha-actinins during myogenesis in culture. *Journal of Cell Biology*. 1984;99:2322-32.
92. Imamura M, Endo T, Kuroda M, Tanaka T, Masaki T. Substructure and higher structure of chicken smooth muscle alpha-actinin molecule. *Journal of Biological Chemistry*. 1988;263:7800-5.

93. Hammonds RG, Jr. Protein sequence of DMD gene is related to actin-binding domain of alpha-actinin. *Cell*. 1987;51:1.
94. BurrIDGE K, Feramisco JR. Non-muscle alpha actinins are calcium-sensitive actin-binding proteins. *Nature*. 1981;294:565-7.
95. Young P, Ferguson C, Banuelos S, Gautel M. Molecular structure of the sarcomeric Z-disk: two types of titin interactions lead to an asymmetrical sorting of alpha-actinin. *EMBO Journal*. 1998;17:1614-24.
96. Sanger JM, Mittal B, Pochapin MB, Sanger JW. Myofibrillogenesis in living cells microinjected with fluorescently labeled alpha-actinin. *Journal of Cell Biology*. 1986;102:2053-66.
97. Schultheiss T, Lin ZX, Lu MH, Murray J, Fischman DA, Weber K, Masaki T, Imamura M, Holtzer H. Differential distribution of subsets of myofibrillar proteins in cardiac nonstriated and striated myofibrils. *Journal of Cell Biology*. 1990;110:1159-72.
98. Lin Z, Lu MH, Schultheiss T, Choi J, Holtzer S, DiLullo C, Fischman DA, Holtzer H. Sequential appearance of muscle-specific proteins in myoblasts as a function of time after cell division: evidence for a conserved myoblast differentiation program in skeletal muscle. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 1994;29:1-19.
99. Rhee D, Sanger JM, Sanger JW. The premyofibril: evidence for its role in myofibrillogenesis. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 1994;28:1-24.
100. Eppenberger HM, Perriard JC, Rosenberg UB, Strehler EE. The Mr 165,000 M-protein myomesin: a specific protein of cross-striated muscle cells. *Journal of Cell Biology*. 1981;89:185-93.

101. Fürst DO, Gautel M. The anatomy of a molecular giant: how the sarcomere cytoskeleton is assembled from immunoglobulin superfamily molecules. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1995;27:951-9.
102. Schafer DA, Hug C, Cooper JA. Inhibition of CapZ during myofibrillogenesis alters assembly of actin filaments. *Journal of Cell Biology*. 1995;128:61-70.
103. Vanderkerckhoven J, Bugaisky G, Buckingham M. Simultaneous expression of skeletal muscle and heart actin proteins in various striated muscle tissues and cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1986;261:1838-1834.
104. Warrick HM, Spudich JA. Myosin structure and function in cell motility. *Annual Review of Cell Biology*. 1987;3:379-421.
105. Schwartz K, Lecarpentier Y, Martin JL, Lompre AM, Mercadier JJ, Swynghedauw B. Myosin isoenzymic distribution correlates with speed of myocardial contraction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1981;13:1071-5.
106. Wikman-Coffelt J, Sievers R, Parmley WW. Influence of myocardial isomyosins on cardiac performance and oxygen consumption. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1985;130:1314-23.
107. Lyons GE. Vertebrate heart development. *Current Opinion in Genetics and Development*. 1996;6:454-60.
108. Legato MJ. Ultrastructural characteristics of the rat ventricular cell grown in tissue culture, with special reference to sarcomerogenesis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1972;4:299-317.
109. Markwald RR. Distribution and relationship of precursor Z material to organizing myofibrillar bundles in embryonic rat and hamster ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1973;5:341-50.

110. Dlugosz AA, Antin PB, Nachmias VT, Holtzer H. The relationship between stress fiber-like structures and nascent myofibrils in cultured cardiac myocytes. *Journal of Cell Biology*. 1984;99:2268-78.
111. Handel SE, Greaser ML, Schultz E, Wang SM, Bulinski JC, Lin JJ, Lessard JL. Chicken cardiac myofibrillogenesis studied with antibodies specific for titin and the muscle and nonmuscle isoforms of actin and tropomyosin. *Cell and Tissue Research*. 1991;263:419-30.
112. Komiyama M, Kouchi K, Maruyama K, Shimada Y. Dynamics of actin and assembly of connectin (titin) during myofibrillogenesis in embryonic chick cardiac muscle cells in vitro. *Developmental Dynamics*. 1993;196:291-9.
113. LoRusso SM, Rhee D, Sanger JM, Sanger JW. Premyofibrils in spreading adult cardiomyocytes in tissue culture: evidence for reexpression of the embryonic program for myofibrillogenesis in adult cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 1997;37:183-98.
114. Turnacioglu KK, Mittal B, Dabiri GA, Sanger JM, Sanger JW. An N-terminal fragment of titin coupled to green fluorescent protein localizes to the Z-bands in living muscle cells: overexpression leads to myofibril disassembly. *Molecular Biology of the Cell*. 1997;8:705-17.
115. Piper HM, Volz H, Schwarz P. Cell culture techniques in heart and vessel research. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. 1990;36-60.
116. Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. Anatomie der Haustiere - Lehrbuch für Studium und Praxis. *Ferdinand Enke Verlag Stuttgart*. 1997;248.
117. Schlingensiepen R, Brysch W, Schlingensiepen K-H. Antisense - From Technology to Therapy. *Blackwell Science Verlag*. 1997;6.

118. Freiburg A, Trombitas K, Hell W, Cazorla O, Fougerousse F, Centner T, B. K, Witt C, Beckmann JS, Gregorio CC, Granzier H, Labeit S. Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circulation Research*. 2000;86:1114-1121.
119. Jin JP. Cloned rat cardiac titin class I and class II motifs. Expression, purification, characterization, and interaction with F-actin. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270:6908-16.
120. Lichtman JW. Konfokale Mikroskopie. *Spektrum der Wissenschaft*. 1994;10:78-84.
121. Stein CA. How to design an antisense oligodeoxynucleotide experiment: a consensus approach. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*. 1998;8:129-32.
122. Shiraishi I, Simpson DG, Carver W, Price R, Hirozane T, Terracio L, Borg TK. Vinculin is an essential component for normal myofibrillar arrangement in fetal mouse cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1997;29:2041-52.
123. Adams JW, Henderson SA. Prostaglandin F₂α-induced growth of neonatal rat cardiomyocytes in culture inhibited by antisense Egr-1 oligodeoxynucleotides. *Cardiovascular Pathobiology*. 1998;2:167-180.
124. Ojala J, Choudhury M, Bag J. Uncoordinated inhibition of gene expression for muscle proteins by a troponin T antisense oligodeoxynucleotide. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*. 1998;8:237-47.
125. Takahashi K, Azuma M, Huschenbett J, Michaelis ML, Azuma J. Effects of antisense oligonucleotides to the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger on calcium dynamics in cultured cardiac myocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999;260:117-21.

126. Powell T, Twist VW. A rapid technique for the isolation and purification of adult cardiac muscle cells having respiratory control and a tolerance to calcium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1976;72:327-33.
127. Jacobson SL. Culture of spontaneously contracting myocardial cells from adult rats. *Cell Structure and Function*. 1977;2:1-9.
128. Jacobson SL, Piper HM. Cell cultures of adult cardiomyocytes as models of the myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1986;18:661-78.
129. Nag AC, Cheng M, Fischman DA, Zak R. Long-term cell culture of adult mammalian cardiac myocytes: electron microscopic and immunofluorescent analyses of myofibrillar structure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1983;15:301-17.
130. Eppenberger ME, Hauser I, Baechi T, Schaub MC, Brunner UT, Dechesne CA, Eppenberger HM. Immunocytochemical analysis of the regeneration of myofibrils in long-term cultures of adult cardiomyocytes of the rat. *Developmental Biology*. 1988;130:1-15.
131. Eppenberger M, Hauser I, Eppenberger HM. Myofibril formation in longterm-cultures of adult rat heart cells. *Biomedica et Biochimica Acta*. 1987;46:S640-5.
132. Guo JX, Jacobson SL, Brown DL. Rearrangement of tubulin, actin, and myosin in cultured ventricular cardiomyocytes of the adult rat. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 1986;6:291-304.
133. Messerli JM, Eppenberger-Eberhardt ME, Rutishauser BM, Schwarb P, von Arx P, Koch-Schneidemann S, Eppenberger HM, Perriard JC. Remodelling of cardiomyocyte cytoarchitecture visualized by three-dimensional (3D) confocal microscopy. *Histochemistry*. 1993;100:193-202.

134. Nag AC, Lee ML, Sarkar FH. Remodelling of adult cardiac muscle cells in culture: dynamic process of disorganization and reorganization of myofibrils. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 1996;17:313-34.
135. Koch-Schneidemann S, Gehr P, Rutishauser B, Eppenberger HM. Attachment of adult rat cardiomyocytes (ARC) on laminin and two laminin fragments. *Journal of Structural Biology*. 1994;113:107-16.
136. Claycomb WC, Lanson N, Jr. Isolation and culture of the terminally differentiated adult mammalian ventricular cardiac muscle cell. *In Vitro*. 1984;20:647-51.
137. Bugaisky LB, Zak R. Differentiation of adult rat cardiac myocytes in cell culture. *Circulation Research*. 1989;64:493-500.
138. Kostin S, Hein S, Bauer EP, Schaper J. Spatiotemporal development and distribution of intercellular junctions in adult rat cardiomyocytes in culture. *Circulation Research*. 1999;85:154-67.
139. Clark WA, Decker ML, Behnke-Barclay M, Janes DM, Decker RS. Cell contact as an independent factor modulating cardiac myocyte hypertrophy and survival in long-term primary culture. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1998;30:139-55.
140. Pollinger IS. Growth and DNA synthesis in embryonic chick heart cells, in vivo and in vitro. *Experimental Cell Research*. 1973;76:253-62.
141. Nag AC, Crandell TF, Cheng M. Competence of embryonic mammalian heart cells in culture: DNA synthesis, mitosis and differentiation. *Cytobios*. 1981;30:189-208.
142. Simpson P, McGrath A, Savion S. Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. *Circulation Research*. 1982;51:787-801.

143. Imanaka-Yoshida K, Sanger JM, Sanger JW. Contractile protein dynamics of myofibrils in paired adult rat cardiomyocytes. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 1993;26:301-12.
144. Claycomb WC, Palazzo MC. Culture of the terminally differentiated adult cardiac muscle cell: a light and scanning electron microscope study. *Developmental Biology*. 1980;80:466-82.
145. Peng HB, Wolosewick JJ, Cheng PC. The development of myofibrils in cultured muscle cells: a whole-mount and thin-section electron microscopic study. *Developmental Biology*. 1981;88:121-36.
146. Hiruma T, Hirakow R. An ultrastructural topographical study on myofibrillogenesis in the heart of the chick embryo during pulsation onset period. *Anatomy and Embryology*. 1985;172:325-9.
147. Antin PB, Forry-Schaudies S, Friedman TM, Tapscott SJ, Holtzer H. Taxol induces postmitotic myoblasts to assemble interdigitating microtubule-myosin arrays that exclude actin filaments. *Journal of Cell Biology*. 1981;90:300-8.
148. Isaacs WB, Kim IS, Struve A, Fulton AB. Association of titin and myosin heavy chain in developing skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89:7496-500.
149. van der Ven PF, Schaart G, Croes HJ, Jap PH, Ginsel LA, Ramaekers FC. Titin aggregates associated with intermediate filaments align along stress fiber-like structures during human skeletal muscle cell differentiation. *Journal of Cell Science*. 1993;106:749-59.
150. van der Ven PF, Obermann WM, Weber K, Fürst DO. Myomesin, M-protein and the structure of the sarcomeric M-band. *Advances in Biophysics*. 1996;33:91-9.

151. Nag AC, Lee ML. Breakdown and rebuilding of myofibrils in cultured adult cardiac muscle cells. *Tsitologiia*. 1997;39:907-12.
152. Calogero A, Hospers GA, Mulder NH. Synthetic oligonucleotides: useful molecules? A review. *Pharmacological World and Science*. 1997;19:264-8.
153. Akhtar S. Antisense technology: selection and delivery of optimally acting antisense oligonucleotides. *Journal of Drug Targeting*. 1998;5:225-34.
154. Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1978;75:280-4.
155. Jansen M, de Moor CH, Sussenbach JS, van den Brande JL. Translational control of gene expression. *Pediatric Research*. 1995;37:681-6.
156. Scanlon KJ, Ohta Y, Ishida H, Kijima H, Ohkawa T, Kaminski A, Tsai J, Horng G, Kashani-Sabet M. Oligonucleotide-mediated modulation of mammalian gene expression. *FASEB Journal*. 1995;9:1288-96.
157. Bennett CF. Antisense oligonucleotides: is the glass half full or half empty? *Biochemical Pharmacology*. 1998;55:9-19.
158. Pierga JY, Magdelenat H. Applications of antisense oligonucleotides in oncology. *Cellular and Molecular Biology*. 1994;40:237-61.
159. Hélin V, Gottikh M, Mishal Z, Subra F, Malvy C, Lavignon M. Cell cycle-dependent distribution and specific inhibitory effect of vectorized antisense oligonucleotides in cell culture. *Biochemical Pharmacology*. 1999;58:95-107.
160. Stein CA, Cheng YC. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents - is the bullet really magical? *Science*. 1993;261:1004-12.
161. Akhtar S, Juliano RL. Cellular uptake and intracellular fate of antisense oligonucleotides. *Trends in Cell Biology*. 1992;2:139-144.

162. Loke SL, Stein CA, Zhang XH, Mori K, Nakanishi M, Subasinghe C, Cohen JS, Neckers LM. Characterization of oligonucleotide transport into living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86:3474-8.
163. Eckstein F, Krieg AM, Stein CA, Agrawal S, Beaucage S, Cook PD, Crooke S, Gait MJ, Gewirtz A, Helene C, Miller P, Narayanan R, Nicolin A, Nielsen P, Ohtsuka E, Seliger H, Stec W, Tidd D, Wagner R, Zon J. On the quality control of antisense oligonucleotides. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*. 1996;6:149.
164. Shaw JP, Kent K, Bird J, Fishback J, Froehler B. Modified deoxyoligonucleotides stable to exonuclease degradation in serum. *Nucleic Acid Research*. 1991;19:747-50.
165. Morales AV, de Pablo F. Inhibition of gene expression by antisense oligonucleotides in chick embryos in vitro and in vivo. *Current Topics in Developmental Biology*. 1998;36:37-49.
166. Boutorine AS, Kostina EV. Reversible covalent attachment of cholesterol to oligodeoxyribonucleotides for studies of the mechanism of their penetration into eucaryotic cells. *Biochimie*. 1993;75:35-41.
167. Krieg AM, Tonkinson J, Matson S, Zhao Q, Saxon M, Zhang LM, Bhanja U, Yakubov L, Stein CA. Modification of antisense phosphodiester oligodeoxynucleotides by a 5' cholesteryl moiety increases cellular association and improves efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90:1048-52.
168. Bennett CF, Chiang MY, Chan H, Shomaker JE, Mirabelli CK. Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Molecular Pharmacology*. 1992;41:1023-1033.

169. Kashihara N, Maeshima Y, Makino H. Antisense oligonucleotides. *Experimental Nephrology*. 1998;6:84-8.
170. Fulton AB. The elastic filament system in myogenesis. *Reviews in Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. 1999;138:139-61.
171. van der Loop FT, van Eys GJ, Schaart G, Ramaekers FC. Titin expression as an early indication of heart and skeletal muscle differentiation in vitro. Developmental re-organisation in relation to cytoskeletal constituents. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 1996;17:23-36.
172. Holtzer H, Hijikata T, Lin ZX, Zhang ZQ, Holtzer S, Protasi F, Franzini-Armstrong C, Sweeney HL. Independent assembly of 1.6 microns long bipolar MHC filaments and I-Z-I bodies. *Cell Structure and Function*. 1997;22:83-93.
173. van der Ven PF, Bartsch JW, Gautel M, Jockusch H, Fürst DO. A functional knock-out of titin results in defective myofibril assembly. *Journal of Cell Science*. 2000;113:1405-1414.
174. Ayoob JC, Turnacioglu KK, Mittal B, Sanger JM, Sanger JW. Targeting of cardiac muscle titin fragments to the Z-bands and dense bodies of living muscle and non-muscle cells. *Cell Motility and Cytoskeleton*. 2000;45:67-82.
175. van der Loop FT, van der Ven PF, Fürst DO, Gautel M, van Eys GJ, Ramaekers FC. Integration of titin into the sarcomeres of cultured differentiating human skeletal muscle cells. *European Journal of Cell Biology*. 1996;69:301-7.
176. Eppenberger-Eberhardt M, Flamme I, Kurer V, Eppenberger HM. Reexpression of alpha-smooth muscle actin isoform in cultured adult rat cardiomyocytes. *Developmental Biology*. 1990;139:269-78.

177. Schaub MC, Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM. Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. *Journal of Molecular Medicine*. 1997;75:901-20.
178. Harder BA, Hefti MA, Eppenberger HM, Schaub MC. Differential protein localization in sarcomeric and nonsarcomeric contractile structures of cultured cardiomyocytes. *Journal of Structural Biology*. 1998;122:162-75.
179. Borisov AB. Myofibrillogenesis and reversible disassembly of myofibrils as adaptive reactions of cardiac muscle cells. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*. 1991;599:71-80.
180. Agrawal S. Antisense oligonucleotides: towards clinical trials. *Trends in Biotechnology*. 1996;14:376-87.
181. Ho PT, Parkinson DR. Antisense oligonucleotides as therapeutics for malignant diseases. *Seminars in Oncology*. 1997;24:187-202.
182. Stein CA. Phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides: questions of specificity. *Trends in Biotechnology*. 1996;14:147-9.
183. Wagner RW. Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature*. 1994;372:333-5.
184. Matsumura K, Shimizu T, Nonaka I, Mannen T. Immunochemical study of connectin (titin) in neuromuscular diseases using a monoclonal antibody: connectin is degraded extensively in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Neurological Sciences*. 1989;93:147-56.
185. Hamida CB, Soussi-Yanicostas N, Bejaoui K, Butler-Browne GS, Hentati F, Ben Hamida M. Expression of myosin isoforms and of desmin, vimentin and titin in Tunisian Duchenne-like autosomal recessive muscular dystrophy. *Journal of Neurological Sciences*. 1994;123:114-21.

186. Matsumara K, Shimizu T, Sunada Y, Mannen T, Nonaka I, Kimura S, Maruyama K. Degradation of connectin (titin) in Fukuyama type congenital dystrophy: immunocytochemical study with monoclonal antibodies. *Journal of Neurological Sciences*. 1990;98:155-162.
187. Gautel M, Lakey A, Barlow DP, Holmes Z, Scales S, Leonard K, Labeit S, Mygland A, Gilhus NE, Aarli JA. Titin antibodies in myasthenia gravis - identification of a major immunogenic region of titin. *Neurology*. 1993;43:1581-1585.
188. Lubke E, Freiburg A, Skeie GO, Kolmerer B, Labeit S, Aarli JA, Gilhus NE, Wollmann R, Wussling M, Ruegg JC, Linke WA. Striational autoantibodies in myasthenia gravis patients recognize I-band titin epitopes. *Journal of Neuroimmunology*. 1998;81:98-108.
189. Satoh M, Takahashi M, Sakamoto T, Hiroe M, Marumo F, Kimura A. Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999;262:411-7.
190. Hein S, Schaper J. Pathogenesis of dilated cardiomyopathy and heart failure: insights from cell morphology and biology. *Current Opinion in Cardiology*. 1996;11:293-301.

X. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, ganz herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt:

- Frau Professor Dr. Dr. h.c. Jutta Schaper für die Überlassung des interessanten Themas und ihre sehr herzliche und intensive Betreuung im Verlauf der Erstellung dieser Dissertation. Desweiteren bedanke ich mich für die optimalen Arbeitsbedingungen in ihrer Arbeitsgruppe,
- Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Schaper für die Erlaubnis zur Teilnahme an diversen Kongressen und Weiterbildungen, die mich in meiner Arbeit sehr motiviert haben,
- der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. für die gewährte finanzielle Unterstützung während dieser Zeit,
- Frau Professor Dr. Ilse Käufer-Weiss für die kritische Durchsicht des Manuskripts und die Betreuung dieser Dissertation von Seiten des veterinärmedizinischen Fachbereichs der Justus-Liebig-Universität Gießen,
- Herrn Prof. Dr. Siegfried Labeit und seinen Mitarbeitern vom EMBL in Heidelberg für die freundliche und erfolgreiche Zusammenarbeit. Insbesondere bedanke ich mich für den polyklonalen Titinantikörper und die Isolierung des cDNA-Fragmentes. Herrn Dr. Christian Witt bin ich für seine geduldigen Erklärungen der molekularbiologischen Techniken sehr dankbar,
- Herrn Prof. Dr. Hans M. Eppenberger von der ETH Zürich/Schweiz und Herrn Prof. Dr. Dieter O. Fürst von der Universität Potsdam für die freundliche Bereitstellung der monoklonalen Antikörper Myomesin und Titin 42,
- Herrn Gunther Schuster und Herrn Gerhard Stämmler für ihren großen Einsatz bei der Lösung computertechnischer Probleme,
- meinen Kollegen Herrn Dr. Sawa Kostin und Herrn Dr. Keisuke Suzuki, die mir tatkräftig und aufmunternd bei diesem Projekt zur Seite standen,
- Frau Beate Grohmann für die Einführung in die immunzytochemischen Arbeitstechniken und ihre fortwährende freundschaftliche Unterstützung, Frau Brigitte Matzke für die Einführung in die Konfokale Mikroskopie, Frau Marion Wiesnet für die Hilfe bei zellulären Arbeiten, Frau Gaby Klein für das sorgfältige Korrekturlesen des Manuskripts, Herrn Dr. Bernd Winkler und Frau Dipl.-Chem. Brigitte Mohsin für die Hilfe bei bioinformatischen Fragestellungen, Frau Annemarie Möbs für ihre Mühe bei photographischen Arbeiten und Herrn Helmut Kreuzer für die schnelle Abwicklung der Literaturrecherchen,
- den Mitarbeitern innerhalb unserer Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre,
- meinem Freund Herrn Dr. Bernhard Hauser für seine moralische und liebevolle Unterstützung und meinen Eltern, die mir diesen Weg ermöglicht haben.