

Aus dem Center for Cardiovascular Research
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Rolle von Calcineurin B bei menschlicher Herzhypertrophie

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Ulrike Gemke

aus Bad Driburg

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. V. Regitz-Zagrosek
2. Prof. Dr. T. Eschenhagen
3. Prof. Dr. B. Pieske

Datum der Promotion: 10.02.2006

Meinen Eltern und Emma

Danksagung

Frau Prof. Dr. Regitz-Zagrosek und Frau Dr. Doller gilt mein besonderer Dank für die Betreuung und die tatkräftige Unterstützung bei dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. Meyer und seinen Mitarbeitern in der Pathologie des DHZB danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Fibrosemessungen und der Bereitstellung der histologischen Präparate. Frau Britta Hannack sei Dank für die Anleitung der Laborarbeiten. Meinem Freund Mathieu danke ich für seine Geduld und seine moralische Unterstützung. Herzlichen Dank meinen Eltern, die mir die Promotion ermöglicht haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
2	Material und Methoden	11
2.1	Patientengut und Biopsieentnahme	11
2.2	Strategie des Arbeitsablaufes	12
2.3	Probenaufbereitung für PCR	13
2.3.1	RNA-Extraktion	13
2.3.2	DNase Verdau	14
2.3.3	Reverse Transkription	14
2.4	Primerkonstruktion	14
2.5	Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	15
2.6	Probenaufarbeitung für Western Blot	16
2.6.1	Proteinextraktion	16
2.6.2	Proteinmessung	16
2.7	Western Blot	17
2.7.1	Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese der Probenproteine	17
2.7.2	Comassiefärbung	17
2.7.3	Calcineurin B AK	18
2.7.4	Western Blot Verfahren	18
2.7.5	Anfärbung der Proteine als Kontrollreaktion	19
2.7.6	Nachweisreaktion Hybridisierung der AK	19
2.7.7	Visualisierung der Nachweisreaktion	19
2.7.8	Detektion	20
2.8	Quantitative Bestimmung des Anteils an interstitiellem Gewebe (Fibrose, Narben) im Myokard	20
2.9	Validierung der Methoden	22
2.9.1	RNA-Ausbeute vor und nach Dnase-Verdau	22
2.9.2	Etablierung quantitativer PCR	22
2.9.2.1	Optimale Spezifität durch Hot-Start-Technik	22
2.9.2.2	Optimale Primerkonstruktion	22
2.9.2.3	Primeroptimierung für Real-Time-PCR	23

2.9.2.4	Validierung der optimalen PCR Zykluslänge	23
2.9.3	Validierung der Quantifizierung anhand einer Eichgeraden	24
2.9.3.1	Erstellen einer Eichgerade	24
2.9.3.2	Auswertung mit Hilfe der Standardgeradengleichung	25
2.9.3.3	Kalibrator und externe Standardisierung	26
2.9.4	Proteinausbeute	27
2.9.5	Etablierung quantitatives Western Blot-Verfahren	27
2.9.5.1	Proteineinsatz und Proteinqualität	27
2.9.5.2	Optimale Trennbedingungen bei SDS-PAGE	28
2.9.5.3	Optimale Transferbedingungen des Western Blot	28
2.9.5.4	AK-Optimierung	29
2.9.5.5	Versuchskonsistenz und externe Standardisierung	29
2.9.6	Etablierung der quantitativen Fibrosemessung	30
2.10	Darstellung der Ergebnisse und Statistik	31
2.10.1	Darstellung der Ergebnisse	31
2.10.2	Statistik	31
3	Ergebnisse	33
3.1	Untersuchung der krankheitsspezifischen Genregulation	33
3.1.1	Regulation von CnB, ANP und BNP mRNA in hypertrophierten Herzen mit DCM, AS und KHK	33
3.1.2	Korrelation von ANP, BNP und CnB mRNA in hypertrophierten Herzen	36
3.2	Untersuchung des krankheitsspezifischen CnB Proteingehalts	40
3.2.1	CnB Proteingehalt in hypertrophierten Herzen mit AS, DCM und KHK	40
3.3	Beziehungen zwischen CnB mRNA- und Proteingehalt	42
3.4	Krankheitsspezifischer Fibrosegehalt	43
3.4.1	Charakterisierung der Kontrollgruppe	43
3.4.2	Fibrosegehalt bei DCM	44
3.4.3	Fibrosegehalt bei KHK	44
3.5	Beziehung zwischen Fibrosegehalt und Gen-bzw. Proteinregulation	45
4	Diskussion	47
4.1	Wichtigste Ergebnisse	47

4.2	Regulationsmechanismen der CnR-Aktivität in hypertrophierten Herzen	47
4.3	CnB spezifische Genexpressionsregulation und Proteingehalt in hypertrophierten Herzen mit DCM	52
4.4	CnB spezifische Genexpressionsregulation und Proteingehalt in hypertrophierten Herzen mit ICM nach koronarer Herzerkrankung	54
4.5	CnB spezifische Genexpressionsregulation und Proteingehalt in hypertrophierten Herzen mit AS	54
4.6	Remodeling-Hypertrophie und veränderte extrazelluläre Matrix	55
4.7	Fibrosegehalt der Kontroll-und Patientengruppen	56
4.8	Limitationen der experimentellen Arbeit und kritische Beurteilung der Methodik	57
4.9	Zusammenfassung	59
5	Anhang	61
5.1	Verzeichnis der Abkürzungen, Namen und Erklärungen	61
5.2	Materialien	64
6	Literatur	66

1 Einleitung

Herzinsuffizienz mit konsekutivem Herzversagen ist ein zentrales kardiovaskuläres Problem der heutigen Bevölkerung. In Deutschland ist etwa 1% der Bevölkerung betroffen. Unter den 70-jährigen steigt der Anteil der Betroffenen auf etwa 10% an. Zu den häufigsten Ursachen zählen unter anderem die Koronare Herzerkrankung (KHK), Hypertension und Myopathien wie z.B. die Dilatative Kardiomyopathie (DCM).

Herzinsuffizienz zeichnet sich aus durch das Unvermögen, eine ausreichende Menge Blut für die metabolischen und zirkulatorischen Anforderungen der Gewebe zu fördern. Pathogenetisch kann die Herzinsuffizienz durch Veränderungen der Vor-, (z.B. Regurgitationen nach Herzklappeninsuffizienz) und Nachlast (z.B. arterielle Hypertonie, Aortenstenose), Einschränkungen des kontraktiven Apparates (z.B. bei angeborenen oder erworbenen Kardiomyopathien, Ischämie nach KHK) oder Herzrhythmusstörungen hervorgerufen werden. Unabhängig von der Ursache kommt es bei der Herzinsuffizienz zu charakteristischen Adaptationsmechanismen. Epidemiologische Studien belegen, dass diese primär kompensatorischen Mechanismen, die unter dem Begriff des Remodeling zusammengefasst werden, prädestinierend zu Gefügedilatation mit konsekutiver Herzdekomensation und Herzversagen führen^{1 2 3}. Hierbei spielt insbesondere die Herzhypertrophie eine große Rolle. Mikroskopisch beobachtet man myozytär eine ausgeprägte Hypertrophie und vermehrte Apoptose, während die extrazelluläre Matrix (EZM) in dieser Phase durch vermehrten Kollagenabbau, Kollagenshift und reparativer sowie reaktiver Fibrosierung gekennzeichnet ist⁴. Noch unklar sind die Details der hypertrophieinduzierenden, intrazellulären Signalwege auf molekularer Ebene. Es kommt zu einer Aktivierung neurohumoraler Faktoren (sympathisches Nervensystem (NS), Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem (RAAS),^{5 6} Endothelin^{17 8}, Transforming growth factor (TGF- β)^{9 10}, Insulin like growth factor¹¹), die hypertrophievermittelnd auf das Myokard einwirken, indem sie zu Veränderungen der Calciumhomöostase führen und eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen beeinflussen. Über spezifische Zell-Oberflächenrezeptoren (Integrine) werden die Signale aus dem Extrazellulärraum an das intrazelluläre Cytosklett vermittelt.¹² Hier werden durch Konformitätsänderung und Aktivierung sarkoplasmatischer Proteine (z.B. Phospholipase C (PLC) oder Proteinkinase C (PKC)) Signalkaskaden in Gang gesetzt, die zumeist über G-Proteine gekoppelt zu einer Aktivierung von Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) oder

Janus assoziierten Kinasen (JAKs) führen. Diese verändern über Transkriptionsfaktoren die kardiale Genexpression. Initial kommt es zur Induktion der „Immediate-early-genes“ (Proto-onkogene wie z.B. c-fos, c-jun, Hitzeschockproteinen wie z.B. hsp 70 etc.), darauffolgend zu einer Umstellung der Expression von adulten zu fetalen Isoformen bestimmter Proteine, zu einer Reexpression bestimmter rein fetaler Proteine (z.B. des Atrial natriuretischen Peptids (ANP))¹² und zu einer Herabregulation vereinzelter Gene (z.B. der Sarkoplasmatischen Ca⁺⁺-Adenosintriphosphatase (SERKA)^{13 14}).

Eine entscheidende Rolle scheint außerdem Calcineurin (CnR) zu spielen¹⁵. Das Enzym ist ein Heterodimer aus der katalytischen Untereinheit CnA mit 61 kDa und der regulatorischen calciumsensiblen Untereinheit CnB mit 19 kDa. Es handelt sich um eine cytoplasmatische Calcium-Calmodulin abhängige Serin/Threonin-Phosphatase, die physiologisch ubiquitär in einer Vielzahl von Geweben vorkommt. Vorangegangene Studien befassen sich vor allem mit ihrer Funktion in immunkompetenten Zellen (T-/B-Lymphozyten)¹⁶, in Myozyten, Skelettmuskelzellen^{17 18}, Fibroblasten und Neuronen. In T-Zellen wird von einer Funktion in der immunologischen T-Zellaktivierung berichtet. In Skelettmuskelzellen ist es auf molekularer Ebene beteiligt, wenn durch tonische Motoneuronenaktivität selektiv die Genexpression charakteristischer Proteine phänotypisch langsamer Haltemuskulatur amplifiziert wird. Kardial dephosphoryliert CnR den Transkriptionsfaktor „Nuclear factor of activated T cells“ (NFAT_{c3})¹⁹, der in Folge in den Zellkern diffundieren kann²⁰ und synergistisch mit dem Transkriptionsfaktor GATA₄ die Genexpression beeinflusst^{21 22}. Verschiedene Studien belegen die Hypothese, dass CnR ein wichtiges Glied der molekularen Signaltransduktionkette bei Hypertrophie ist. In Tierexperimenten mit einer dominant inaktiven Calcineurinmutante wurde eine abgeschwächte Hypertrophie in Folge pathophysiologischer Stimulation nachgewiesen²³. Transgene Mäuse, in denen mit Hilfe eines Promotors eine Überexpression der aktiven Calcineurinform generiert wurde, zeigten eine vermehrte Ausbildung von Hypertrophie und eine signifikante Zunahme des Herzgewichtes²⁴. Shimoyama et al.²⁵ und Lim et al.²⁶ berichteten von einer Heraufregulation der CnR-Expression und Zunahme der CnR-Aktivität im Rahmen einer druckbelastungsinduzierten Hypertrophie. Taigen et al.²⁷ untersuchten in vitro kultivierte, neonatale Rattenmyozyten. Nach Stimulation mit hypertrophen Agonisten wie Angiotensin II oder Phenylephrin wurde ein erhöhter mRNA-Gehalt von CnA_β sowie eine verstärkte Enzymaktivität gemessen. Goldspink et al.²⁸ konnten diese Resultate in vivo an Rattenmodellen wiederholen.

Hierzu sind in der Literatur jedoch auch kontroverse Ergebnisse zu finden. Zhang et al.²⁹ und

Meguro et al.³⁰ fanden in Mausmodellen keine Veränderung der CnR-Aktivität in Folge Hypertrophieinduktion mittels aortalem Banding, in einer vergleichbaren Studie von Ding et al.³¹ war die CnR-Aktivität signifikant verminderte.

Die beschriebenen Effekte auf CnR konnten z.T. mit den Immunsuppressiva Cyclosporin A und Tacrolimus (FK 506) unterdrückt werden, die in vielen Studien als experimentelle Calcineurininhibitoren dienen³⁰.

Da CnA allein aber nur eine sehr geringe spezifische Aktivität besitzt und seine Aktivierung über die regulatorischen Untereinheit vermittelt³² wird, stellt CnB eine wichtige Schlüsselstelle zur Regulation der CnR abhängigen Signalkaskade dar. CnB wird, örtlich getrennt und unabhängig von der CnA-Expression, von einem Single-Copy-Gen auf Chromosom 2 p15-16 kodiert³³. Bisher publizierte Befunde gehen von einer Fusionssequenz von Chromosom 20 und 2 aus und beinhalten gravierende Artefakte³⁴. In einer unpublizierten Arbeit (A.Neuhausen Dissertation) aus der AG Regitz-Zagrosek wurde erneut an der Aufklärung der Genstruktur gearbeitet. Das CnB Gen ist über 50 kBp groß und beinhaltet 6 Exons und 5 Introns.

Bisher sind zwei Splicevarianten von CnB beschrieben worden, neben der ubiquitär vorkommenden Isoform (s.o.) eine weitere Splicevariante, die ausschließlich im Testisgewebe exprimiert wird und offensichtlich eine Funktion bei der Ausdifferenzierung der Zellen hat^{35 36 37}. CnB ist ein evolutionär hoch konserviertes^{38 39} Protein aus der Gruppe der Zinkfinger-Bindungsproteine (EF-hand proteins)^{40 41}. Zu Calmodulin (CaM) besteht eine Sequenzhomologie von 35%⁴². CaM bindet, wie CnB, an die CnA-Untereinheit und ist ein wichtiges Glied des Aktivierungsvorgangs. Sie haben jedoch unterschiedliche Bindungsstellen und sind nicht austauschbar⁴³. Im Vergleich dazu beträgt die Sequenzhomologie zu dem ebenfalls vier Calciumbindungsstellen besitzenden Troponin immerhin noch 29%⁴².

Posttranslational unterliegt CnB einer Modifikation, bei der das Anfangs-Methionin abgespalten und durch eine Fettsäureveresterung an die nachfolgende Aminosäure ersetzt wird. Die Funktion dieser Fettsäuren ist noch ungeklärt. Es konnte gezeigt werden, dass sie keinen Einfluss auf die Aktivität des Enzymes haben und eventuell zur Thermostabilität beitragen⁴⁴.

Die regulatorische Funktion von CnB wird über seine vier Calciumbindungsstellen vermittelt. An den N-terminalen Bindungsstellen führt es, durch reversible Calciumbindung, zu einer gesteigerten Calmodulinaffinität. Dadurch kommt es zu einer vermehrten Calmodulinbindung, die zu einer gesteigerten Aktivität führt. Bisher publizierte Untersuchungen zur hypertrophievermittelnden Funktion von CnR beziehen sich vorwiegend auf die katalytischen Untereinheit CnA. Es wird vermutet, dass ein erhöhter Anteil an CnA Gehalt für die in

Hypertrophiemodellen gesteigerte CnR Aktivität verantwortlich ist.

In anderen Studien wurde der Frage nachgegangen, ob ein Zusammenhang zwischen CnR-Aktivität und dem Anteil an interstitieller Fibrose im Herzmuskelgewebe besteht. Nagata K., Somura F. et al. ⁴⁵ fanden in Rattenmodellen mit Hypertension nach hämodynamischer Überbelastung Hinweise auf eine Korrelation zwischen kardialer Fibroseinduktion und CnR-Aktivität. Konkret hat man in dieser und ähnlichen Studien untersucht, inwiefern die Blockade des RAAS durch einen AT₁-Rezeptor-Antagonist die kardiale Hypertrophie und Fibrosierung in Folge salzinduzierter Hypertension vermindert und ob die CnR-Aktivität beeinflusst wird ⁴⁶. Die Ergebnisse zeigten einen Zusammenhang zwischen AT₁-Block und erniedrigter CnR-Aktivität bzw. mRNA-Gehalt von CnA_β, einhergehend mit einer Reduktion sowohl der myokardialen Hypertrophie als auch der Fibrosierung ohne antihypertensiven Effekt.

Es wurde bisher nicht geprüft, ob Hypertrophie und interstitielle Fibrosierung in insuffizienten Herzen von dem CnB-Gehalt modifiziert werden.

Da die regulierte CnR-Aktivität nicht vollständig durch die Veränderungen der CnA-Expression erklärt werden kann ⁴⁷ und in Anbetracht der calciumsensiblen Regulation der Phosphataseaktivität von CnR wurde unsere Aufmerksamkeit auf CnB gelenkt. Mit seinen Calciumbindungsstellen ist es eine wichtige Transduktionsstelle zwischen Enzymaktivität und Herzhypertrophie ⁴⁸.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Rolle von CnB in der Pathogenese von Herzhypertrophie und interstitieller Fibrosierung. Dazu wurde die krankheitsspezifische Regulation von CnB in hypertrophierten Herzen verschiedener Pathogenesen gemessen und der interstitielle Fibrosegehalt dieser Herzen bestimmt.

In linksventrikulären Myokardbiopsien von Patienten mit AS bzw. aus explantierten Herzen mit DCM und KHK wurde der mRNA- und Proteingehalt von CnB bestimmt und mit der Expression der Hypertrophiemarker ANP und BNP korreliert. Zum Vergleich wurden die Untersuchungen parallel in einer Kontrollgruppe gesunder Spenderherzen durchgeführt.

Die Herzen, von denen histologische Präparate zur Verfügung standen, wurden zusätzlich hinsichtlich ihres Fibrosegehalts untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein, auf Farbsegmentierung beruhendes, Messsystem für die Größe der von uns untersuchten Präparatflächen validiert.

Parallel wurde in der Arbeitsgruppe ein Projekt zu Calcineurin A durchgeführt, indem der mRNA- und Proteingehalt der verschiedenen Splicevarianten, ebenfalls im Vergleich zu den Hypertrophiemarkern ANP und BNP, Ziel der Untersuchungen war.

2 Material und Methoden

2.1 Patientengut und Biopsieentnahme

Um die myokardiale Genexpression zu untersuchen, wurden insgesamt 51 humane Herzen biopsiert. Die Gewebeproben stammten aus explantierten Empfängerherzen bei orthotopen Herztransplantationen und entsprachen Endstadien koronarer Herzerkrankungen (n = 7) oder dilatativer Kardiomyopathie (n = 27). Die dritte Gruppe waren intraoperativ entnommene Biopsate bei hochgradigen Aortenstenosen (n = 14). Als Kontrollgruppe dienten Biopsate aus abgelehnten Spenderherzen von Multiorganentnahmen (n = 15). Diese Herzen wurden in allen Fällen aus nicht-kardialen, zumeist logistischen Gründen abgelehnt, hatten keine bekannten kardialen Vorerkrankungen und eine normale Ejektionsfraktion. Laut Befundung durch die Herzpathologie des DHZB war ihre Morphologie nicht pathologisch verändert (§. 3.4.1). Die Gewinnung und Aufarbeitung der Proben erfolgte standardisiert.

Für die Studie existierte ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Charité, Campus Virchow-Klinikum. Die teilnehmenden Patienten wurden vor der Probenentnahme mündlich und schriftlich aufgeklärt und um eine schriftliches Einverständnis gebeten. Untersucht wurden Biopsien der Vorderwand des linken Ventrikels. Die untersuchten Herzen waren wie folgt charakterisiert:

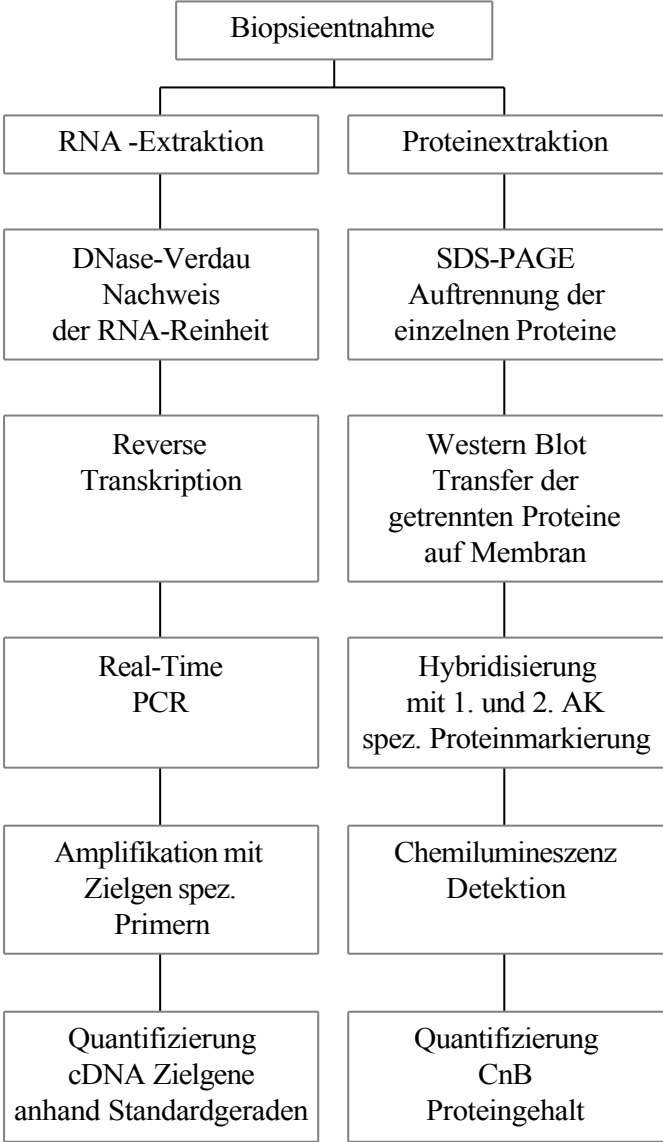
Tab. 1: Tabelle mit klinischen und hämodynamischen Daten der Patienten

Gruppe	Sex		Alte r	LVEF	RVEF	LVESD	LVEDD
	f	m		[%]	[%]	[mm]	[mm]
Kontrollen [n=15]	3	12	45	normal	normal	n.d.	n.d.
AS [n=14]	7	7	67	43 ±24	47 ±16	40 ±17	52 ±18
DCM [n=27]	1	26	45	17 ±7	35 ±12	66 ±11	74 ±11
KHK [n=7]		7	56	21 ±3,5	46 ±13	58 ±14	69 ±14

Patienten- und Kontrollherzen mit Alter, Geschlecht, hämodynamischen Daten als MW der jeweiligen Gruppe

Nach Entnahme gelangten die Biopsate des LV unmittelbar auf Trockeneis und wurden anschließend kontinuierlich bei -78°C gelagert.

2.2 Strategie des Arbeitsablaufes



2.3 Probenaufbereitung für PCR

2.3.1 RNA-Extraktion

Alle Arbeiten mit RNA-Material wie Aufarbeitung, RNA-Messung, RT-Reaktion erfolgten in strikter räumlicher Trennung zu den Laboren der PCR-Amplifizierung und DNA-Experimenten. Um Verunreinigungen und Abbau der RNA durch ubiquitär vorkommende RNAsen zu vermeiden, wurden nur Gerätschaften und Hilfsmittel (Eppendorfgefäße, Pipetten, Pistillen, etc.) verwendet, die zuvor mit 0,1%-iger DEPC-Lösung behandelt und anschließend 30 Min. bei 1 atü und 121°C autoklaviert worden waren. Zu Beginn der RNA Aufarbeitung wurden 10-40 mg Stücke von der Myokardprobe entnommen und auf einer Präzisionswaage abgewogen. Zur Homogenisation mit einer geschliffenen, der Größe des Eppendorfgefäßes angepassten Metallpistille, wurden 160 µl RNAzol auf die Probe gegeben. Der Homogenisator wurde bei einer Geschwindigkeit von 500 U/min angetrieben. Noch an der Pistille befindliches Restgewebe wurde mit RNAzol abgespült, so dass insgesamt 1 ml RNAzol/Probe benutzt wurden. Die Suspension wurde nun vollständig zu Ende homogenisiert mit kurzen Abkühlphasen auf Eis, um einer RNA-Degradation durch Überhitzung vorzubeugen. Anschließend wurde das Homogenat durchmischt, wiederholt gekühlt und zur vollständigen Extraktion für 20 Min. im Kühlraum auf einem Schüttler inkubiert.

In der folgenden Chloroformextraktion wurden alle Ansätze mit 200 µl Chloroform versetzt, für 2 Min. geschüttelt und anschließend für 10 Min. bei 14000 rpm und 4°C in einer Kühlzentrifuge (Eppendorf, Deutschland) abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und, 1:1 mit Isopropanol versetzt, durchmischt. Nach einer Tiefkühlphase von 12 h bei -80 °C wurde die Lösung für 30 Min. bei 14000 rpm und 4°C abzentrifugiert und ihr wässriger Überstand dekantiert.

Zweimal in Folge wurde die nun als Pellet vorliegende RNA mit 80%igem Ethanol gewaschen, abzentrifugiert und luftgetrocknet. Das reine RNA-Pellet wurde mit 40 µl bzw. einer der Größe entsprechenden Menge DEPC-Wasser gelöst und für weitere 12h bei -80°C gelagert.

Am folgenden Tag wurde der DNase Verdau durchgeführt, um ggf. mitextrahierte DNA zu eliminieren. Vorher und nachher wurde die RNA-Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda=260\text{nm}$ in einer Verdünnung 1:20 mit H₂O bestimmt.

2.3.2 DNase Verdau

Der DNase-Verdau-Reaktionsansatz beinhaltete 35 µl der RNA Probe, 2,94 µl DNase (10U/µl), 8,75 µl MnCl₂ (8mM), 1 µl RNAsin (40 U/µl) und wurde mit DEPC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 60 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 10 Min. bei 37°C inkubiert und die DNase Reaktion durch Zusatz von RNAzol gestoppt.

Durch erneute Chloroformextraktion und einen Ethanolwaschvorgang (Vorgehen s. oben) wurde die RNA isoliert und mit DEPC H₂O resuspendiert. Es folgte die 2. photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung, aus deren Ergebnissen die Ausbeute der RNA-Extraktion in µgRNA/mg FG berechnet wurden.

2.3.3 Reverse Transkription

Damit in der PCR-Reaktion die Polymerase enzymatisch aktiv werden konnte, war es notwendig, die RNA mit Hilfe der Reversen Transkriptionsreaktion (RT) in die Form der copy DNA umzuschreiben. Hierzu wurden 4µl der isolierten RNA (125ng/µl) mit 6 µl DEPC-H₂O verdünnt, mit 2 µl Random-Hexamer-Primern (300 ng /µl) versetzt und für 10 Min. bei 70°C inkubiert. Im Anschluss wurde jeder Ansatz gekühlt und mit 1µl Superscript (200 U/µl) und 9 µl Mastermix versetzt, gemischt, anzentrifugiert und für 10 Min. bei Raumtemperatur sowie für 50 Min. bei 42°C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde anschließend eine Hitzedenaturierung bei 95°C durchgeführt.

Mastermixkomponenten bei RT-Reaktion:

- 4 µl Puffer (100 mMol Tris HCl, 250 mmol KCl, 12,5 mmol MgCl₂, 0,5 µg/ml BSA; ph = 8,4)
- 2µl DTT (0,1 M)
- 1 µl RNAsin (40 U/µl)
- 1 µl dNTP Mix (10 mmol)

2.4 Primerkonstruktion

Um bei der PCR das Zielgen amplifizieren zu können, wurden im Vorfeld entsprechende Primer designt. Mit dem Blast-Computerprogramm wurde getestet, ob sie ausschließlich zu der ausgewählten Zielsequenz komplementär sind (*s.Tab.2*).

Tab. 2: Primersequenzen, Amplifikatlängen, Accessionnummer der Gene

Gen	Accession Nr.	Fwd Primer Seq.	Rev Primer Seq.	Amplikon Länge
CnB	XM 018382	AGAAATTGAGGTTTGCTTTCCG	TCCCACCATCTTTTTG TGGATAT	236 bp
BNP	NM 002521	ACGTCCGGGTTACAGGAGC	ACCATTTTGCGGTGCCC	164 bp
GAPDH	NM 002064	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTTC	226 bp
ANP	K 02043	CAGTGAGCCGAATGAAGA	GCTCCAATCCTGTCCATC	231 bp

Es werden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer (Accession-Nummer und Sequenzen der Forward) und die von ihnen in der PCR erzeugten Amplifikatlängen dargestellt.

2.5 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) wurde als Real-Time-PCR mit Hot-Start Technik durchgeführt. Ein 25µl-PCR Ansatz enthielt 1,25 ng Template, 5 pmol Forward-/Revers-Primermix und 12,5 µl SYBR-Green Mastermix (10x SYBR Puffer, Amp-Erase (1U/µl), Ampli Taq Gold (5U/µl), dNTPMix (2,5mMdATP, 2,5mM dCTP, 2,5mM dGTP, 2,5mM dUTG und MgCl₂ (25mM), mit H₂O auf 25 µl aufgefüllt. Das Fluoreszenzsignal wurde vom Real-Time-PCR Gerät Gene-Amp5700 in jedem Zyklus während des Annealingschrittes gemessen. Durch diese Online-Messung konnte der PCR-Verlauf verfolgt und analysiert werden.

Das zu Grunde liegende Thermoprofil betrug:

- zu Beginn Hot-Start: 10`/95°C
- Denaturierungsschritt: 45``/95°C
- Annealingsschritt: 60``/60C? (GAPDH, CnB, ANP, BNP)

Extensionsschritt: 45``/72C

Alle Gene wurden 40 Zyklen amplifiziert.

Aus einem Pool der Proben wurde eine Verdünnungsreihe von 25ng - 0,17 ng zu jedem Zielgen vermessen. Daraus wurde die Standardkurve zur Quantifizierung erstellt.

Kontrollreaktionen:

In jeder PCR wurde eine Negativkontrolle in Form einer H₂O Probe mitgeführt, um Kontamination der Chemikalien mit DNA auszuschließen. Diese zeigten keine nullwertdifferenten Extinktionen. Alle Proben wurden in Doppelansatz gemessen.

2.6 Probenaufarbeitung für Western Blot

2.6.1 Proteinextraktion

Von den schockgefrorenen Proben wurden Probenstücke von ca. 60-80 mg entnommen, in einem Verhältnis von 1:5 mit Lysispuffer (s.u.) versetzt und in einem Fast-prep Gerät (FastPrep FP 120 Bio 101 Thermo Savant) homogenisiert. Die Homogenate wurden durchmischt und für 20 Min. auf Eis abgestellt, um die Proteinextraktion zu optimieren. Anschließend wurde für 10 Min. bei 14000 rpm abzentrifugiert und der Überstand mit den Proteinen in ein neues Eppi überführt. Für die Proteinmessung wurden 20 µl entnommen, der restliche Überstand wurde bei -80°C eingefroren. Der Lysispuffer setzte sich aus Protein-Extraktionsdetergenz (100 ml-Ansatz aus 10 mM Tris pH 7,5, 140 mM NaCl, 1mM EDTA, 25% Glycerol, 0,5% SDS und 0,5% Nonident p-4c) und Proteaseinhibitoren-Cocktail (1 ml-Ansatz aus 5 mM DTT, 0,5 mM PMFS, 100 ng Aprotinin, 100 ng Leupeptin und 100 ng Pepstatin) in einem Verhältnis von 1:4 zusammen.

2.6.2 Proteinmessung

Die Proteinmessung erfolgte auf einer Flachbodenplatte im ELISA Platten Reader (Anthos Labtec-HAT 2). Jede Probe wurde in vier verschiedenen Verdünnungsstufen, je als Doppelansatz, gemessen. Pro Ansatz wurden zu der Probe 300 µl Farbstofflösung des BCA-Kits beigegeben und die Platte unter Lichtabschluss für 30 Min. bei 37 °C inkubiert, anschließend wurde im Wellenlängenbereich von 550 nm gemessen. Anhand einer Standard-Albumin-Verdünnungsreihe wurde die Proteinkonzentration errechnet.

Kontrollreaktionen ELISA Platten Reader Proteinmessung

Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mit H₂O, zur Ermittlung der Eigenextinktion, die von allen Messwerten subtrahiert werden muss, ein Ansatz mit Lysispuffer, mitgeführt.

2.7 Western Blot

2.7.1 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese der Probenproteine

Die Gelkomponenten waren:

Sammelgel 5%

- 1,3 ml 30% Acrylamid
- 1,0 ml 1,0M TRIS ph 6,8
- 5,5 ml Millipor H₂O
- 80 µl 10%SDS
- 80µl 10% APS
- 8 µl TEMED

Trenngel 12,5%

- 4,0 ml 30% Acrylamid
- 2,5 ml 1,5M TRIS ph 8,8
- 3,3 ml Millipor H₂O
- 100µl 10%SDS
- 100µl 10% APS
- 4 µl TEMED

Die Gele wurden für 30 Min. bei Raumtemperatur, anschließend für 12 h bei 4°C polymerisiert. Zum Beladen des Gels wurden die Proteine mit Rotiload Ladepuffer versetzt (25% des Gesamtvolumens) und für 5 Min. bei 95°C hitzedenaturiert. Nach kurzer Abkühlung bei Raumtemperatur wurden 13,3 µl der auf 3 µg/µl konzentrierten Proben aufgetragen. Die Kammer wurde für 30 Min. an einen Powersupplie-Stromkreis bei einer Spannung von 80 Volt angeschlossen. In dieser Zeit durchliefen die Proteine das Sammelgel. Sie traten in das Trenngel über, in dem sie anschließend bei 100 Volt für 1,5 h der Größe nach aufgetrennt wurden.

2.7.2 Comassiefärbung

Zum Anfertigen des Comassiegel wurden 6,6µl des auf 3 µg/µl konzentrierten Gesamtproteins

einer jeden untersuchten Probe mit einer SDS PAGE (*s.o.*) aufgetrennt und mit Comassieblue angefärbt.

Vorgehen:

Nach Auftrennung der Proteine mittels PAGE wurden die Gele für 12 h bei 4°C in Comassieblue angefärbt. Danach wurden sie in Waschvorgängen von 3x 15 Min. in einer 1:1 Methanol:H₂O Verdünnung plus 10% Eisessig entfärbt. Die Trocknung erfolgte in dafür vorgesehenen Rahmenvorrichtungen in Ersatzzellophan. Die angefärbten Proteinbanden der getrockneten Gele wurden eingescannt und die optische Dichte (OD) der Actinbande gemessen (*s.u.* Detektion).

2.7.3 Calcineurin B AK

Der monoklonale Anti-Calcineurin B Antikörper ist ein aus Mausserum gewonnenes Immunglobulin der Klasse M. Er bindet spezifisch ein Epitop auf der Calcineurin B Untereinheit von Mensch, Rind und Ratte und zeigt keine Kreuzreaktion mit Calcineurin A. Der 2.AK ist ein Anti-Maus-AK, der an ein Oberflächenepitop des 1.AK bindet. Er wird aus Kaninchenserum isoliert und ist mit Meerrettichperoxidase (HRP-Enzym) gekoppelt.

2.7.4 Western Blot Verfahren

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden nun auf eine Membran überführt und dort einer CnB spezifischen Nachweisreaktion unterzogen. Es wurde ein Nass-Blottverfahren mit einem Maxi-Wet-Tank (Biorad) durchgeführt. Als Blottingmembran wurde Nitrocellulose als proteinbindendes Material genutzt. Die Komponenten des Transferpuffers waren:

- Glycin 193,7 mM
- TRIS-Base 25 mM, pH=8,3
- H₂O 800 ml
- Methanol 20%

Die für den Blotting-sandwich genutzten Filterkartonpapiere, Nitrocellulosemembranen und Schwammpads wurden mit Transferpuffer getränkt, die Gele ca.15 Min. in Transferpuffer äquilibriert. Für den Transfer wurde für eine Dauer von 1,5h eine Stromdichte von 300-400 A (entsprechend 0,2-0,5 mA*cm²) angelegt bei einer Spannung von 50-60 V. Die Kühlung erfolgte mit einer Durchflusskühlanlage.

2.7.5 Anfärbung der Proteine als Kontrollreaktion

Die Bloteffizienz wurde mit Hilfe der Ponceaurotfärbung überprüft. Die Membran wurde 1 Min. in Ponceaurot (1:10 Verdünnung) geschwänkt und anschließend 2x 5 Min. mit dest. H₂O gewaschen. Die Proteinbanden wurden rot angefärbt sichtbar, so dass die Membran zugeschnitten und die Markerbanden beschriftet werden konnten.

2.7.6 Nachweisreaktion Hybridisierung der AK

Die Membran wurde für 1 h bei Raumtemperatur unter langsamen Schwenken in 5%iger Milchpulverlösung geblockt. Es folgte ein Waschschrift 1x 5 Min., 2x 15 Min. mit TBS-T Puffer in einer Zusammensetzung aus:

- 20 mM TRIS-Base
- 137 mM NaCl
- 19 ml 1M HCl
- 0,1% Tween

in 5000 ml H₂O gelöst, pH = 7,6.

Die Inkubation mit dem 1.AK wurde für 4 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Waschschriften von 1x 5 Min., 2x 15 Min. mit TBS-T Puffer folgte die Inkubation mit dem 2.AK für 1 h bei Raumtemperatur. Im Anschluss wiederholten sich die Waschschriften. Um ein gleichmäßiges Benetzen der Oberfläche zu gewährleisten, erfolgten die Hybridisierungsvorgänge unter ständigem Schütteln der Membran. Die AK-Verdünnungen wurden in TBS-T Puffer (s.o.) hergestellt. Der 1.AK in einer Verdünnung von 1:2000, der 2.AK in einer Verdünnung von 1:300000.

2.7.7 Visualisierung der Nachweisreaktion

Die auf Parafilm gebetteten Membranen wurden für 3 Min. gleichmäßig mit femto LUCENT™ HRP-Substratlösung benetzt. Die randständig überschüssige Lösung wurde anschließend vorsichtig entfernt und die Membran in Klarsichtfolie luftblasenfrei eingepackt.

2.7.8 Detektion

Die Membran wurde, mit der Proteinseite zum Film hin, in eine Filmkassette gelegt. Die Exposition des Films erfolgte je nach Bedarf für 10 Sek. bis zu 15 Min. Nach Entwicklung und Belichtung des Filmes wurde er mit EPSON-Scann eingescannt und die optische Dichte (OD) der Bandenstärke mit Hilfe des Alpha-Ease Messprogramms gemessen.

Das Scannen von expositionierten Röntgenfilmen bietet einen linearen Messbereich von ca. 20 bis 50 Graustufen. Um das Signal zu normalisieren, wurde es auf den Actin-OD Wert der gescannten Comassiegele kalibriert.

2.8 Quantitative Bestimmung des Anteils an interstitiellem Gewebe (Fibrose, Narben) im Myokard

Für die Untersuchung standen histologische Präparate der VW des LV von insgesamt 25 an DCM und 6 an KHK erkrankten Herzen zur Verfügung. Das Material der intraoperativ entnommen Biopsien der an AS erkrankten Herzen war sehr gering, so dass keine histologischen Präparate angefertigt wurden. Als Kontrollgruppe dienten die histologischen Präparate der Vorderwand des Myokards des linken Herzventrikels von 8 abgelehnten Spenderherzen (*s. Tab. 3*). Es handelte sich um dieselben Herzen, aus denen die für PCR und Western Blots entnommenen Proben stammten. Die Erfassung der Fibrose orientierte sich an dem mittels Grauwertsegmentierung markierten Anteil an interstitiellem Gewebe im Myokard in nach Domagk gefärbten histologischen Schnitten von 3 μm . Dabei wurden die interessierenden Strukturen mittels Farbsegmentierung detektiert und entsprechende Parameter wie Fibrosefläche in μm^2 und prozentualer Anteil der fibrosierten Fläche an der Gesamtfläche des eingestellten Präparateausschnitts berechnet. Die Messeinrichtung bestand aus einem Lichtmikroskop (Zeiss, Axioskop) mit angeschlossener Kamera (Sony) und Bildverarbeitungssystem (Zeiss, KS 400). Zur eigentlichen Messung wurde ein von Dipl. Ingenieur T. Bez (Zeiss) und Prof. R. Meyer (DHZB) entwickeltes Softwarepaket BG 7 verwendet, welches auf der Basis des Bildverarbeitungssystem KS 400 entwickelt wurde. Nach Validierung des Verfahrens wurde wie folgt vorgegangen.

Das gesamte Präparat wurde in 4 gleichgroße Flächen eingeteilt und in jedem dieser Areale wurden 12 Messungen durchgeführt. Bei einer 100-fachen Gesamtvergrößerung wurde eine Fläche von 14,7 mm^2 vermessen. Um die erzielten Daten dieser 48 Einzelmessungen (prozentualer Anteil fibrosierter Fläche an vermessenem Myokardausschnitt) als prozentualer

Gesamtfibroseanteil der vermessenen Gesamtfläche des jeweiligen Herzens zusammenzufassen, wurden sie gemittelt. Es resultierten 8 MW der Kontrollgruppe, 6 MW der von KHK und 25 MW der an DCM erkrankten Herzen. Aus diesen Werten wurde für die statistischen Signifikanzberechnungen von jeder untersuchten Gruppe der mediane Wert bestimmt, der im Weiteren als Fibrosegehalt der Kontroll-, DCM- bzw. KHK-Gruppe dargestellt wird.

2.9 Validierung der Methoden

2.9.1 RNA-Ausbeute vor und nach Dnase-Verdau

Von jeder Myokardprobe wurden Stücke mit Feuchtgewichten (FG) zwischen 10,7-40,0 mg entnommen, um daraus die RNA zu extrahieren. Die RNA-Ausbeuten der individuellen Gruppen wurden in Tabelle 4 genannt. Die RNA-Ausbeuten vor und nach Dnase-Verdau waren zwischen den einzelnen Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (*s. Tab.3*).

Tab. 3: Daten der RNA-Ausbeute vor und nach Dnase-Verdau

Diagnose	FG [mg]	Vor Dnase-Verdau [$\mu\text{g RNA/mg FG}$]	Nach Dnase-Verdau [$\mu\text{g RNA/mg FG}$]
Kontrollen	26,96	0,5 \pm 0,2	0,39 \pm 0,17
DCM	14,4	0,5 \pm 0,09	0,36 \pm 0,09
AS	42,92	0,42 \pm 0,2	0,29 \pm 0,23
KHK	10,75	0,48 \pm 0,1	0,29 \pm 0,09

Darstellung der RNA-Ausbeute vor bzw. nach Dnase-Verdau als MW der Kontroll-, DCM-, AS- und KHK-Gruppe

2.9.2 Etablierung quantitativer PCR

2.9.2.1 Optimale Spezifität durch Hot-Start-Technik

Die PCR wurde mit Hot-Start-Technik in dem Real Time-PCR-Gerät GeneAmp 5700 durchgeführt. Die dazu verwendete Polymerase ist die AmpliTaq GoldTM, die bei Raumtemperatur chemisch modifiziert und damit inaktiv ist. Dadurch werden unspezifische Primerfehlpaarungen während der Probenvorbereitung nicht verlängert. Erst nach irreversibler Aktivierung durch einen Hot Start von 10' bei 95°C beginnt das Enzym mit der spezifischen Verlängerung.

2.9.2.2 Optimale Primerkonstruktion

Ausgangspunkt für das Primerdesign ist die genomische DNA-Sequenz für das zu amplifizierende Gen. Optimalerweise werden die Primer derart entworfen, dass sie in ihrem

komplementären Anlagerungsbereich ein Intron überspannen. Auf diese Weise wird ein Mitamplifizieren von DNA-Verunreinigung vermieden. Die von uns verwendeten Primer sind intronüberspannend, so dass eine spezifische Amplifikation gewährleistet ist (s. *Material/Methodik 2.4*).

2.9.2.3 Primeroptimierung für Real-Time-PCR

Zur Primeroptimierung für die PCR-Reaktionen wurden systematisch die Ansätze verschiedener Konzentrationsverhältnisse Forward- (in 5' Richtung amplifizierend) zu Reverse- (in 3' Richtung amplifizierend) Primer von 1:1, 1:3 und 3:1 bei ansonsten konstanten Mastermixkomponenten ausgetestet. Die einfache Primerkonzentration entsprach 5 pmol. Optimal ist das Primerkonzentrationsverhältnis, wenn keine Primer-Dimerbildung und keine Primerselbstinhibition stattfindet.

Des Weiteren wurde die vom Hersteller empfohlene Anlagerungstemperatur optimiert, indem in einem PCR-Durchgang Variationen um je 2°C nach unten bzw. oben ausgetestet wurden. In den PCR Reaktionen wurde das Verhältniss 1:1 Forward-zu Reverseprimer und ein Annealingsschritt von 60'' bei 60 C° ausgewählt.

2.9.2.4 Validierung der optimalen PCR Zykluslänge

Die Validierung der optimalen Zykluslänge für die PCR der CnB (ANP, BNP, GAPDH) cDNA erfolgte, indem eine repräsentative RNA auf gleiche Weise wie die untersuchten Proben reverse transkribiert und in 50 ng Ansätzen mit den spezifischen Primern 32-46 Zyklen amplifiziert wurde. In einem Zweizyklentakt wurde je ein Ansatz entnommen, dessen Reaktion gestoppt und anschließend in einem Ethidiumbromidgel elektrophoretisch aufgetrennt, um mit UV-Licht detektiert werden zu können. Die Aufnahme der Ethidiumbromid gefärbten Banden erfolgte mittels einer Geldokumentationsanlage (Biometra). Die Bandenstärken wurden mit dem Alpha-ease-Computerprogramm quantifiziert und logarithmisch in Abhängigkeit zu ihrer Zykluslänge dargestellt. Die Zyklusbereiche, in denen die Amplifikation linear verläuft, sprechen für eine optimale Amplifikationseffizienz, bei der die Zunahme des Amplifikats von einem Zyklus zum nächsten mit den zur Verfügung stehenden Mitteln am besten detektiert werden kann. Geht die Amplifikation in ein Plateau über, sind die Bereiche der optimalen PCR-Effizienz überschritten. Für den Plateau-Effekt in der Amplifikationskurve ist hauptsächlich die zunehmende Kopienzahl

verantwortlich, durch die das Reannealing der Produktstränge mehr und mehr die Primeranlagerung antagonisiert (Produkthemmung). Die derart (s.o.) ermittelten optimalen Bedingungen dienen als Anhaltspunkte und konnten nicht 1:1 auf das Real-Time-PCR-Gerät übertragen werden, da hier mit anderen Amplifikationsraten gerechnet werden muss. Für die Quantifizierung der CnB mRNA (ANP, BNP, GAPDH) wurden auf dem Real-Time-PCR-Gerät 40 PCR-Zyklen gewählt. Der Auswertzyklus wurde für CnB und ANP bei 25-32, für BNP bei 20-30 und für GAPDH bei 21-25 Zyklen gelegt.

2.9.3 Validierung der Quantifizierung anhand einer Eichgeraden

2.9.3.1 Erstellen einer Eichgerade

In jedem PCR-Durchgang wurde eine Verdünnungsreihe mit bekannten Ausgangskonzentrationen cDNA mitgeführt (s. 2.5 *PCR Material/Methodik*). Zum Erstellen einer Standardgerade wurden die C_t -Werte des jeweiligen Verdünnungsschrittes invers logarithmisch zu der Ausgangskonzentration der cDNA dargestellt. Es ist darauf zu achten, dass die Ausgangskonzentrationen der zu messenden Proben innerhalb des Konzentrationsbereichs der Verdünnungsreihen liegen, da eine gleiche PCR-Effizienz vorliegen sollte, um die entsprechende Standardgerade zur Quantifizierung heranziehen zu können. Standardgeraden sind nicht nur Grundlage der PCR-Quantifizierung anhand Standardgeradengleichungen (s.3.1.3.2), sondern dienen auch als Kontrolle der PCR-Effizienz. Mit ihrer Hilfe können, in einer vergleichenden Studie mit PCR-Durchgängen verschiedener Gene, deren PCR-Effizienzen verglichen werden. Geht man von einer 100%-igen Effizienz aus, so wird mit jedem Zyklus eine Verdopplung der Amplifikationsmenge erreicht (s. *Abb.1*).

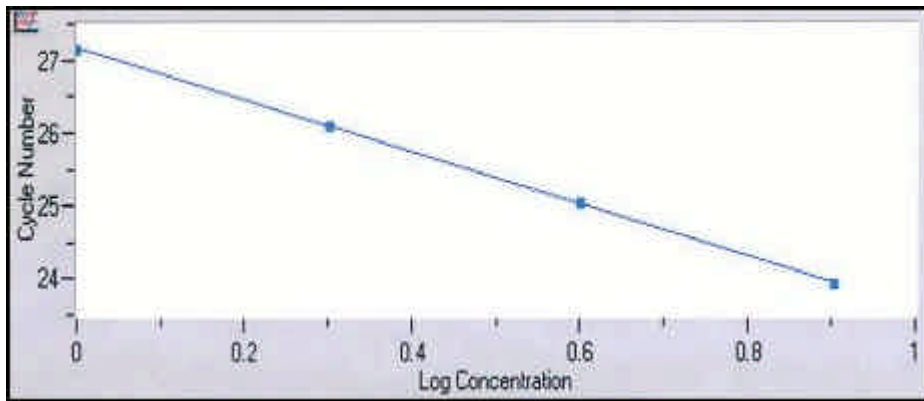


Abb. 1: Standardgerade einer PCR-Quantifizierung

Die C_t -Werte des jeweiligen Verdünnungsschrittes werden invers logarithmisch zur Ausgangskonzentration der cDNA dargestellt.

2.9.3.2 Auswertung mit Hilfe der Standardgeradengleichung

Nach Beendigung der Amplifikation wurde der PCR-Ablauf als sogenannter Amplifikationsplot, einer graphischen Darstellung, in der die PCR-Zyklen gegen die Fluoreszenzlevel der Proben aufgetragen sind, von der Gen-Amp5700 Software ausgegeben (*PCR-Amplot s. Abb. 2*).

In den Amplot wurde zur Auswertung eine Linie auf Höhe eines ausgewählten Fluoreszenzsignals der y-Achse als parallele x-Gerade gelegt. Kriterium ist hierbei, dass bei diesem Signal alle Proben einen ersten deutlichen Anstieg von der Grundlinie zeigen und die Steigung der Amplifikationsplots gleichmäßig und optimalerweise maximal verläuft. Damit wurde das Ziel verfolgt, die Auswertlinie in einen der ersten Zyklen mit maximaler PCR-Effizienz zu legen. Dieser wurde anschließend als Auswertzyklus (Treshold-Cycle = C_t -Wert) einer jeden Probe bestimmt. Der C_t -Wert entspricht dem Zyklus, in welchem die jeweilige Probe das Fluoreszenzsignal der Auswertlinie erreicht hat. Da das Fluoreszenzsignal auf dem Vorhandensein doppelsträngiger DNA basiert und proportional zur Amplifikationsmenge der spezifischen Gene ist, erreichten die Proben mit einer höheren Ausgangskonzentration spezifischer cDNA pro Gesamt-RNA Ausgangskonzentration das C_t -Signal entsprechend früher. Es wurde mit Hilfe der Verdünnungsreihen (s.o.) eine Standardgerade erstellt, indem man die bekannten Ausgangskonzentrationen (cDNA) der einzelnen Verdünnungsschritte invers logarithmisch gegen die dazu gemessenen C_t -Werte darstellt. Der ermittelte Proben- C_t -Wert wurde auf diese Gerade bezogen und in deren Standardgeradengleichung ($y = mx+b$) eingesetzt. Steigung und y-Achsenschnittpunkt der Geraden wurden determiniert, so dass mit Hilfe des eingesetzten C_t -Wertes der zu quantifizierenden Zielgene (semiquantitativ) die Konzentrationen

der spezifischen RNA in der konstanten Gesamt-Ausgangs RNA bestimmt werden konnte, wenn die Gleichung nach x aufgelöst wurde.

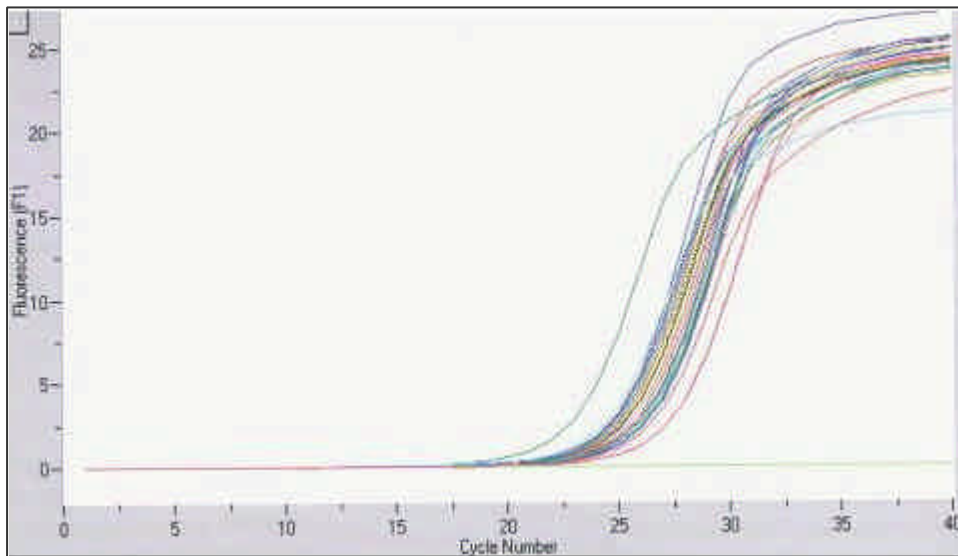


Abb. 2: PCR-Amplot

Darstellung, eines PCR-Amplot, in dem Fluoreszenzlevel versus PCR-Zyklusanzahl aufgezeichnet werden

2.9.3.3 Kalibrator und externe Standardisierung

Um die erhaltenen Konzentrationswerte an cDNA zu quantifizieren, wurden sie relativ zu einem Kalibrator gesetzt, welcher einer physiologischen Referenz gleichkommt. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurde der MW der Kontrollgruppe als Kalibrator definiert. Zusätzlich wurden die Werte auf eine endogene Kontrolle, ein sogenanntes „House-keeping-Gen“ (HK-Gen = GAPDH) normalisiert, um den Unterschieden und Ungenauigkeiten in den Ausgangskonzentrationen sowie der Qualität der Gesamt-RNA und der Effizienz der RT-Reaktion Rechnung zu tragen. Bei dem externen Standard sollte es sich um ein gegenüber den Krankheitseinflüssen der untersuchten Patientengruppen stabiles Gen handeln.

Folgende Formel wurde zur Berechnung der kalibrierten und standardisierten PCR-Ergebnisse verwendet:

$$\text{Kalibrierung} = \frac{c[\text{Zielgen Patient}] / c[\text{HK-Gen Patient}]}{c[\text{Zielgen Kalibrator}] / c[\text{HK-Gen Kalibrator}]}$$

2.9.4 Proteinausbeute

Von jeder Myokardprobe wurden Stücke mit Feuchtgewichten zwischen 60-80 mg entnommen und deren Proteine extrahiert. Nach Austesten verschiedener Lysispuffervolumen/FG-Verhältnissen (1:5, 1:10 und 1:15) und unterschiedlicher Homogenisierungsmatrixes wurde die Proteinextraktion optimiert. Die Protein-Ausbeuten wurden tabellarisch dargestellt. Und waren zwischen den untersuchten Gruppen statistisch nicht signifikant unterschiedlich (s. Tab.4). Ein Lysispuffervolumen/FG-Verhältnis von 1:5 ermöglichte die größten Ausbeuten und wurde für die Extraktionen beibehalten.

Tab. 4: Daten der Protein-Ausbeute

Diagnose	FG [mg]	Ausbeute [μg Protein/mg FG]
Kontrollen	60,4	43,6 \pm 8,4
DCM	70,1	40,1 \pm 10,1
AS	60,2	36,3 \pm 10,9
KHK	80,2	37,9 \pm 8,9

Darstellung der Protein-Ausbeute als MW der Kontroll-, DCM-, AS- und KHK-Gruppe

2.9.5 Etablierung quantitatives Western Blot-Verfahren

2.9.5.1 Proteineinsatz und Proteinqualität

Zu Beginn der Versuche wurden mit dem CnB-AK Verdünnungsreihen mit Proteinkonzentrationen von 10-50 μg durchgeführt. Diese Verdünnungsreihen wurden durch Optimierung der AK-Konzentrationen (s. Ergebnisse 3.1.5.4) solange validiert, bis das spezifische Signal eine saubere, konzentrationsabhängige Steigerung der OD zeigte. Aus den Verdünnungen konnte nun die Proteinmenge bestimmt werden, deren spezifische CnB-Bande deutlich sichtbar und gut von den Banden der vorherigen bzw. darauffolgenden Probe abzugrenzen war. Die graphisch in einem Achsenkreuz dargestellte Abhängigkeit von Proteinkonzentration zu OD-Signal zeigte in diesem Konzentrationsbereich einen linearen Anstieg. Für den CnB spezifischen Western Blot wurde eine Gesamtprotein-Konzentration von 40 μg /Probe ausgewählt.

Die Proteinqualität kann bei der Extraktion, durch Hitzedenaturierung in der Aufarbeitung für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE), bei der Zwischenlagerung und durch eine inkonstante Kühlkette von Proteinextraktion bis –trennung beeinflusst werden. Sie wurde anhand des Proteinmusters und der Bandenqualität des in den Comassiegelen angefärbten Gesamtproteins beurteilt und kontrolliert (s. *Ergebnisse 3.1.5.5*). Der Bandenverlauf der verwendeten Proben war gleichmäßig und entsprach einem typischem Myokardproteinmuster, ein Hinweis auf guterhaltene und nicht degradierte Proteine.

2.9.5.2 Optimale Trennbedingungen bei SDS-PAGE

Bei der Optimierung der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) mussten einige Parameter auf die relativ geringe Molekülmasse des CnB Proteins abgestimmt werden. Für optimale Wanderungsbedingungen der Proteine dieser Größe wurde im Trenngel ein Acrylamidanteil von 12,5 % gewählt. Die Laufzeit des Gels wurde auf 30 Min. bei 80 V zum Konzentrieren im Sammelgel und anschließend 1,5 h bei 100 V zur Trennung optimiert. Die Pufferbereiche wurden für eine saubere Trennung und für einen effizienten Transfer in einen pH-Bereich von 7,3-11 eingestellt. Es wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE durchgeführt, um die Proteine vor der eigentlichen Trennung in einer konzentrierten Ausgangsbande zu fokussieren.

2.9.5.3 Optimale Transferbedingungen des Western Blot

Es ist eine Trägermembran nötig, auf die Proteine mit geringem Molekulargewicht effizient geblottet werden. In vorliegendem Versuchsaufbau wurde eine Nitrocellulosemembran mit Proteinbindungskapazität bis zu 180 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und einer Porengröße von 0,1-0,2 genutzt.

Das Wet-Blot-Verfahren gewährleistet durch große Puffervolumina und Durchflusskühlung, die übermäßiges Erwärmen der Proteine verhindern, einen proteinschonenden Transfer. Ein 20 %iger Methanol-Anteil im Transferpuffer lockert die SDS-Moleküle von der Proteinoberfläche und begünstigt die Proteinbindung an der Nitrocellulosemembran.

Die Strom und Spannungsstärke und die Dauer des CnB Blots wurden wie folgt ausgetestet und optimiert. Die Strom-bzw. Spannungsstärke wurde hochreguliert, wenn nach dem Blot noch Proteinbanden auf dem SDS-PAGE Gel mit Comassie-Bluefarblösung anfärbbar waren. Waren sowohl auf der Membran als auch auf dem SDS-PAGE Gel keine Proteinbanden mehr

nachweisbar, wurde die angelegte Spannung herunterreguliert, da die Proteine während der Blotdauer zu weit in Richtung Anode fokussiert und durch die Membran hindurch geblottet worden sind.

Die Effizienz des Blotvorgangs, unter den angewandten Bedingungen (*s. Material / Methodik 2.7.4*), wurde mit Hilfe der Ponceaurotfärbung der Membranen kontrolliert.

2.9.5.4 AK-Optimierung

Die Hybridisierungsmethode mit zwei Antikörpern führt zu einer Signalverstärkung gegenüber der direkten Proteinmarkierung, da von dem 1.AK potentiell mehr als ein HRP markierter 2.AK mit gebunden wird.

Es wurden systematisch verschiedene Verdünnungsstufen des 1.AK (1:1500, 1:2000) und des 2.AK (1:150000, 1:300000) ausgetestet, um Hintergrundsignale und unspezifische Banden zu minimieren. Für den CnB-Blot wurde eine Verdünnung von 1:2000 für den 1.AK und 1:300000 für den 2.AK gewählt. Alle Chemilumineszenzsignale, die neben der spezifischen CnB-Bande nach Optimierung nicht vermieden werden konnten, waren ebenfalls auf der Negativkontrolle sichtbar und wurden daher als unspezifisch beurteilt. Der verwendete AK bindet spezifisch an CnB und zeigt keine Kreuzreaktion mit CnA.

2.9.5.5 Versuchskonsistenz und externe Standardisierung

Aus technischen Gründen konnten nur ein Einfachansätze jeder Probe durchgeführt werden. Um die Reliabilität der Ergebnisse zu überprüfen, wurde die beschriebenen Versuchsprozedur wiederholt. Anhaltspunkte für eine gelungene Reproduktion waren überwiegend gleiche Rangfolgen der Einzelproben innerhalb jeder Gruppe und gleiche Abweichungstendenzen der Krankheitsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe in Blotdurchgang 1 und 2. Für einen quantitativen Western Blot ist die exakt gleiche Proteineinsatzmenge in die SDS-PAGE Voraussetzung. Die photometrische Vermessung auf dem ELISA-Reader und die darauf basierende Konzentrationseinstellung der Proteine weist methodische Ungenauigkeiten auf, die berücksichtigt werden müssen. Daher wurden die Ergebnisse extern auf einen Bezugswert standardisiert. Als Bezugsbande diente uns die 40 kDa große Aktinbande, die auf Comassiegelen quantifiziert wurde (*s. 2.7.2*). Ihr myokardialer Gehalt gilt als stabil und resistent gegenüber hypertrophievermittelten Regulationsvorgängen.

2.9.6 Etablierung der quantitativen Fibrosemessung

Die Quantifizierung des linksventrikulären Fibrosegehaltes musste sich auf die Untersuchung der entnommenen Myokardproben beschränken, die nur repräsentativ den Gesamtfibrosegehalt des gesamten linken Ventrikels darstellen. Da eine ungleichmäßige Verteilung der Fibrose im Myokard vorliegt, ist es wichtig, mit einer methodisch hohen Messgenauigkeit eine möglichst große Fläche in die Quantifizierung einzubeziehen. Eine komplette Ausmessung der Präparatfläche ist auf Grund des hohen Arbeitsaufwands nicht vertretbar. Andererseits erhält man durch unzureichende Anzahl der Messungen gegebenenfalls nicht repräsentative Ergebnisse.

Deshalb musste das Messmodul BG 7, das sich zuvor in der Vermessung von Biopsaten zur Beurteilung von Spenderorganen bewährt hat, den Anforderungen der Vermessung eines größeren histologischen Präparats angepasst werden. Dazu wurde zunächst ein Präparat mit einer 200-fachen Vergrößerung komplett vermessen, so dass Basisdaten für die realen Verhältnisse des interstitiellen Gewebes gewonnen werden konnten. In weiteren Voruntersuchungen wurde näherungsweise ermittelt, wieviele Areale vermessen werden mussten, um Ergebnisse zu erhalten, die sich statistisch nicht signifikant von dem "Realwert" unterscheiden. Im Ergebnis dieser Analysen hat sich das in Kapitel 2.8 Material/Methoden beschriebene Verfahren als geeignet erwiesen. Die so ermittelten Ergebnisse (einer Messung von $14,7 \text{ mm}^2$) unterschieden sich nicht mehr statistisch signifikant von denen der Präparatgesamtläche mit $31,6 \text{ mm}^2$.

Damit liess sich die Farbsegmentierungsmethode zur Quantifizierung des Anteils an interstitiellem Gewebe (Fibrose, Narben) im Myokard einsetzen.

2.10 Darstellung der Ergebnisse und Statistik

2.10.1 Darstellung der Ergebnisse

Zur externen Standardisierung der PCR wurde von jeder Probe ein Zielgen/GAPDH-Quotient gebildet. Im Weiteren wird dies als Normalisierung der Werte bezeichnet.

Mit einer semiquantitativen PCR ist es nicht möglich absolute Konzentrationen zu bestimmen. Die im Ergebnissteil aufgeführten Endwerte entsprechen dem normalisierten mRNA-Gehalt des jeweiligen Zielgens relativ zu einem Kalibrator (s. 2.10.3.3.).

Die Gruppenmediane der hypertrophierten Herzen (DCM, AS, KHK) werden auf den Median der Kontrollgruppe des betreffenden Gens bezogen und als dessen prozentualer Anteil dargestellt (% d. Ko).

Für die Korrelationen wurden die gemessenen mRNA-Werte der Zielgene ohne Normalisierung und Kalibrierung benutzt. Von den Korrelationsanalysen und den statistischen Berechnungen der Zielgene wurden die Werte ausgeschlossen, die außerhalb des Wertebereichs von MW \pm 4-fache Standardabweichung lagen und als Ausreißer betrachtet wurden.

In den Western Blot Verfahren der untersuchten Krankheitsgruppen wurden auf jedem der 3 Blots zehn identische Kontrollherzen mitgeführt, deren Median jeweils als Vergleichswert diente. Die Endergebnisse entsprechen dem MW der Daten aus 2 Blots (s. 2.9.5).

Die statistischen Berechnungen des CnB Proteingehaltes erfolgte unter Vernachlässigung der Werte, die nach oben genannten Kriterien als Ausreißer betrachtet wurden.

In den Boxplots wird der Median (Me) als waagerechte Linie dargestellt. Die 25% bzw. 75% Perzentilen (25%/75%Perz.) entsprechen der Box. Die Balken markieren den größten Wert der äußeren Eingerenzung (Me \pm 2-fache Spannweite). Als Extremwerte(*) werden Fälle mit Werten bezeichnet, die mehr als 3 Interquartilsabstände von dem 1. und 3. Quartil abweichen. Werte, die zwischen 1,5 - 3 Interquartilsabstände von dem 1. und 3. Quartil abweichen, werden von SPSS mit einem Kreis (o) markiert.

2.10.2 Statistik

Von der Gruppe der Kontrollherzen und den Gruppen der hypertrophierten Herzen wurden Median (Me) \pm 25%/75%-Perzentile (25%/75%-Perz.) der mRNA- und Proteinmessungen berechnet. Um einen Vergleich zu ermöglichen, wurde ergänzend der Mittelwert (MW) \pm

Standardfehler (SEM) angegeben.

Für die Signifikanzberechnungen wurde nur mit dem Me der nicht parametrische Mann-Whitney-Test durchgeführt, da keine Normalverteilung vorlag. Die berechneten Signifikanzen werden auf einem Niveau von $p < 0,001$ bzw. $p < 0,05$ angegeben.

Die Korrelationsanalysen wurden nach Spearman durchgeführt und mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$ bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 11.0 (Fa. SPSS for Windows).

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der krankheitsspezifischen Genregulation

3.1.1 Regulation von CnB, ANP und BNP mRNA in hypertrophierten Herzen mit DCM, AS und KHK

Der mRNA-Gehalt der Hypertrophie-markergene ANP und BNP war bei DCM, AS und KHK signifikant erhöht (Tab. 5, 6). Dagegen zeigte sich für CnB nur in den Herzen mit DCM ein signifikant erhöhter mRNA-Gehalt (Tab. 7, Abb3). Hier wurde ein Anstieg auf 293% gegenüber der Kontrollgruppe gemessen. Im Gegensatz dazu war die CnB Expression in den Patientengruppen mit AS auf 43% und mit KHK auf 79% tendenziell erniedrigt. Diese Differenzen waren nicht signifikant (Tab. 7, Abb.4 und 5).

Tab. 5: ANP mRNA in Kontroll-und Krankheitsgruppen

Gruppen	ANP/GAPDH Me ± 25/75% Perzentile MW ± SEM	p	ANP (%d.Ko) Me ± 25/75% Perzentile MW ± SEM	p
Kontrollen	0,6 ±0,3/1,2 0,86 ±0,2	/	100 ±53/213 151 ±36	/
DCM	10,2 ±3,6/39,7 55,2 ±29	<0,001	1790 ±633/6966 9684 ±5105	<0,001
AS	60,4 ±2,8/108,5 71,6 ±26	<0,001	10595 ±489/19029 12566 ±4595	<0,001
KHK	4,7 ±0,19/107,4 53 ±32	<0,001	830 ±34/18848 9313 ±5576	<0,001

In Tab. 5-7 werden der Median (Me) ±25/75% Perzentilen bzw. Mittelwert (MW) ±Standardfehler (SEM) der normalisierten Werte der PCR-Amplifikation dargestellt. In der vierten Spalte werden die Werte prozentual von dem Me bzw. MW der Kontrollen (% d. Ko) angegeben, so dass der Wert (% d. Ko) der Kontrollgruppe 100% entspricht. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test.

Tab. 6: BNP mRNA in Kontroll-und Krankheitsgruppen

Gruppen	BNP/GAPDH Me ± 25/75% Perzentile MW ± SEM	p	BNP (%d.Ko) Me ± 25/75% Perzentile MW ± SEM	p
Kontrollen	0,3 ±0,17/0,99 1,0 ±0,4	/	100 ±50/300 301 ±118	/
DCM	3,4 ±0,95/7,2 6,1 ±1,8	<0,001	1042 ±287/2201 1842 ±540	<0,001
AS	6,8 ±3,3/22,8 11,9 ±2,9	<0,001	2048 ±990/6895 3610 ±867	<0,001
KHK	4,4 ±2,1/8,0 5,4 ±1,6	<0,001	770 ±400/1377 941 ±278	<0,001

Legende s. Tab. 5

Tab. 7: CnB mRNA in Kontroll-und Krankheitsgruppen

Gruppen	CnB/GAPDH Me ± 25/75% Perzentile MW ± SEM	p	CnB (%d.Ko) Me ± 25/75% Perzentile MW ± SEM	p
Kontrollen	4,5 ±1,1/11,3 5,8 ±1,2	/	100 ±25/252 130 ±27	/
DCM	13,1 ±7,8/17,8 12,5 ±1,2	<0,001	293 ±174/397 278 ±28	<0,001
AS	2,0 ±1,6/2,5 2,3 ±0,3	0,34, n.s.	43 ±36/56 51 ±7,2	0,34, n.s.
KHK	3,5 ±2,6/12,9 6,7 ±2,1	0,50, n.s.	79 ±58/288 148 ±46	0,50, n.s.

Legende s. Tab.5

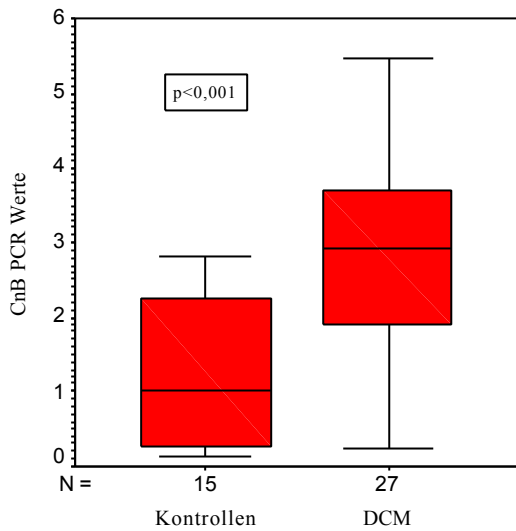


Abb. 3: Anstieg von CnB mRNA in Herzen mit DCM

CnB mRNA-Gehalt der Kontrollgruppe und der DCM-Gruppe (*s. Tab. 7*). In der DCM-Gruppe war der CnB mRNA-Gehalt auf 293 % der Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p < 0,001$).

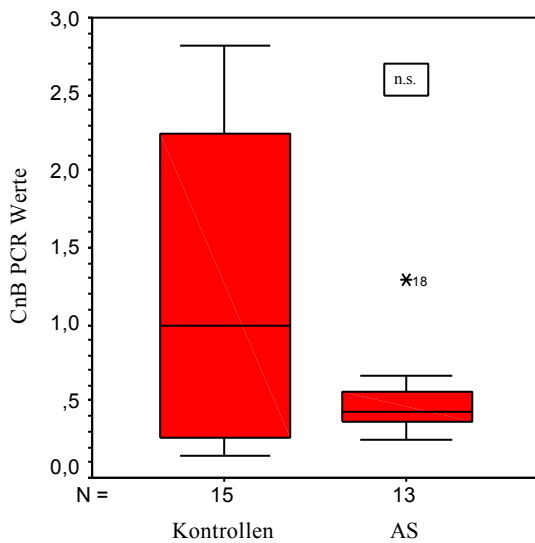


Abb. 4: CnB mRNA-Gehalt in Herzen mit AS

CnB mRNA-Gehalt der Kontrollgruppe und der AS-Gruppe (*s. Tab. 7*). In der AS-Gruppe war der CnB mRNA-Gehalt nicht signifikant auf 43% der Kontrollgruppe verändert.

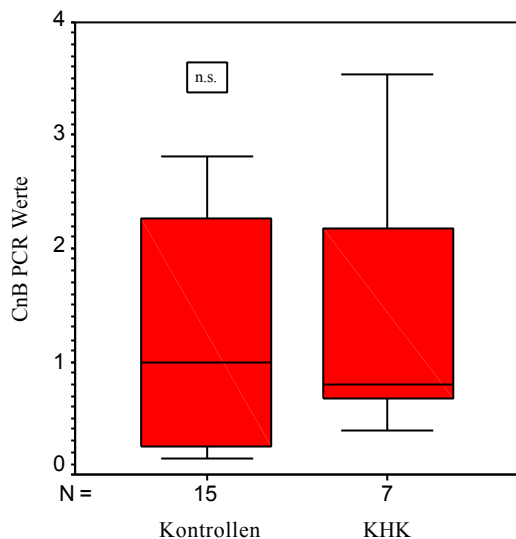


Abb. 5: CnB mRNA-Gehalt in Herzen mit KHK

CnB mRNA-Gehalt der Kontrollgruppe und der KHK-Gruppe (s. Tab.7). In der KHK-Gruppe betrug der CnB mRNA-Gehalt 79% der Kontrollgruppe (n.s.).

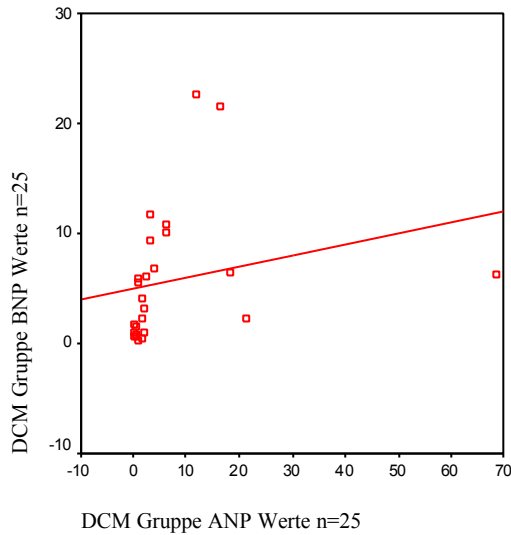
3.1.2 Korrelation von ANP, BNP und CnB mRNA in hypertrophierten Herzen

Die Hypertrophiemarker ANP und BNP korrelierten in den hypertrophierten Herzen mit AS und DCM auf mRNA-Ebene statistisch signifikant positiv miteinander, nicht aber in den Herzen mit KHK (Signifikanzen s. Tab.8, Abb.6,7 und 8). In der DCM-Gruppe wurde eine zweite Korrelationsanalyse, unter Vernachlässigung eines Extremwertes (Kriterien 2.10.1), durchgeführt (s. Abb.6b).

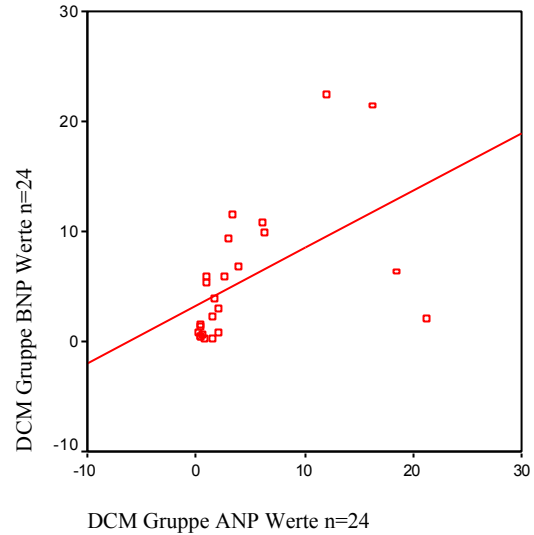
Tab.8: Korrelationskoeffizienten der ANP und BNP mRNA in Kontroll- und Krankheitsgruppen

ANP/BNP	Kontrollgruppe	DCM	AS	KHK
Korrel.-Koeffizient (r)	0,81	0,73	0,78	0,32
p	<0,01	<0,01	<0,05	0,48 n.s.

Um die ANP und BNP mRNA zu korrelieren, wurde eine Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt. Dargestellt werden Korrelationskoeffizient (r) und Signifikanzniveau (p).



6



6b

Abb. 6, 6b: Korrelation von ANP und BNP Expression bei DCM

In der DCM Gruppe ergab sich eine signifikant positive Korrelation ($r = 0,734^{**}$, $p < 0,01$) der Hypertrophiemarker ANP und BNP. Der Extremwert hat einen starken Einfluss auf den Verlauf der Regressionsgeraden. Daher in Abb.6b Darstellung unter Vernachlässigung dieses Wertes ($r = 0,810^{**}$, $p < 0,01$).

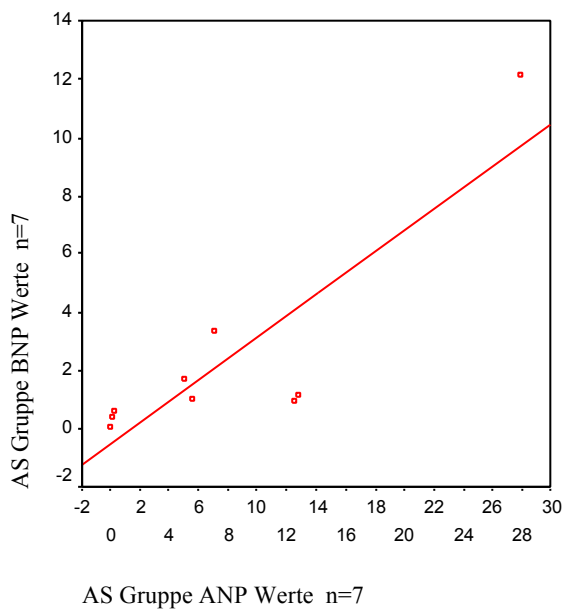


Abb. 7: Korrelation der ANP und BNP Expression bei AS

In der AS-Gruppe zeigte sich eine signifikant positive Korrelation der Hypertrophiemarker ($r = 0,78$, $p < 0,05$).

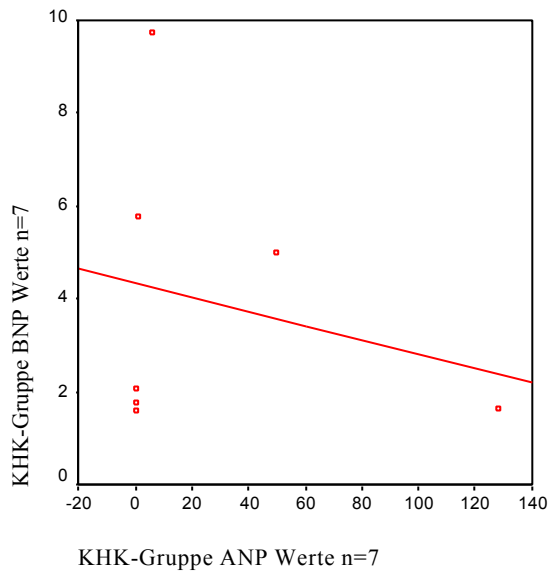


Abb. 8: ANP und BNP Expression bei KHK; keine signifikante Korrelation

In der KHK-Gruppe zeigte sich keine signifikante Korrelation der Hypertrophiemarker-Expression ANP und BNP zueinander ($r = 0,32, p > 0,05$).

In keiner der Gruppen war eine signifikante Korrelation zwischen dem ANP und CnB mRNA-Gehalt bzw. dem BNP und CnB mRNA-Gehalt nachzuweisen (s. Abb.9).

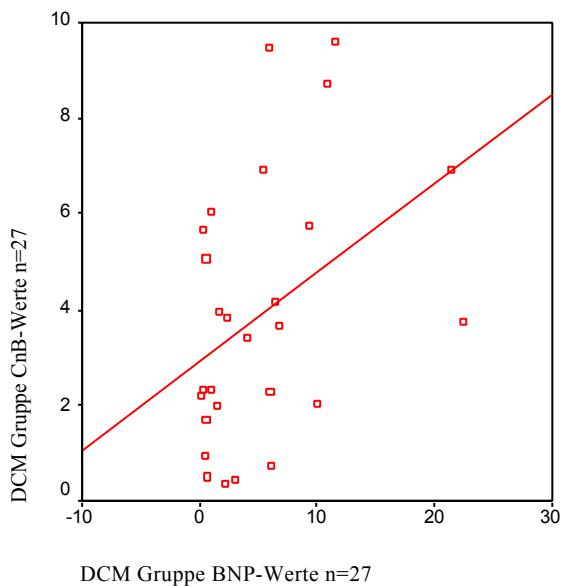


Abb. 9: CnB und BNP Expression bei DCM; keine signifikante Korrelation

In der DCM-Gruppe zeigte sich keine signifikante Korrelation von der CnB und BNP mRNA. Ebenso wurde in den Gruppen mit AS und KHK keine Beziehung zwischen der CnB und ANP bzw. BNP mRNA gefunden (ohne Abb.).

Als Kontrollgruppe für die mRNA-Ergebnisse der hypertrophierten Herzen dienten 15 abgelehnte Spenderherzen, für die sich die in Tabelle 8 dargestellten Korrelationen ergaben (s.Tab.8).

Die Hypertrophiemarker ANP und BNP zeigten auf mRNA-Ebene eine statistisch signifikant positive Korrelation miteinander und liegen, außer zwei Extremwerten (Def. s. 2.10.1), dicht an der Regressionsgeraden (s.Abb.10).

Es wurde eine zweite Korrelationsanalyse, unter Vernachlässigung der Extremwerte, durchgeführt (s.Abb.10b).

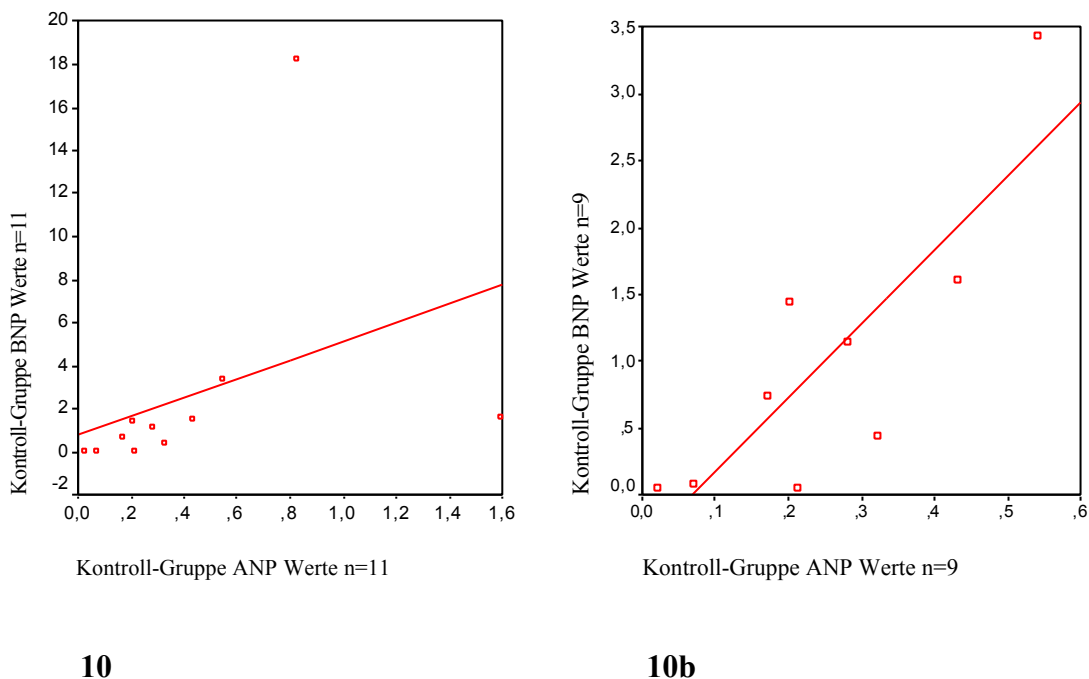


Abb. 10: Korrelation von ANP und BNP mRNA der Kontrollherzen

In der Kontrollgruppe zeigte sich eine statistisch signifikante, positive Korrelation der Hypertrophiemarker-Expression ANP und BNP ($r = 0,811^{**}$, $p < 0,01$). Die Extremwerte haben einen starken Einfluss auf den Verlauf der Regressionsgeraden. Daher in Abb.10b Darstellung ohne diese Werte. Unter Vernachlässigung der Extremwerte liegen die Werte der ANP und BNP mRNA dicht an der Regressionsgeraden

CnB war in der Kontrollgruppe nicht mit ANP ($r = 0,36$, $p > 0,05$) korreliert und zeigte nur mit BNP eine Korrelation ($r = 0,49$, $p < 0,05$).

3.2 Untersuchung des krankheitsspezifischen CnB Proteingehalts

Mit dem im Kapitel 2.7.4 dargestellten Western Blot Verfahren wurde in Gewebeproben aus Herzen mit AS, DCM und KHK im Vergleich zu einer Gruppe nicht pathologisch veränderter Herzen der CnB Proteingehalt bestimmt. Es handelt sich um die identischen Herzen der CnB mRNA-Quantifizierung.

3.2.1 CnB Proteingehalt in hypertrophierten Herzen mit AS, DCM und KHK

Der CnB Protein-Gehalt bei DCM war auf 129% ($p = 0,089$, n.s.) der Kontrollgruppe erhöht (*s.Abb.11*). Dies war in einem zweiseitigen Test nicht signifikant. Postuliert man auf Grund der Erhöhung der mRNA auch einen Anstieg auf Proteinebene und nutzt dementsprechend einen einseitigen Test, ergibt sich ein signifikanter Anstieg ($p < 0,05$). In den Herzen mit AS und KHK unterschied sich CnB auf Proteinebene nicht signifikant von der Kontrollgruppe (*Tab.9*). Als prozentualer Anteil zum medianen Vergleichswert (*s. 2.10.5.6*) entspricht das einem, in der Gruppe der AS auf 139% ($p = 0,495$, n.s.) (*s.Abb.12*) und in der Gruppe der KHK auf 78% ($p = 0,187$, n.s., *s.Abb.13*). veränderten Proteingehalt der hypertrophierten Herzen.

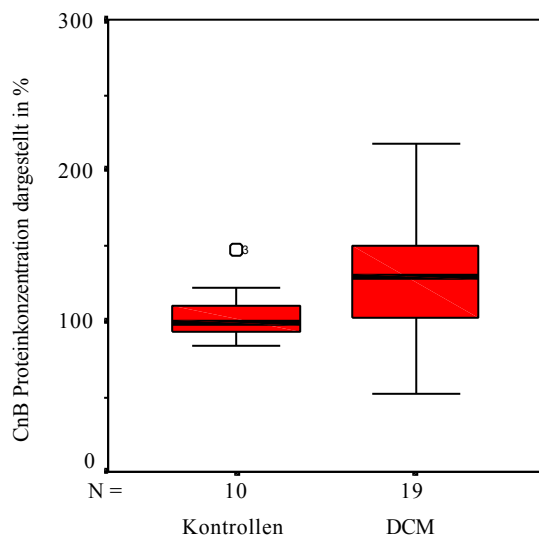


Abb. 11: CnB Proteingehalt der Herzen mit DCM

In der DCM-Gruppe war der CnB Proteingehalt auf 129% der Kontrollgruppe gestiegen. Dieser Anstieg ist in einem einseitigen Test n.s. ($p = 0,089$; n.s.), in einem zweiseitigen Test signifikant ($p < 0,05$) (*s. Tab.9 CnB Proteingehalt der untersuchten Krankheitsgruppen*).

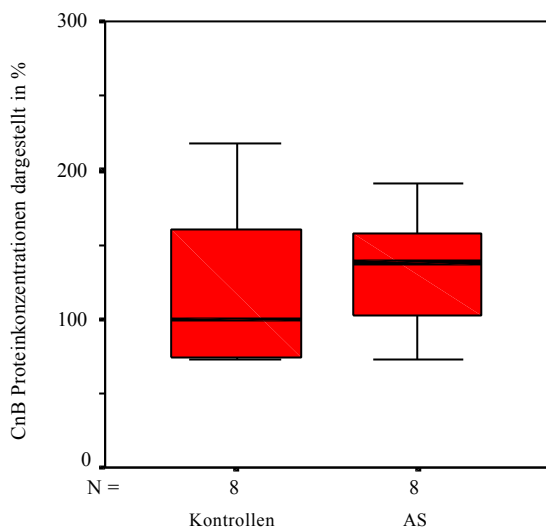


Abb. 12: CnB Proteingehalt der Herzen mit AS

In der AS-Gruppe war der CnB Proteingehalt auf 139% der Konzentration der Kontrollgruppe erhöht ($p = 0,495$, n.s.) (s. Tab.9 CnB Proteingehalt der untersuchten Krankheitsgruppen).

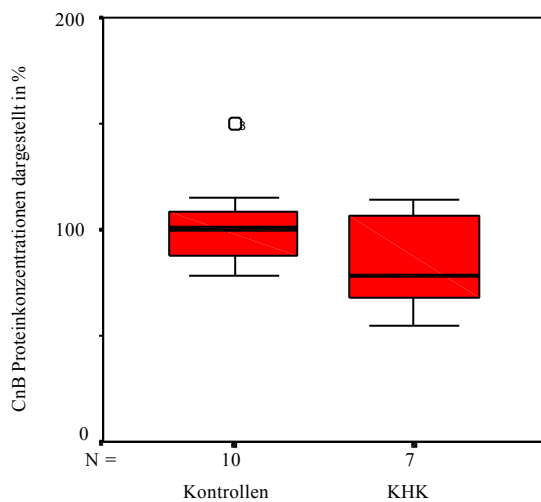


Abb. 13: CnB Proteingehalt der Herzen mit KHK

In der KHK-Gruppe war der CnB Proteingehalt auf 76% der Kontrollgruppe erniedrigt ($p = 0,187$, n.s.) (s. Tab.9 CnB Proteingehalt der untersuchten Krankheitsgruppen).

Tab. 9: CnB Proteingehalt der untersuchten Krankheitsgruppen mit jeweiligem Vergleichswert

Western Blot Proteinwert	AS n=10	DCM n=22	KHK n=7
CnB Me ± 25/75% Perzentile MW ± SEM	1,33 ±0,87/1,5 1,28 ±0,14	1,29 ±0,99/1,5 1,29 ±0,09	0,76 ±0,59/1,05 0,83 ±0,09
Vergleichswert Me ± 25/75% Perzentile MW ± SEM	0,96 ±0,71/1,6 1,15 ±0,18	1,00 ±0,9/1,1 1,05 ±0,06	0,97 ±0,84/1,06 0,99 ±0,06

Dargestellt werden der Median (Me) ±25/75% Perzentilen bzw. Mittelwert (MW) ±Standardfehler (SEM) der Western Blot Ergebnisse. Auf den Blots der DCM-, AS- und KHK-Gruppe wurden die Kontrollherzen mitgeführt. Der Vergleichswert entspricht dem Me (bzw. MW) der auf dem jeweiligen Blot mitgeführten Kontrollgruppe (s. 2.9.5.6).

3.3 Beziehungen zwischen CnB mRNA- und Proteingehalt

Eine mögliche Beziehung zwischen der gemessenen CnB mRNA-Amplifikationsrate und dem Proteingehalt wurde mit Hilfe einer nicht-parametrische Korrelationsanalyse nach Spearman untersucht. Bei Analyse des gesamten Untersuchungskollektivs zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen CnB mRNA- und Proteinexpression. Auch die einzelnen Gruppen waren nicht signifikant miteinander korreliert, so dass im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen kein Zusammenhang zwischen CnB mRNA- und Proteingehalt nachgewiesen werden kann (s. *Tab.10*).

Tab. 10: Korrelationskoeffizienten der CnB mRNA- und Proteinergebnissen

Protein/mRNA	Kontrollen	DCM	AS	KHK
Korrel.- Koeffizient (r)	-0,167	-0,506	0,429	0,322
p	0,69,n.s.	0,27,n.s.	0,34, n.s.	0,07,n.s.

Dargestellt werden Korrelationskoeffizient (r) und Signifikanzniveau (p). Die Werte der ersten Spalte entsprechen der Korrelation von der Kontrollgruppe des DCM-Blots und deren PCR-Ergebnissen. Die Korrelationen der Kontrollgruppen auf den Blots der AS bzw.KHK und deren PCR-Ergebnissen sind ebenfalls n.s. und werden nicht gesondert dargestellt Die Korrelationsanalyse wurde nach Spearman durchgeführt.

3.4 Krankheitsspezifischer Fibrosegehalt

3.4.1 Charakterisierung der Kontrollgruppe

Für die untersuchten Herzen der Kontrollgruppe ergab sich ein Fibrosegehalt von 7,35%. Der Bereich der 25%-igen bis 75%-igen Perzentile reichte von 5,2% bis 8,9% (s. *Abb.14*). Die an den einzelnen Kontrollherzen durchgeführten 4*12 EM unterschieden sich im Mittel um 35% von ihrem MW.

Diese acht Herzen sind ein Teil der Kontrollgruppe aus insgesamt 15 Herzen, die in den Protein und RNA-Messungen als Referenzgruppe dient. Sie wurden ebenfalls durch den Arbeitsbereich der Herzpathologie des DHZB mikroskopisch und makroskopisch befundet und erfüllen folgende Kriterien:

- Fibrosegehalt < 9%
- Herzgewicht < 500g
- Wandstärke < 20mm
- Subjektive Beurteilung: nur geringe bis mittelgradige Hypertrophie
- Subjektive Beurteilung: nur geringe myokardiale Folgeschäden

Die Restgruppe (n = 7) konnte auf Grund fehlender Präparate nicht untersucht und befundet werden. Sie wurde deshalb hinsichtlich ihrer molekularbiologischen Ergebnisse der Hypertrophiemarker ANP und BNP mit den oben aufgeführten, kritisch befundeten, Herzen

verglichen.

Hierbei wurde kein signifikanter Unterschied ($p > 0,005$) bezüglich der ANP und BNP mRNA-Ergebnisse festgestellt. Ohne Hinweise auf eine erhöhte Expressionsregulation der anerkannten Hypertrophiemarker ANP und BNP, wie sie in hypertrophierten, pathologisch veränderten Herzen zu erwarten wäre⁴⁹, wurden alle 15 Herzen in die Kontrollgruppe aufgenommen. Mit ihrer Hilfe konnten die mRNA- und Proteinmessungen der erkrankten Herzen mit Werten näherungsweise gesunder Herzen verglichen werden.

3.4.2 Fibrosegehalt bei DCM

Bei der Quantifizierung der Fibrose im Myokard an DCM erkrankter Herzen ergab sich ein Fibrosegehalt von 14,8%. Der Bereich der 25%-igen bis 75%-igen Perzentile reichte von 10,8% bis 16,6% (*s. Abb.14*). Die 4*12 EM jeweils eines Patientenherzens zeigten im Mittel eine SD von 40% ihres MW. Bezogen auf die Kontrollgruppe entspricht das einem auf 201% signifikant ($p < 0,001$) erhöhten Fibrosegehalt. Gegenüber den an KHK erkrankten Herzen ist der von Fibrose betroffene Flächenanteil auf 138% nicht signifikant ($p > 0,05$) vergrößert.

3.4.3 Fibrosegehalt bei KHK

In der Gruppe der Herzen mit ischämischer Kardiomyopathie nach koronarer Herzerkrankung wurde ein Fibrosegehalt von 10,7% ermittelt. Der Bereich der 25% bis 75%-Perzentile reichte von 8,3% bis 15% (*s. Abb.14*). Die 4*12 EM jeweils eines Patientenherzens weichen im Mittel um 37% von ihrem MW ab. Bezogen auf die Kontrollgruppe ist Fibrosegehalt signifikant ($p < 0,05$) auf 146% erhöht.

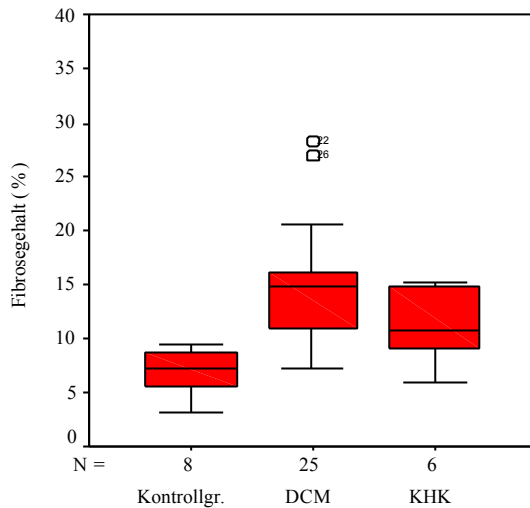


Abb. 14: Gesteigerter prozentualer Gesamtfibrosegehalt der DCM und KHK-Patientengruppen

Fibrosegehalt der Kontrollgruppe = $7,35 \pm 5,2\%/8,9\%$, der DCM-Gruppe = $14,8\% \pm 10,8\%/16,6\%$ und der KHK-Gruppe = $10,7\% \pm 8,3\%/15\%$.

3.5 Beziehung zwischen Fibrosegehalt und Gen-bzw. Proteinregulation

In den Herzen, in denen sowohl der ANP, BNP und CnB mRNA-Gehalt bestimmt als auch die Fibrosequantifizierung durchgeführt worden ist, wurden die Ergebnisse miteinander korreliert. In den untersuchten Herzen war kein signifikanter, linearer Zusammenhang (ANP $r = 0,249$ n.s., BNP $r = 0,315$ n.s.) zwischen Fibroseanteil im Myokard und der Expression von ANP und BNP vorhanden (s. *Abb. 15 und 16*). Ebenso stand die CnB mRNA in keiner Beziehung zu den quantifizierten Fibroseanteilen.

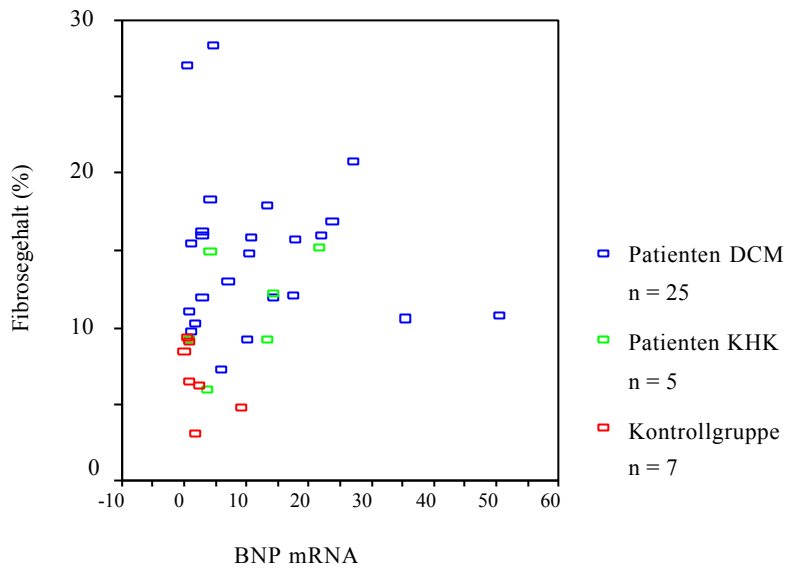


Abb. 15: Fehlende Korrelation BNP mRNA versus Fib.%, $r = 0,315$ n.s.
 Dargestellt sind die Kontrollgruppe und die Patientengruppen mit DCM und KHK

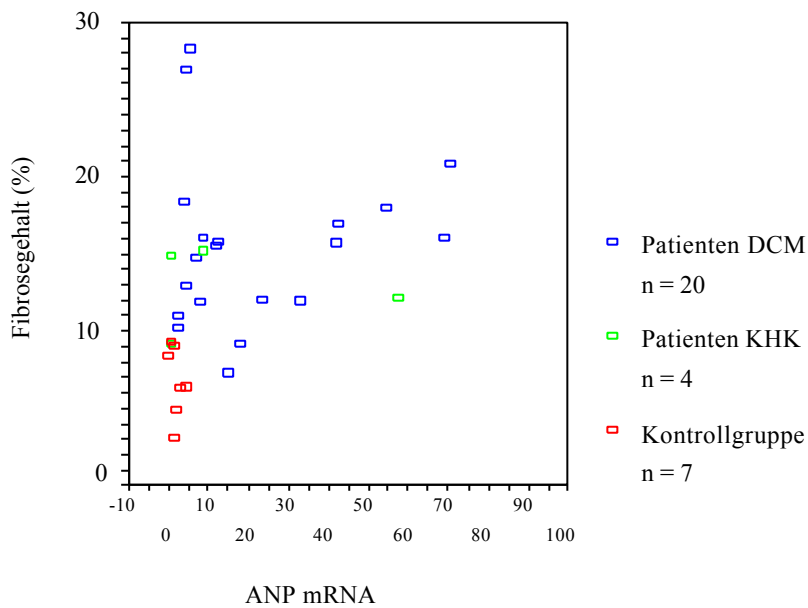


Abb. 16: Fehlende Korrelation ANP mRNA versus Fib.%, $r = 0,249$ n.s.
 Dargestellt sind die Kontrollgruppe und die Patientengruppen mit DCM und KHK

4 Diskussion

4.1 Wichtigste Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der CnB mRNA- und Proteingehalt in linksventrikulären Myokard-proben bzw. -biopsien in hypertrophierten Herzen mit AS, DCM und KHK gegenüber einer Kontrollgruppe verändert ist. Hierzu wurden eine extern standardisierte Real-Time-PCR-Technik und ein etabliertes Western Blot Verfahren angewandt. Als Positivkontrolle für hypertrophiespezifische Expressionsveränderung dienten die parallel gemessenen ANP und BNP mRNA-Anteile derselben Herzen. Darüber hinaus wurden die krankheitsspezifischen Veränderungen des interstitiellen Gewebes der untersuchten Herzen, das heißt der linksventrikuläre Fibroseanteil in DCM, KHK und Kontrollherzen, quantifiziert.

In den hypertrophierten Herzen mit DCM zeigte sich eine signifikante Erhöhung der CnB mRNA auf ca. das Dreifache der Kontrollen (293% des Me der Ko, $p < 0,001$).

Die Herzen mit AS wiesen eine erniedrigte CnB mRNA-Expression (43% des Me der Ko, n.s.) auf, ihr Proteingehalt war gegensätzlich dazu tendenziell erhöht (139% des Me der Ko, n.s.). Im Endstadium einer KHK zeichnete sich weder auf Gen- (79% des Me der Ko, n.s.) noch auf Proteinebene (78% des Me der Ko, n.s.) eine deutliche Veränderung des CnB Gehalts gegenüber dieser Kontrollgruppe ab. Dagegen war der mRNA-Gehalt der Hypertrophiemarkergene ANP und BNP in allen Gruppen der hypertrophierten Herzen signifikant heraufreguliert.

In allen hypertrophierten Herzen wurde, gegenüber der Kontrollgruppe mit einem Fibrosegehalt von 7,35 % $\pm 5,2/8,9$, bei DCM (14,8 % $\pm 10,8/16,8$) und bei KHK (10,7 % $\pm 8,3/15$) ein signifikant erhöhter Fibrosierungsgrad gemessen.

4.2 Regulationsmechanismen der CnR-Aktivität in hypertrophierten Herzen

Im Herzen befindet sich der größte Anteil von CnR im Zytoplasma und in den Mikrosomen der Myozyten. Ebenfalls zytoplasmatisch, also in unmittelbarer Nähe lokalisiert, findet man den Transkriptionsfaktor NFAT_{c3}¹⁹. Kommt es, in kardialen Stressituationen, zu einer vermehrten Freisetzung bestimmter neurohumoraler Faktoren, die hypertrophievermittelnd auf das Myokard einwirken, führen Veränderungen der Calciumhomöostase zu einer Aktivierung von CnR. Es bildet einen Komplex mit NFAT_{c3}, der mit Hilfe der Phospholipidbindungsstelle von CnR in den

Zellkern diffundieren kann²⁰. Hier wird der Transkriptionsfaktor dephosphoryliert und aktiviert die Induktion hypertrophiespezifischer Gene.

Die enzymatische Aktivität von CnR wird in erster Linie durch Konzentrationsanstiege des intrazellulären Calciumgehalts induziert.

Als optimale Bedingung zur Aktivierung von CnR werden langanhaltende Calcium-Konzentrationsanstiege^{27 50} zwischen $1-3 \cdot 10^{-7}$ mol/l beschrieben⁵¹. B. Feng und P. Stemmer⁵² haben mit Enzymaktivitätsmessungen verschiedener Calcineurinmutanten der einzelnen Calciumbindungsstellen einen Bereich von $2 \cdot 10^{-7}$ mol/l bis optimalerweise $2 \cdot 10^{-4}$ mol/l ermittelt, in dem alle Calciumbindungsstellen sowohl von CnB als auch von Calmodulin gesättigt sind. Das Enzym besitzt unter diesen Umständen seine maximale Aktivität. Schnelle Ca-Spikes, wie sie im Ablauf von Kontraktionen im schnellen Skelett- oder Herzmuskel vorkommen, reichen nicht aus, um eine Aktivitätssteigerung zu bewirken. Hingegen stellt langsame, tonisch innervierte Haltemuskulatur mit andauernder intrazellulären Calciumkonzentration um $1-3 \cdot 10^{-7}$ mol/l eine sehr geeignete Umgebung zur Calcineurinaktivierung dar^{51 53}. Kommt es bei der Herzhypertrophie in Folge verschiedener exogener und endogener Stimuli zu einer dauerhaften Beeinflussung der myozytären Calciumhomöostase, wird das sarkoplasmatische Retikulum aufgefüllt und eine permanente Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels verursacht.

Eine Ca^{2+} Bindung hat nur einen geringen, aber signifikanten, direkten Einfluss auf die Aktivität der Phosphatase, während der Haupteffekt indirekt durch Induktion der Calmodulinbindung (s.u.) vermittelt wird. Die beiden C-terminal gelegenen Calciumbindungsstellen von CnB besitzen eine sehr starke Calcium-Affinität ($K_m = 1 \cdot 10^{-7}$ mol/l) und tragen zur Stabilität des aktiven Zentrums bei. Diejenigen am Aminoende des Proteins sind weniger stark calciumaffin ($K_m = 1 \cdot 10^{-6}$ mol/l). Sie vermitteln, nach reversibler Calciumbindung, durch Konformitätsänderung eine vermehrte Calmodulinbindung, die zur Freigabe des autoinhibitorisch geblockten katalytischen Zentrums und somit zur Aktivitätssteigerung führt⁵².

Auf der anderen Seite wird die Enzymaktivität durch Faktoren mit inhibitorischem Einfluss auf CnR gehemmt. Dazu gehören einige endogene Inhibitoren wie z.B. das Ankerprotein AKAP₇₉ oder das Phosphoprotein cain/cabin. Experimentell wurde das in verschiedenen genetischen Inhibitionsmodellen belegt, in denen auf Grund einer Überexpression von AKAP₇₉ bzw. cain die Ausbildung von Hypertrophie blockiert werden konnte. In vitro konnte dies in Rattenmyozyten, die mit rekombinanten Adenoviren infizierte waren, gezeigt werden²⁷. In vivo wurden transgene Mäuse untersucht⁵⁴.

Die bekanntesten CnR Inhibitoren sind allerdings die Immunsuppressiva Cyclosporin A und FK 506, mit Hilfe derer man, durch die Blockade der hypertrophischen Antwort kultivierter Myozyten nach Stimulation durch Angiotensin II (Ang II), auf die bedeutende Rolle von CnR bei der Entstehung der Hypertrophie aufmerksam geworden ist. Cyclosporin A und FK 506 formen mit ihren zugehörigen Bindungsproteinen Cyclophilin bzw. FKBP 12 Komplexe und binden in der autoinhibitorischen Domäne der katalytischen Untereinheit CnA⁵⁵. Hierdurch wird die enzymatische Aktivität der Phosphatase blockiert. Nach diesen Untersuchungen kam schnell die Frage auf, ob CnR möglicherweise ein pharmakologischer Angriffspunkt zur Verhinderung der Ausbildung bzw. des progredienten Verlaufs einer Herzhypertrophie und des konsekutiven Herzversagens sein könnte. In diesem Zusammenhang wurden sehr unterschiedliche Ergebnisse gefunden, so dass sich in der Literatur durchaus kontroverse Meinungen zu der inhibitorischen Funktion von Cyclosporin A und FK 506 auf CnR gebildet haben.

In Tierhypertrophie-Modellen, die durch inappropriete Expression von sarkoplasmatischen Proteinen bei gleichzeitig vermehrter CnR-Aktivität gekennzeichnet sind, konnte die Ausbildung von Hypertrophie durch Cyclosporin A verhindert werden (Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham EN. :24). Auch Meguro et al.³⁰ belegten mit ihren Experimenten einen hypertrophiereduzierenden Effekt, wiesen aber auf eine verstärkte Mortalität der mit Cyclosporin A behandelten Tiere hin. In druckbelasteten Mäusen und Ratten nach aortalem Banding konnte wiederum keine Reduktion der Hypertrophie durch Calcineurininhibition mit Cyclosporin A gezeigt werden^{24 29}. In dieser Studie war auch bei spontan hypertensiven Ratten keine Reduktion der Hypertrophie durch eine Behandlung mit Cyclosporin A nachzuweisen.

Diese Differenzen können auf Variationen in der experimentellen Technik oder der Hypertrophiezeiten zurückzuführen sein. Es muss kritisch berücksichtigt werden, dass die reduzierte CnR Aktivität nach Intervention mit Cyclosporin A zumeist mit der Aktivität einer Kontrollgruppe verglichen wurde, anstatt die CnR Aktivität einer Versuchsgruppe vor und nach Intervention mit Cyclosporin A vergleichend darzustellen. Den oben diskutierten Untersuchungen lagen zumeist Zeitspannen von 2-4 Wochen zu Grunde, in denen die Hypertrophie provoziert und der Inhibitor verabreicht wurde. Nicht berücksichtigt werden dabei Regulationsmechanismen, die bei Patienten gegebenenfalls erst in fortgeschrittenen Krankheitsstadien eingreifen und den CnR Gehalt erhöhen bzw. deren Aktivität effektiv steigern würden. Derartige zeitversetzte Faktoren entziehen sich der experimentellen Blockade durch Cyclosporin A.

Die meisten Arbeitsgruppen, die nach Intervention mit Cyclosporin A keine Reduktion der

Hypertrophie zeigen konnten, detektierten aber eine deutliche Reduktion der CnR Aktivität zum Zeitpunkt des Aktivitätsassay. Sie folgerten daraus, dass die Hypertrophie hauptsächlich einem anderen Regulationsmechanismus unterliegen muss.

Diese Ansätze stellen in Frage, ob CnR nicht ohnehin erst in fortgeschrittenen Hypertrophiestadien eine größere Rolle spielt und in kurzweiligen Tierhypertrophie-Modellen der Schwerpunkt auf anderen Signalkaskaden liegt. Bedeutend sind, neben dem CnR-NFAT_{c3} Weg, die Signalkaskaden der verschiedenen Proteinkinasen wie Protein Kinase C (PKC) und MAPK, die letztendlich auch über Transkriptionsfaktoraktivierung zu einer Induktion hypertrophierelevanter Gene führen. Sie sind durch einen langen Signalweg gekennzeichnet und daher prädestiniert zu Interaktionen mit anderen Signalkaskaden. Bisher kennt man Schnittpunkte mit dem CnR-NFAT_{c3} Mechanismus^{56 57}, es besteht jedoch noch keine experimentelle Klarheit über eine gegenseitige regulatorische Beeinflussung der beiden Signalkaskaden. Es befinden sich z.B. in der ANP Promotorregion die Sequenzen eines AP1 abhängigen cAMP-responsive-Element (CRE) und die von 2 NFAT_{c3} Bindungsstellen in unmittelbarer Nähe. Das CRE-Element bindet cJun/ATF2 Dimere, die in ihrer Aktivität von der MAPK Signalkaskade abhängig sind. Möglicherweise findet hier die Bindung der regulatorischen Faktoren erst nach Komplexbildung statt, was ein Zusammenführen der beiden Signalwege bedeuten würde⁵⁸.

Hinsichtlich dieser unklaren Resultate muss gesagt werden, dass der Regulationsmechanismus von CnR und dessen Interaktionen mit anderen Signalwegen noch nicht vollends aufgeklärt ist und offensichtlich nicht durch den alleinigen Angriffspunkt des Cyclosporin A kontrolliert werden kann. Unter anderem scheint die Pathogenese der Herzhypertrophie entscheidend zu sein, ob die Blockade von CnR komplett ist. In Abhängigkeit der Grunderkrankung gibt es möglicherweise weitere, noch unbekannte, endogene Regulationsmechanismen, die transkriptionell, translationell oder posttranslationell potentiell in den Regulationsablauf der Phosphatase-Aktivität eingreifen. Geht man z.B. von einer signifikanten Regulation über CnB aus, würde diese Komponente nicht vom Cyclosporin A inhibiert werden. Letztlich ist CnR in das komplexe Zusammenspiel vieler Signalkaskaden und Regulationsmechanismen eingebunden, so dass es wegen der multifaktoriellen Interaktion schwierig sein dürfte, hier punktuell zu inhibieren, um in die molekularen Zusammenhänge der Herzhypertrophie zu intervenieren.

Außerdem ist wie bei allen tierexperimentellen Untersuchungen fraglich, ob die Resultate auf den Menschen übertragbar sind und ob die experimentell eingesetzten Dosen in einem für den

humanen Organismus tolerierbaren Bereich liegen. Besonders bei Cyclosporin A muss berücksichtigt werden, dass sein breites Wirkspektrum neben CnR eine Vielzahl von anderen zellulären Molekülen beeinflusst. Kardial werden weitere Effekte auf die Entwicklung der Hypertrophie, unter anderem durch Beeinflussung des Wachstumsfaktors TNF α ^{59 60} und der Calciumfreisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum ^{61 62}, beschrieben. In der Klinik werden die Calcineurininhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus (FK 506) zur Immunsuppressionstherapie nach Organtransplantation eingesetzt. In vielen Fällen entwickelt sich eine Hypertension, die in Folge der häufig vorhandenen steroidalen Nebenwirkungen, aber auch auf Grund direkter myokardialer Effekte entstehen könnte ⁶³. Cyclosporin A inhibiert die Na- K-ATPase, was zu einer Nephrotoxität führen kann, die ebenfalls eine sekundäre Hypertonie zur Folge hat ⁶⁴.

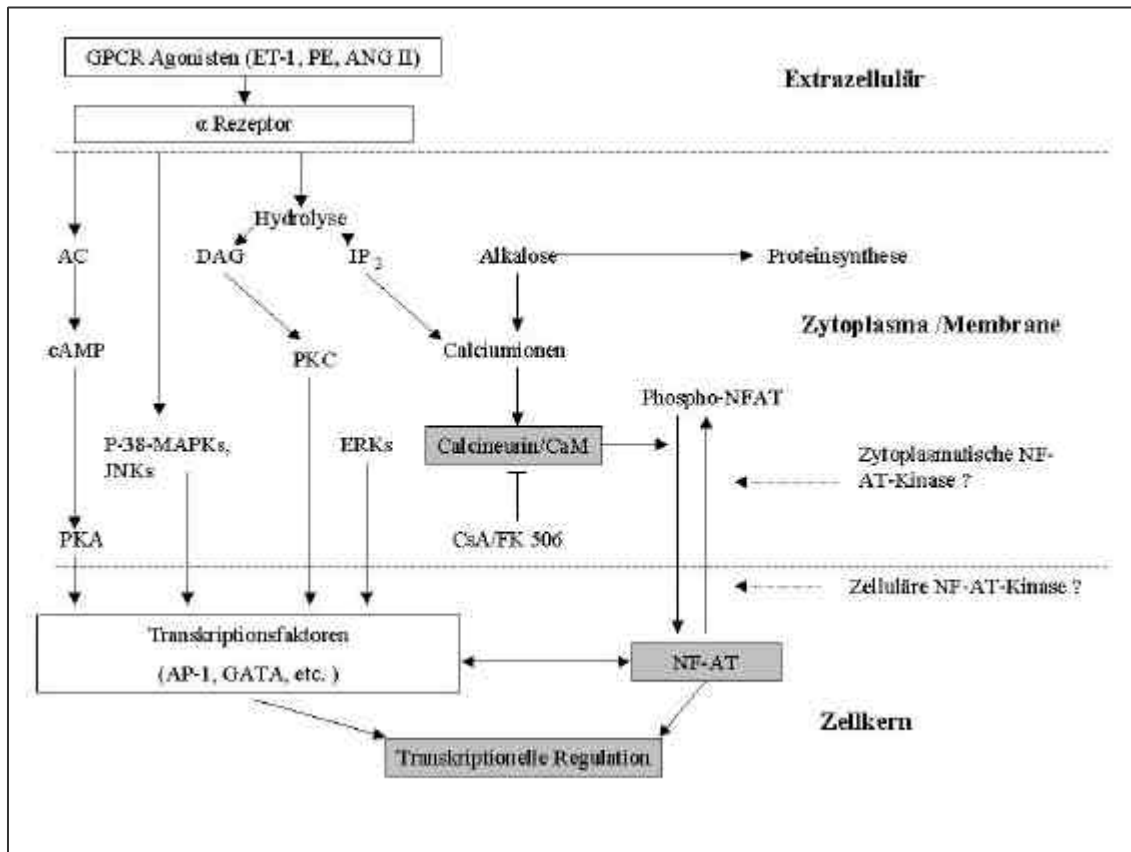


Abb. 17: Hypertrophieinduzierte Signalkaskaden

CnR abhängige Signalkaskade und andere wichtige Transduktionswege extrazellulärer Signale, die bei Hypertrophie zu einer Beeinflussung der Genexpression führen. Abk.: Adenylatcyclase (AC), Angiotensin II (ANG II), Transkriptionsfaktor (AP-1), cyclisches Adenosin-Monophosphat (cAMP), Cyclosporin A (CsA), Diacylglycerin (DAG), Extrazellulär-regulierte Kinase (ERK), Endothlin 1 (ET-1), Tacrolimus (FK 506), Transkriptionsfaktor (GATA), G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR), Inositol-1,4,5-Triphosphatase (IP₃), Janus-Kinase (JNK), Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), Nuclear factor of activated T-cells (NFAT), Phenylephrine (PE), Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC).

4.3 CnB spezifische Genexpressionsregulation und Proteingehalt in hypertrophierten Herzen mit DCM

Bisher publizierte Arbeiten an humanen Herzen bzw. Tiermodellen mit DCM beziehen ihre Untersuchungen vorwiegend auf die katalytische Untereinheit von CnR, auf CnA⁶⁵. Es wird eine verstärkte Aktivität und ein erhöhter CnA Anteil in Herzen mit DCM beschrieben⁶⁶. Da CnB als regulatorische Untereinheit zur Enzymaktivität unbedingt gebraucht wird, ist demnach mit einem erhöhten Bedarf zur maximalen Aufsättigung der vorhandenen CnA- Untereinheiten zu rechnen.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Quantifizierung von CnB in linksventrikulären Myokardproben von explantierten Herzen mit DCM und hat eine statistisch signifikante Erhöhung des CnB mRNA-Gehalts nachgewiesen. Auf Proteinebene war, konform zu der gesteigerten mRNA-Expression, die CnB Konzentration in Herzen mit DCM erhöht. Der Anstieg ist in einem zweiseitigen Test nicht signifikant, wird aber in einem einseitigen Test signifikant. Das Ausbleiben der Signifikanz schon im zweiseitigen Test kann möglicherweise durch die hohe, biologische Varianz der Proben wie Alter, Sex, unterschiedliche Ätiologie der DCM, etc. erklärt werden. Das könnte heißen, dass die Proteinsynthese in Herzen mit DCM gesteigert ist, da nach hypertrophiespezifischen Stimuli ein vermehrtes Angebot an mRNA vorliegt. Entsprechend fanden Diedrichs et al. in humanen Herzen mit DCM, neben einer signifikant erhöhten CnR-Aktivität, ebenfalls einen signifikant erhöhten CnB-Gehalt.

Der erhöhte Anteil an CnB und ein verstärkter intrazellulärer Ca^{++} Einstrom¹² bei Hypertrophie bedeuten für die Phosphatase optimale Bedingungen zur Entfaltung ihrer Enzymaktivität. Das könnte bewirken, dass die CnR abhängige Signalkaskade in Herzen mit DCM bedeutend aktiviert ist und zu einer Induktion hypertrophiespezifischer Gene beiträgt, die zu einer Progression der kardialen Hypertrophie führt.

Die CnB mRNA der an DCM erkrankten Herzen korrelierte nicht mit den mRNA-Werten der Hypertrophie marker gene ANP und BNP. In Tiermodellen, in denen Tenhunen et al.⁶⁷ durch Ventrikeldilatation eine Wandspannung induzierten, wurde auch kein Zusammenhang zwischen CnR und der Expression von BNP beschrieben. Neben den Mechanismen, die für die hypertrophiespezifische Induktion von ANP und BNP verantwortlich sind, scheinen für die Regulation von CnB noch bzw. auch andere Faktoren eine Rolle zu spielen.

Weder die Sequenz der genomischen DNA noch die Genstruktur von CnB sind bisher völlig geklärt, so dass es noch keine Identifikation eines Promotorbereiches mit Hinweisen auf Expressionsregulatoren gibt.

In den an DCM erkrankten Herzen, die in dieser Studie untersucht wurden, konnten keine Zusammenhänge zwischen CnB Proteingehalt und Patientenalter bzw. Herzgewicht gefunden werden. Des Weiteren gab es keine Hinweise auf eine gegenseitige Beeinflussung des CnB Gehalts und bestimmten klinischen Parametern wie Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF%) und Linksventrikulären enddiastolischen Diameter (LVEDD). Der pharmakologische Einfluss der medikamentösen Therapie konnte hierbei nicht berücksichtigt werden. CnB ist demnach kein geeigneter Marker für die Progredienz des Krankheitsverlaufes der DCM.

4.4 CnB spezifische Genexpressionsregulation und Proteingehalt in hypertrophierten Herzen mit ICM nach koronarer Herzerkrankung

In der vorliegenden Arbeit gibt es keinen Anhalt für eine regulatorische post-, transkriptionelle Beeinflussung der kardialen CnB Expression bei Patienten mit ICM nach KHK. Der CnB Gehalt unterscheidet sich, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene, nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Der fehlende Anstieg von CnB und ein fehlender korrelativer Zusammenhang zwischen CnB und ANP bzw. BNP weisen darauf hin, dass CnB bei KHK, im Unterschied zu insuffizienten Herzen mit DCM und AS, eine weniger bedeutende Rolle in der Aktivitätsregulation von CnR spielt. Möglicherweise unterliegt CnR hier einer regulativen Kontrolle durch intrazelluläre Calciumionen oder dem Einfluss noch unbekannter Regulationsmechanismen

Die ICM unterscheidet sich durch ihren Pathomechanismus von den auch untersuchten Hypertrophieformen. Es ist denkbar, dass die CnR abhängige Signalkaskade deshalb bei KHK nicht von Bedeutung ist oder mit anderen Signalwegen interagiert.

4.5 CnB spezifische Genexpressionsregulation und Proteingehalt in hypertrophierten Herzen mit AS

Der CnB mRNA-Gehalt in linksventrikulären Myokardproben von Patienten mit AS war gegenüber einer Kontrollgruppe deutlich erniedrigt, der Proteingehalt hingegen war erhöht. Sowohl für die mRNA- als auch die Proteindaten wäre eine erhebliche Erweiterung der Zahl der Patientenproben nötig, um eine statistische Signifikanz der Werte erreichen zu können. In einer vergleichbaren Studie wurde ebenfalls ein erhöhter Proteingehalt für CnA in einer Patientengruppe mit AS bei normaler EF gezeigt ⁶⁸.

Da die Veränderungen des CnB Gehaltes nicht mit den gesteigerten Proteinexpressionen korrespondieren, wurde nach zwischengeschalteten Regulationsmechanismen gesucht. Durch Sequenzanalysen mittels UTR-Scan ⁶⁹ konnten in der 3`UTR von CnB putative Bindungsstellen für hnRNPE₁ und hnRNPK ⁷⁰ und 10 repetitive Motive für ribosomale Bindungsstellen nachgewiesen werden. Die Regulatorproteine hnRNPE₁ und hnRNPK können durch Bindung an die entsprechenden Motive eine Herauf-oder Herabregulation der Translation induzieren ^{71 72 73}

74

Tatsächlich wurde in Herzen, die infolge einer höhergradigen AS hypertrophiert sind, auch ein

erhöhter Gehalt an hnRNPE₁ und hnRNPK mRNA gefunden⁷⁵. Bei Hypertrophie mit DCM und KHK wurde in derselben Studie diese Veränderung nicht gefunden. Im Kontext mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit könnte das heißen, dass dieser Mechanismus in der Regulation der CnB Genexpression involviert ist. Kommt es in Herzen mit AS zu einer vermehrten Degradation der mRNA oder zu einer Depression der Genexpression, könnte die mRNA im Anschluss einer Translationskontrolle unterliegen, die durch gesteigerte Translationsrate zu einem erhöhten Proteinangebot führen könnte. Für CnR würde das, zu vergleichen mit der Situation bei DCM, ein großes Angebot an CnB und damit optimale Bedingungen für die enzymatische Aktivität bedeuten. In der Literatur sind bisher nur Hinweise auf einen posttranskriptionellen Regulationsmechanismus von der katalytischen Untereinheit CnA, hin zu einer stärkeren Aktivierung, zu finden. Ritter, Hack, Neyses et.al detektierten bei ihren Untersuchungen an humanen Myokardbiopsien, ebenfalls aus Herzen mit AS, zwei CnR Proteinbanden unterschiedlicher Molekulargewichte. Zum Nachweis benutzten sie einen N-Terminus-spezifischen CnA AK und vermuten auf Grund ihrer Ergebnisse eine Proteolyse von CnR am C-terminalen Ende. Diese Modifikation soll in hypertrophen Herzen mit AS zu einer gesteigerten Aktivität der Phosphatase führen. Verantwortlich dafür ist ihrer Meinung nach möglicherweise das Kalpainprotein oder ein erhöhter intrazellulärer Calciumspiegel.

Da auch anhand der durchgeführten Korrelationsanalysen gezeigt wurde, dass die CnB Genexpression unabhängig von den beiden Markergenen ANP und BNP reguliert wird, sind in Herzen mit AS, neben den bekannten hypertrophiespezifischen Signaltransduktionswegen, offensichtlich anderen Regulationsmechanismen involviert.

Diese Befunde weisen darauf hin, dass CnR eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie der hypertrophierten Herzen mit AS zukommt. CnB übernimmt hierbei möglicherweise eine wichtige Regulationsfunktion.

4.6 Remodeling-Hypertrophie und veränderte extrazelluläre Matrix

Bei chronischer Druck-bzw. Volumenbelastung des Herzens kommt es zu spezifischen Umbauvorgängen, die als kardiales Remodeling bezeichnet werden. Der Prozess des ventrikulären Remodelings dauert über Wochen und Monate. Die traditionelle Auffassung von zellulärem Remodeling bei Herzinsuffizienz umfasst eine Degeneration der Myozyten und Verlust an kontraktilen Potential ⁷⁶.

Neben Veränderungen im myozytären Gewebe findet auch ein Remodeling der extrazellulären Matrix (EZM) statt ^{77 78}. Man findet Veränderungen in der Zusammensetzung der EZM, ihres Fibroseanteils und ihres Kollagensubtypenmusters, die Konsequenzen für die Struktur und Funktion des lokalen Gewebes haben ^{79 80 81}.

4.7 Fibrosegehalt der Kontroll- und Patientengruppen

Die untersuchten Herzen mit DCM, AS und KHK sind gekennzeichnet durch einen signifikanten Anstieg der Markergene ANP und BNP. Das ist ein charakteristisches Merkmal für eine ausgeprägte Hypertrophie ^{82 83}. Die klinischen Parameter wie LVEF und LVEDD, die gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt bzw. erhöht waren, belegen ihre insuffiziente Herzleistung. Um zu untersuchen inwieweit die Herzen, einhergehend mit der Hypertrophie, ebenfalls Veränderungen des interstitiellen Gewebes, entsprechend dem extrazellulären Remodeling, aufweisen, wurde der Fibroseanteil von histologischen Präparaten des LV der Kontrollgruppe und den explantierten Patientenherzen mit DCM und KHK gemessen.

Der Fibrosegehalt der einzelnen Herzen wurde mit der mRNA-Expression von CnB und den Hypertrophie markern ANP und BNP korreliert und auf Abhängigkeit untersucht.

Der prozentuale Fibrosegehalt im Herzmuskelgewebe der Kontrollgruppe betrug 7,35% ±5,2/8,9%. Diese Herzen, die uns als Referenzgruppe für die mRNA- und Proteinmessungen dienen, zeigen somit keinen Anhalt für Vorgänge eines Remodelings der EZM.

Die hypertrophierten Herzen der an DCM und KHK erkrankten Patienten wiesen einen signifikant erhöhten Fibroseanteil auf. Es haben somit Vorgänge eines Remodelings der EZM stattgefunden.

Knieriem ⁸⁴ hat schon 1964 darauf hingewiesen, dass es nach relativer Koronarinsuffizienz bei exzentrischer Muskelhypertrophie und Gefügedilatation oder nach primärer Minderversorgung

des Myokardgewebes bei Koronarsklerose zu einer vermehrten interstitiellen und perivaskulären Fibrosierung kommt. Er hat in einer Gruppe gesunder Herzen einen Fibrosegehalt von 9,5% gemessen. Als sogenannter „Kritischer Fibrosegehalt“, bei dem es zu einem Versagen der Herzmuskelkraft kommt, wird in seiner Arbeit ein linksventrikulärer Wert von 15% beschrieben. Nach Vergleich der SD der Einzelmessungen (EM) der einzelnen Herzen von ihrem MW gibt es keinen Anhalt, dass die Veränderung des interstitiellen Gewebes in einem an DCM erkrankten Herzen punktuell in ihrer lokalen Verteilung im Myokard der VW des LV deutlich inhomogener abläuft als in Folge ICM nach KHK oder in nicht pathologisch veränderten Herzen.

Mit der Fragestellung, wie charakteristisch der Fibrosegehalt für bestimmte Myopathien ist und inwieweit er in verschiedenen Herzen bei gleichem Krankheitsstadium variiert, wurden die 25%-75%-igen Perzentilenbereiche der untersuchten Gruppen verglichen. Bei der KHK ist kausal eindeutig die Minderversorgung des Gewebes mit Blut für den Myokardschaden verantwortlich. Möglicherweise führt das Ausmaß des Infarktareals zu Varianzen der pathologisch veränderten Myokardmorphologie. Hingegen ist die DCM eine uniforme Erscheinung eines multifaktoriellen Prozesses, der verschiedene Gründe wie neurohumorale, infektiologische, toxische, genetische und andere Faktoren zu Grunde liegen können. Trotz der unterschiedlichen Pathomechanismen von DCM und KHK zeigte sich aber, dass die Veränderungen des interstitiellen Gewebes im Myokard der an DCM erkrankten Patienten, die sich alle in einem klinischen Stadium entsprechend NYHA 4 befanden, keine signifikant größere Streubreite hatten als in Herzen mit KHK. Entsprechend ist der gemessene Fibrosegehalt quantitativ nicht signifikant unterschiedlich bei den DCM- und KHK-Herzen.

Es gibt keine Hinweise auf einen direkten Einfluss des vermehrten myokardialen Fibrosegehalts durch CnB bzw. ANP und BNP, da kein linearer Zusammenhang zwischen Genexpressionsregulation und myokardialen Fibrosegehalt nachgewiesen werden konnte.

4.8 Limitationen der experimentellen Arbeit und kritische Beurteilung der Methodik

Die vorliegende Arbeit wird limitiert durch eine fehlende CnR Aktivitäts-Messung der untersuchten Herzen, anhand derer man die Bedeutung des CnB Gehalts für die Phosphataseaktivität direkt darstellen könnte. Die Hypothese, dass Konzentrationsunterschiede von CnB Einfluss auf die Aktivität des CnR haben, muss somit anhand der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die CnR-Assays in Herzen mit ähnlichen Krankheitsbildern durchgeführt haben,

diskutierte werden.

In den einzelnen Gruppen mit DCM, AS und KHK hatten alle Patienten vergleichbare Begleitmedikation.

Eine weitere Limitation der Arbeit stellt die Auswahl der Kontrollgruppe dar, bei der es sich um organisch gesunde Spenderherzen nach abgelehnter Herztransplantation handelt. Sie zeigten keine pathologischen Veränderungen in ihrer Funktion und sind nach bestimmten Kriterien als morphologisch gesunde Herzen beurteilt worden. Sie wurden aus logistischen Gründen abgelehnt. Selten gab es andere, nicht-kardiale, Gründe wie zum Beispiel verlängerte Ischämiezeit nach Entnahme oder zu starke Verfettung als Spenderherz.

In der Methodik der vorliegenden Arbeit wurde ein etabliertes Real-Time-PCR Verfahren verwendet. Nach Testung verschiedener Referenzgene wie PDH und ACTB erwies sich das „House-keeping Gen“ GAPDH als stabil und am besten geeignet für die externe Standardisierung. ANP und BNP sind anerkannte Hypertrophie-markergene. Da in der vorliegenden Arbeit dementsprechend die ANP und BNP mRNA in allen untersuchten, hypertrophierten Herzen signifikant angestiegen war, spricht das für eine Validität der externen Standardisierung und eine Spezifität der PCR-Ergebnisse.

Der Western Blot war ein im Labor für den Nachweis anderer Proteine etabliertes Verfahren. Trotz langer Validierung des Verfahrens mit CnB AK und Bemühungen um genaue Ergebnisse blieb die Streuung der Daten relativ hoch.

Bei dem Untersuchungsmaterial handelt es sich um biologische Proben, die nicht sofort untersucht werden, sondern nach Entnahme lange Zeit tiefgefroren werden. Dadurch kann es zu Beeinträchtigung des Myokardgewebes und Dedradation der DNA bzw. Proteine kommen, was infolge die Varianz der Ergebnisse erhöht.

4.9 Zusammenfassung

Calcineurin ist eine cytoplasmatische Calcium-Calmodulin abhängige Serin/Threonin-Phosphatase, die aus der katalytischen Untereinheit CnA und der regulatorischen, calciumsensiblen Untereinheit CnB besteht. Kardial beeinflusst CnR über den Transkriptionsfaktor “Nuclear factor of activated T cells” (NFAT_{c3})⁸⁵ die Genexpression.

CnR besitzt hypertrophievermittelnde Eigenschaften. In verschiedenen Studien wurden eine gesteigerte Aktivität und ein erhöhter CnR-Gehalt bei unterschiedlichen Formen der Hypertrophie gezeigt. Es wird angenommen, dass CnR einen bedeutenden Einfluss auf die Progression des kardialen Remodelings insuffizienter Herzen hat.

Da die Enzymaktivität über die Calciumbindungsstellen vermittelt wird, hängt die Effektivität der CnR Wirkung möglicherweise von dem Gehalt der Untereinheit CnB ab. Basierend auf diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwiefern CnB in der Pathogenese von Herzhypertrophie und interstitieller Fibrosierung menschlicher Herzen eine Rolle spielt.

Dazu wurde der CnB mRNA- und Proteingehalt in hypertrophierten Herzen mit DCM, AS und KHK bestimmt und mit der Expression der Hypertrophiemarker ANP und BNP korreliert.

Zum Vergleich wurden die Untersuchungen parallel in einer Kontrollgruppe gesunder Spenderherzen durchgeführt.

In den Herzen, von denen histologische Präparate zur Verfügung standen, wurde zusätzlich der Gehalt an interstitieller Fibrose gemessen. Als Verfahren dienten eine Real-Time PCR und ein etabliertes Western Blot Verfahren sowie einer, auf Farbsegmentierung beruhender, Fibrosemesseinrichtung.

Gegenüber der Kontrollgruppe zeigte sich in bei DCM eine Erhöhung des CnB Anteils, der in den durchgeführten Untersuchungen nur auf mRNA-Ebene statistisch signifikant war (293% des Me der Ko, $p < 0,001$), auf Proteinebene aber den gleichen Trend zeigte.

Die Herzen mit AS wiesen eine erniedrigte CnB mRNA-Expression (43% des Me der Ko, n.s.) auf, ihr Proteingehalt war gegensätzlich dazu tendenziell erhöht (139% des Me der Ko, n.s.). Als Grundlage dieser Veränderung ist eine translationelle Regulation denkbar. Im Endstadium einer KHK zeichnete sich weder auf Gen- (79% des Me der Ko, n.s.) noch auf Proteinebene (78% des Me der Ko, n.s.) eine deutliche Veränderung des CnB Gehalts gegenüber der Kontrollgruppe ab. CnB steht in keinem Zusammenhang mit den in allen untersuchten Krankheitsgruppen erhöhten Hypertrophiemarkergenen ANP und BNP und unterliegt möglicherweise zusätzlich oder

gänzlich anderen Regulationsmechanismen.

In den hypertrophierten Herzen wurde, gegenüber der Kontrollgruppe mit einem Fibrosegehalt von $6,9 \% \pm 2,2$, bei DCM ($14,78 \% \pm 5,1$) und bei KHK ($11,10 \% \pm 3,6$) ein signifikant erhöhter Fibrosegehalt gemessen. Der mit der Hypertrophie einhergehend gesteigerte Anteil an interstitieller Fibrose zeigte weder mit CnB noch mit ANP bzw. BNP einen korrelativen Zusammenhang.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich CnB betreffend Gen- und Proteinexpression in den verschiedenen Untersuchungsgruppen der hypertrophierten Herzen nicht einheitlich verhält. Es scheint, je nach Ätiologie der Herzhypertrophie bzw. Insuffizienz, von verschiedenen Regulationsmechanismen beeinflusst zu werden. In den Herzen mit DCM führte dies zu einer gesteigerten Genexpression, darüber durch ein größeres Angebot an mRNA zu einer erhöhten Proteinsyntheserate. In den Herzen mit AS deutet eine Diskrepanz zwischen vermindertem mRNA-, aber erhöhtem Proteingehalt, auf eine posttranskriptionelle Regulation hin. Die Lokalisation von putativen Bindungsstellen für hnRNPE₁ und hnRNPK und 10 repetitiven Motiven für das Eisen-Regulierte Protein (IRE) in der 3'UTR von CnB lässt eine Translationskontrolle vermuten, die durch gesteigerte Translationsrate zu einem erhöhten Proteinangebot führen könnte.

Die Bedeutung der ersichtlichen Regulationen von CnB bei DCM und AS für die CnR abhängige Signalkaskade und deren Auswirkung auf das Fortschreiten der Hypertrophie und die Vorgänge des Remodelings bleibt zu überprüfen.

5. Anhang

5.1 Verzeichnis der Abkürzungen, Namen und Erklärungen

A	Ampere
ACTB	Beta-Actin
Ag	Antigen
AK	Antikörper
Ang II	Angiotensin II
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aortenstenose
AS-Gruppe	Patienten mit aortaler Stenose
BCA-Kit	Farbstofflösung Sigma
BNP	Brain natriuretisches Peptid
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CnA	Untereinheit-Calcineurin A
CnB	Untereinheit-Calcineurin B
c-fos	Proto-Onkogen
c-jun	Proto-Onkogen
Cnr	Calcineurin
C _t -Wert	Wert des Treshold Cycle
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DCM-Gruppe	Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Dinukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDVI/ESVI	Enddiastolischer/endsystolischer Volumenindex
EF%	Ejektionsfraktion in Prozent
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
EM	Einzelmessungen
EZM	extrazellulären Matrix

FG	Feuchtgewicht
FK 506	Tacrolimus
Fwd	Forward Primer
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GATA ₄	Transkriptionsfaktor
Ges.Fib.%	Prozentualer Gesamtfibroseanteil
HK-Gen	House-keeping-Gen
hnRNPE	poly(C) binding protein
HRP-Enzym	Horseradish-Peroxidase
Hsp	Hitzeschockprotein
ICM	Ischämische Kardiomyopathie
IRE	Iron responsiv element
JAKs	Janus associated kinase
KBp	Kilobasenpaare
KHK	Koronare Herzerkrankung
KHK-Gruppe	Patienten mit Koronare Insuffizienz
Ko	Kontrollen
Ko-Gruppe	Gruppe der Kontrollherzen
K _m	Max. Bindungsaffinität
LV	Linker Ventrikel
LVEF/RVEF	linksventrikuläre/rechtsventrikuläre Ejektionsfraktion
LVSD/LVDD	linksventrikulärer systolischer/diastolischer Diameter
MAPKs	Mitogen activated protein kinase
Me	Median
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NFAT _{c4}	Nuclear factor of activated T cells
norm./cal	normalisiert/kalibriert
n.s.	nicht signifikant
NS	Nerven-System

OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PIC	Proteaseinhibitoren–Cocktail
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
SD	Standard-Abweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SERKA	Sarkoplasmatische Ca ⁺⁺ -Adenosintriphosphatase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TBS-T Puffer	TRIS buffered Saline-Tween Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	Transforming growth factor
TNFa	Tumor Nekrose Faktor a
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
VW	Vorderwand
V	Volt

5.2 Materialien

Acrylamid (30%)	Roth
Donkey anti-mouse AK	Xanova
APS (10%)	Roth
BCA-Kit; BSA Standard	Pierce
CYBR®GREEN Mastermix	ABI
(10x CYBR® Puffer, Amp-Erase (1U/μl), AmpliTaq Gold™ (5U/μl), dNTPMix (2,5mMdATP, 2,5mM dCTP, 2,5mM dGTP, 2,5mM dUTG und MgCl ₂ (25mM))	
Comassieblue Farblösung	Sigma
DEPC-Lösung 0,1%	autoklaviert selfmade ; Stammlsg. Sigma
DNase	Roche
dNTP, Stocklösung	Promega
DTT	GIBCO BRL
EDTA	Sigma
Eisessig	Roth
Eppis, Tubes, Pistille	Eppendorf
Fwd/Rev. Primer CnB, BNP, ANP, GAPDH	Invitek
Glycerol	Roth
Glycin	Roth
Isopropanol	Roth
KCl	Roth
LUCENT™ HRP-Substratlösung	Chemikon
Methanol	Roth
MgCl ₂	Roth
MnCl ₂ (8mM)	Roth
Monoclonal anti-Calceurin (β-Subunit)	SIGMA
Nonident p-4c	Sigma
PIC (Leupeptin, Aprotinin, Pepstatin)	Sigma
PMFS	Sigma
Random-Hexamer-Primer, Stocklösung	GIBCO BRL

Roti® -Load 1 Proteinauftragspuffer	Roth
RNAasin	Promega
SDS (10%)	Roth
Superscript (200 U/l)	GIBCO BRL
TEMED	Roth
TRIS-Base	Roth
Tris HCl	Roth
Tween	MERK

6. Literatur

- 1 Eichhorn EJ, Bristow MR. Medical therapy can improve the biological properties of the chronically failing heart. A new era in the treatment of heart failure. *Circulation*. 1996 Nov 1; 94 (9):2285-96.
- 2 Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *Engl J Med*. 1990 May 31; 322(22):1561-6.
- 3 Wagoner LE, Walsh RA. The cellular pathophysiology of progression to heart failure. *Curr Opin Cardiol*. 1996 May;11(3):237-44.
- 4 Fuchs M, Drexler H. Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz. *Internist*. 2000; 41: 93-104.
- 5 Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell*. 1993 Dec 3; 75(5): 977-84.
- 6 Miyata S, Haneda T, Osaki J, Kikuchi K. Renin-angiotensin system in stretch-induced hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells. *Eur J Pharmacol*. 1996 Jun 20; 307(1):81-8.
- 7 Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Maemura K, Kurihara H, Aikawa R, Takano ,Yazaki Y. Endothelin-1 is involved in mechanical stress induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol. Chem*. 1996 Feb 9;271(6):3221-8.
- 8 Arai M, Yoguchi A, Iso T, Takahashi T, Imai S, Murata K, Suzuki T. Endothelin-1 and its binding sites are upregulated in pressure overload cardiac hypertrophy. *Am J Physiol*. 1995 May; 268(5 Pt 2):H2084-91.
- 9 Villarreal FJ, Dillmann WH. Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF-beta 1, fibronectin, and collagen. *Am J Physiol*. 1992 Jun; 262(Pt 2): H1861-6.

-
- ¹⁰ Calderone A, Takahashi N, Izzo NJ Jr, Thaik CM, Colucci WS. Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circulation*. 1995 Nov 1; 92(9): 2385-90.
- ¹¹ Sernerri GG, Modesti PA, Boddi M, Cecioni I, Panizza R, Coppo M, Galanti G, Simonetti I, Vanni S, Papa L, Bandinelli B, Migliorini A, Modesti A, Maccherini M, Sani G, Toscano M. Cardiac growth factors in human hypertrophy. Relations with myocardial contractility and wall stress. *Circ Res*. 1999 Jul 9; 85(1):57-67.
- ¹² Ruwhof C, van der Laarse A. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res*. 2000 Jul; 47(1):23-37.
- ¹³ Hasenfuss G. Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc. Res*. 1998 Feb; 37:279-289
- ¹⁴ Mercadier JJ, Lompre AM, Duc P, Boheler KR, Fraysse JB, Wisnewsky C, Allen PD, Komajda M, Schwartz K. Altered sarcoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. *J Clin Invest*. 1990 Jan;85(1):305-9.
- ¹⁵ Molkenin JD. Calcineurin and beyond: cardiac hypertrophic signaling. *Circ Res*. 2000 Oct 27; 87(9):731-8.
- ¹⁶ Mukerjee N, McGinnis KM, Gnegy ME, Wang KK. Caspase-mediated calcineurin activation contributes to IL-2 release during T cell activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Aug 3; 285(5):1192-9.
- ¹⁷ Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM, Wu H, Zhu W, Bassel-DubyR, WilliamsRS. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev*. 1998 Aug 15; 12(16):2499-509.
- ¹⁸ Spangenburg EE, Williams JH, Roy RR, Talmadge RJ. Skeletal muscle calcineurin: influence of phenotype adaptation and atrophy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001 Apr; 280(4):R1256-60.

-
- ¹⁹ Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol.* 1997; 15: 707-47.
- ²⁰ Shibasaki F, Price ER, Milan D, McKeon F. Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature.* 1996 Jul 25; 382(6589):370-3.
- ²¹ Molkenin JD. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem.* 2000 Dec 15; 275(50):38949-52.
- ²² Luo C, Shaw KT, Raghavan A, Aramburu J, Garcia-Cozar F, Perrino BA, Hogan PG, Rao A. Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Aug 20; 93(17):8907-12.
- ²³ Zou Y, Hiroi Y, Uozumi H, Takimoto E, Toko H, Zhu W, Kudoh S, Mizukami M, Shimoyama M, Shibasaki F, Nagai R, Yazaki Y, Komuro I. Calcineurin plays a critical role in the development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Circulation.* 2001 Jul 3; 104(1):97-101.
- ²⁴ Molkenin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell.* 1998 Apr 17; 93(2):215-28.
- ²⁵ Shimoyama M, Hayashi D, Takimoto E, Zou Y, Oka T, Uozumi H, Kudoh S, Shibasaki F, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. Calcineurin plays a critical role in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Circulation.* 1999 Dec 14; 100(24):2449-54.
- ²⁶ Lim HW, De Windt LJ, Steinberg L, Taigen T, Witt SA, Kimball TR, Molkenin JD. Calcineurin expression, activation, and function in cardiac pressure-overload hypertrophy. *Circulation.* 2000;101(20):2431-7.
- ²⁷ Taigen T, De Windt LJ, Lim HW, Molkenin JD. Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000 Feb 1; 97(3):1196-201.
- ²⁸ Goldspink, PH, Mc Kinney, RD, Kimball, VA, Geenen, DL et al. Angiotensin II induced cardiac hypertrophy in vivo is inhibited by cyclosporin A in adult rats. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2001; 226, 83-88

-
- ²⁹ Zhang W, Kowal RC, Rusnak F, Sikkink RA, Olson EN, Victor RG. Failure of calcineurin inhibitors to prevent pressure-overload left ventricular hypertrophy in rats. *Circ Res.* 1999 Apr 2; 84(6):722-8.
- ³⁰ Meguro T, Hong C, Asai K, Takagi G, McKinsey TA, Olson EN, Vatner SF. Cyclosporine attenuates pressure-overload hypertrophy in mice while enhancing susceptibility to decompensation and heart failure. *Circ Res.* 1999 Apr 2; 84(6):735-40.
- ³¹ Ding B, Price RL, Borg TK, Weinberg EO, Halloran PF, Lorell BH. Pressure overload induces severe hypertrophy in mice treated with cyclosporine, an inhibitor of calcineurin. *Circ Res.* 1999 Apr 2; 84(6):729-34.
- ³² Milan D, Griffith J, Su M, Price ER, McKeon F. The latch region of calcineurin B is involved in both immunosuppressant-immunophilin complex docking and phosphatase activation. *Cell.* 1994 Nov 4; 79(3):437-47.
- ³³ Guerini D. Calcineurin: not just a simple protein phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Jun 18; 235(2):271-5.
- ³⁴ Wang MG, Yi H, Guerini D, Klee CB, Mc Bride OW. Calcineurin A alpha (PPP3CA), calcineurin A beta (PPP3CB) and calcineurin B (PPP3R1) are located on human chromosomes 4, 10q21-->q22 and 2p16-->p15 respectively. *Cytogenet Cell.Genet.* 1996 ; 72 : 236-241.
- ³⁵ Chang CD, Mukai H, Kuno T, Tanaka C. cDNA cloning of an alternatively spliced isoform of the regulatory subunit of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin B alpha 2). *Biochim Biophys Acta.* 1994 Mar 1; 1217(2):174-80.
- ³⁶ Mukai H, Chang CD, Tanaka H, Ito A, Kuno T, Tanaka C. cDNA cloning of a novel testis-specific calcineurin B-like protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991 Sep 30; 179(3):1325-30.
- ³⁷ Liu L, Zhang J, Yuan J, Dang Y, Yang C, Chen X, Xu J, Yu L. Characterization of a human regulatory subunit of protein phosphatase 3 gene (PPP3RL) expressed specifically in testis. *Mol Biol Rep.* 2005 Mar; 32(1):41-5.

-
- ³⁸ Ueki K, Kincaid RL. Interchangeable associations of Calcineurin regulatory subunit isoforms with mammalian and fungal catalytic subunits. *J Biol Chem.* 1993 Mar 25;268(9):6554-9.
- ³⁹ Goto S, Nagahiro S, Ushio Y, Hirano A. Calcineurin, a calcium/calmodulin-regulated protein phosphatase, in mammalian neuroendocrine cells and neoplasms. *Neurosci Lett.* 1992 Aug 31; 143(1-2):51-4.
- ⁴⁰ Nakayama S, Kretsinger RH. Evolution of the EF-hand family of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1994; 23:473-507.
- ⁴¹ Kawasaki H, Kretsinger RH. Calcium-binding proteins 1: EF-hands. *Protein Profile.* 1995; 2(4):297-490.
- ⁴² Rusnak F, Mertz P. Calcineurin: form and function. *Physiol Rev.* 2000 Oct; 80(4):1483-521.
- ⁴³ Stemmer P.M., Klee CB. Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. *Biochemistry.* 1994 Jun 7; 33 (22): 6859-66.
- ⁴⁴ Kennedy MT, Brockman H, Rusnak F. Contributions of myristoylation to calcineurin structure/function. *J Biol Chem.* 1996 Oct 25;271(43):26517-21.
- ⁴⁵ Nagata K, Somura F, Obata K, Odashima M, Izawa H, Ichihara S, Nagasaka T, Iwase M, Yamada Y, Nakashima N, Yokota M. AT1 receptor blockade reduces cardiac calcineurin activity in hypertensive rats. *Hypertension.* 2002 Aug; 40(2):168-74.
- ⁴⁶ Takeda Y, Yoneda T, Demura M, Usukura M, Mabuchi H. Calcineurin inhibition attenuates mineralocorticoid-induced cardiac hypertrophy. *Circulation.* 2002 Feb 12; 105(6):677-9.
- ⁴⁷ Li J, Wang J, Russell FD, Molenaar P. Activation of calcineurin in human failing heart ventricle by endothelin 1, angiotensin II and urotensin II. *Br J Pharmacol.* 2005 Jun;145(4):432-40.
- ⁴⁸ Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature.* 1997 Apr 24;386(6627):855-8. Erratum in: *Nature* 1997 Jul 17; 388(6639):308.

-
- ⁴⁹ Langenickel T, Pagel I, Höhnel K, Dietz R, Willenbrock R. Differential regulation of cardiac ANP and BNP mRNA in different stages of experimental heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 May; 278(5):H1500-H1506
- ⁵⁰ Timmerman LA, Clipstone NA, Ho SN, Northrop JP, Crabtree GR. Rapid shutting of NF-AT in discrimination of Ca sup 2+ signals and immunosuppression. *Nature*. 1996 Oct 31; 383(6603):837-840.
- ⁵¹ Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM, Wu H, Zhu W, Bassel-Duby R, Williams RS. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev*. 1998 Aug 15; 12(16):2499-509
- ⁵² Feng B, Stemmer PM. Ca²⁺ binding site 2 in calcineurin-B modulates calmodulin-dependent calcineurin phosphatase activity. *Biochemistry*. 2001 Jul 31; 40(30):8808-14.
- ⁵³ Chin ER, Allen DG. Changes in intracellular free Ca²⁺ concentration during constant 10 Hz stimulation of mouse single skeletal muscle fibres. *Physiologist*. 1996; 39: A-75.
- ⁵⁴ De Windt, L.J, Lim, HW, Bueno, OF., Liang, Q, Braz, JC, Molkentin, JD. Target inhibition of Calcineurin attenuates cardiac hypertrophy in vivo. *Proceeding of the national Academy of Sciences of the USA*. 2001; 98 : 3322-3327.
- ⁵⁵ Parsons JN, Wiederrecht GJ, Salowe S, Burbaum JJ, Rokosz LL, Kincaid RL, O'Keefe SJ. Regulation of calcineurin phosphatase activity and interaction with the FK-506.FK-506 binding protein complex. *J Biol Chem*. 1994 Jul 29; 269(30):19610-6.
- ⁵⁶ Chen L, Glover JNM, Hogan PG, Rao A, Harrison SC. Structure of the DNA binding domains of NFAT, Fos, and Jun bound specifically to DNA. *Nature*. 1998 ; 392, 42-48.
- ⁵⁷ De Windt L.J., Lim H.W., Haq S., Force T, Molkentin JD. Calcineurin promotes protein kinase C and c-Jun NH2-terminal kinase activation in the heart. Cross-talk between cardiac hypertrophic signaling pathways. *J Biol Chem*. 2000 May 5; 275(18):13571-9.

-
- ⁵⁸ Sugden PH. Signaling in myocardial hypertrophy: life after calcineurin? *Circ Res.* 1999 Apr 2; 84(6):633-46.
- ⁵⁹ Wiederrecht G, Lam E, Hung S, Martin M, Sigal N. The mechanism of action of FK-506 and cyclosporin A. *Ann N Y Acad Sci.* 1993 Nov 30;696:9-19.
- ⁶⁰ Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, Asano T, Morimoto K, Lagman M, Shimbo T, Suthanthiran M. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature.* 1999 Feb 11; 397(6719):530-4.
- ⁶¹ Janssen PM, Zeitz O, Keweloh B, Siegel U, Maier LS, Barckhausen P, Pieske B, Prestle J, Lehnart SE, Hasenfuss G. Influence of cyclosporine A on contractile function, calcium handling, and energetics in isolated human and rabbit myocardium. *Cardiovasc Res.* 2000 Jul;47(1):99-107.
- ⁶² Park KS, Kim TK, Kim DH. Cyclosporin A treatment alters characteristics of Ca²⁺-release channel in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol.* 1999 Mar;276(3 Pt 2):H865-72.
- ⁶³ Curtis JJ. Hypertensinogenic mechanism of the calcineurin inhibitors. *Curr Hypertens Rep.* 2002 Oct ; 4(5):377-80.
- ⁶⁴ Klee CB, Ren H, Wang X. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem.* 1998 May 29;273(22):13367-70.
- ⁶⁵ Mitsuhashi S, Saito N, Watano K, Igarashi K, Tagami S, Shima H, Kikuchi K. Defect of delta-sarcoglycan gene is responsible for development of dilated cardiomyopathy of a novel hamster strain, J2N-k: calcineurin/PP2B activity in the heart of J2N-k hamster. *J Biochem (Tokyo).* 2003 Aug;134(2):269-76.
- ⁶⁶ Munch G, Bolck B, Karczewski P, Schwinger RH. Evidence for calcineurin-mediated regulation of SERCA 2a activity in human myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2002 Mar; 34(3):321-34.
- ⁶⁷ Tenhunen O, Szokodi I, Ruskoaho H. Posttranscriptional activation of BNP gene expression in response to increased left ventricular wall stress: role of calcineurin and PKC. *Regul Pept.* 2005 Jun 30;128(3):187-96.

-
- ⁶⁸ Ritter O, Hack S, Schuh K, Rothlein N, Perrot A, Osterziel KJ, Schulte HD, Neyses L. Calcineurin in human heart hypertrophy. *Circulation*. 2002 May 14; 105(19):2265-9.
- ⁶⁹ Pesole G, Liuni S, Grillo G, Saccone C. UTRdb: a specialized database of 5'- and 3'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res*. 1998 Jan 1;26(1):192-5.
- ⁷⁰ Siomi H, Matunis MJ, Michael WM, Dreyfuss G. The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res*. 1993 Mar 11;21(5):1193 -8.
- ⁷¹ Chkheidze, A. N., Lyakhov, D. L., Makeyev, A. V., Morales, J., Kong, J., Liebhaber, S. A. Assembly of the α -Globin mRNA stability complex reflects binary interaction between the Pyrimidine-rich 3'untranslated region determinant and poly (C) binding protein aCP. *Mol. Cell. Biol*. 1999 July; 19(7):4572-4581.
- ⁷² Skalweit A, Doller A, Huth A, Kahne T, Persson PB, Thiele BJ. Posttranscriptional control of renin synthesis: identification of proteins interacting with renin mRNA 3'-untranslated region. *Circ Res*. 2003 Mar 7;92(4):419-27.
- ⁷³ Reimann I, Huth A, Thiele H, Thiele BJ. Suppression of 15-lipoxygenase synthesis by hnRNP E1 is dependent on repetitive nature of LOX mRNA 3'-UTR control element DICE. *J Mol Biol*. 2002 Feb 1; 315(5):965-74.
- ⁷⁴ Holcik M, Liebhaber SA. Four highly stable eukaryotic mRNAs assemble 3' untranslated region RNA-protein complexes sharing cis and trans components. *Proc. Natl Acad Sci U S A*. 1997 Mar 18;94(6):2410-4.
- ⁷⁵ Thiele BJ, Doller A, Kahne T, Pregla R, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. RNA-binding proteins heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, E1, K are involved in post-transcriptional control of collagen I and III synthesis. *Circ Res*. 2004 Nov 26;95(11):1058-66.
- ⁷⁶ Maron BJ, Ferrans VJ, Roberts WC. Ultrastructural features of degenerated cardiac muscle cells in patients with cardiac hypertrophy. *Am J Pathol*. 1975 Jun;79(3):387-434.
- ⁷⁷ Hess OM, Ritter M, Schneider J, Grimm J, Turina M, Krayenbuehl HP. Diastolic stiffness and

myocardial structure in aortic valve disease before and after valve replacement. *Circulation*. 1984 May;69(5):855-65.

⁷⁸ Eghbali M, Tomek R, Woods C, Bhambi B. Cardiac fibroblasts are predisposed to convert into myocyte phenotype: specific effect of transforming growth factor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Feb 1;88(3):795-9. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Apr 15;88(8):3510.

⁷⁹ Fielitz J, Leuschner M, Zurbrugg HR, Hannack B, Pregla R, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors in the left ventricular myocardium of patients with aortic stenosis. *J Mol Med*. 2004 Dec;82(12):809-20.

⁸⁰ Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, Doerner A, Poller W, Schwimmbeck PL, Kuhl U, Schultheiss HP. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation*. 1999 Jun 1;99(21):2750-6.

⁸¹ Piper C, Schultheiss HP, Akdemir D, Rudolf J, Horstkotte D, Pauschinger M. Remodeling of the cardiac extracellular matrix differs between volume- and pressure-overloaded ventricles and is specific for each heart valve lesion. *J Heart Valve Dis*. 2003 Sep;12(5):592-600.

⁸² Kawakami H, Okayama H, Hamada M, Hiwada K. Alteration of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide gene expression associated with progression and regression of cardiac hypertrophy in renovascular hypertensive rats. *Clin Sci (Lond)*. 1996 Mar;90(3):197-204.

⁸³ Luchner A, Stevens TL, Borgeson DD, Redfield M, Wei CM, Porter JG, Burnett JC Jr. Differential atrial and ventricular expression of myocardial BNP during evolution of heart failure. *Am J Physiol*. 1998 May;274(5 Pt 2):H1684-9.

⁸⁴ Knierem, H.J. Über den Bindegewebsgehalt des Herzmuskels des Menschen. *Archiv für Kreislaufforschung*. 1964 ; 44 : 231-259.