

Aus dem Institut für  
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. H.-J. Gabius

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Prof. Dr. C. A. Deeg

# Identifikation von sechs potenziellen Autoantigenen bei Hunden mit dilatativer Kardiomyopathie

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Barbara Christina Buse  
aus  
Bad Segeberg

München 2007

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Referent: Jun. Prof. Dr. Deeg

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Poulsen Nautrup  
Univ.-Prof. Dr. Köstlin  
Univ.-Prof. Dr. Pfister  
Univ.-Prof. Dr. Wanke

Tag der Promotion: 20.Juli 2007

**Meinen Eltern**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>Definition und Bedeutung der dilatativen Kardiomyopathie (DCM).....</b>	<b>9</b>
<b>2.2</b>	<b>Klinisches Bild der DCM.....</b>	<b>9</b>
<b>2.3</b>	<b>Ätiologie der DCM .....</b>	<b>10</b>
2.3.1	Ätiologie der DCM bei Menschen .....	10
2.3.1.1	Virale Infektionen als Ursache .....	10
2.3.1.2	Genmutationen.....	11
2.3.1.3	Toxine.....	12
2.3.1.4	Autoimmunität .....	12
2.3.2	Ätiologie der DCM beim Hund.....	15
2.3.2.1	Ernährungsbedingte Ursachen .....	15
2.3.2.2	Virale Ursachen.....	16
2.3.2.3	Toxine.....	16
2.3.2.4	Genmutationen.....	16
2.3.2.5	Autoimmunität .....	17
<b>2.4</b>	<b>Pathogenese der autoimmunen DCM.....</b>	<b>17</b>
2.4.1	Pathogenität der Autoantikörper .....	18
2.4.2	Rolle von T-Zellen in der DCM.....	19
2.4.3	Pathohistologie der caninen DCM .....	20
2.4.4	Pathohistologie der humanen DCM .....	21
<b>2.5</b>	<b>Zweidimensionales Western Blotting.....</b>	<b>21</b>
2.5.1	Zweidimensionale Auftrennung des Proteoms mit 2D Gelelektrophorese .....	21
2.5.2	Identifikation von Autoantigenen mit 2D Western Blots .....	22
2.5.3	Massenspektrometrische Identifikation von Proteinen .....	23
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1</b>	<b>Probenmaterial .....</b>	<b>25</b>
3.1.1	Serumgewinnung .....	26
3.1.2	Antigenpräparationen.....	26
<b>3.2</b>	<b>Puffer und Lösungen .....</b>	<b>27</b>
3.2.1	Puffer.....	27
3.2.2	Puffer und Lösungen für die zweidimensionale Gelelektrophorese .....	27
3.2.3	Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	28

<b>3.3</b>	<b>Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Antigenpräparationen .....</b>	<b>31</b>
<b>3.4</b>	<b>Zweidimensionale Gelelektrophorese.....</b>	<b>32</b>
3.4.1	Rehydratisierung der Proben .....	32
3.4.2	Isoelektrische Fokussierung.....	32
3.4.3	Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele für die 2. Dimension.....	33
3.4.4	Äquilibration und 2. Dimension .....	34
3.4.5	Färbung der Gele .....	35
3.4.5.1	Silberfärbung.....	35
3.4.6	Western Blot.....	36
3.4.7	Immunblot.....	36
3.4.8	Kolloidale Goldfärbung.....	37
<b>3.5</b>	<b>Eindimensionale Gelelektrophorese .....</b>	<b>38</b>
3.5.1	Durchführung der Elektrophorese mit selbst hergestellten Gelen .....	38
3.5.2	Durchführung der Elektrophorese mit Fertiggelele .....	39
3.5.3	Kolloidale Coomassiefärbung .....	39
3.5.4	Ponceau-Färbung der geblotteten Membranen .....	40
3.5.5	Immunblot.....	40
<b>3.6</b>	<b>Massenspektrometrische Identifikation von Proteinen.....</b>	<b>41</b>
3.6.1	Entfärben und Verdauen der Proteinspots.....	41
3.6.2	Massenanalyse .....	42
3.6.3	Datenbanksuche .....	43
<b>3.7</b>	<b>Densitometrische Bildanalyse der eindimensionalen Immunoblots .....</b>	<b>44</b>
<b>3.8</b>	<b>Statistische Auswertung der Autoantikörperprävalenz .....</b>	<b>44</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>46</b>
<b>4.1</b>	<b>Zweidimensionale Auftrennung von Vorhof- und Herzkammerproteom als Autoantigenquelle .....</b>	<b>46</b>
<b>4.2</b>	<b>Bindungsmuster von Autoantikörpern der an DCM erkrankten Hunde auf zweidimensional aufgetrennten Herzgewebeproteomen .....</b>	<b>48</b>
<b>4.3</b>	<b>Bindungsmuster von Autoantikörpern der an DCM erkrankten Hunde auf eindimensional aufgetrenntem Herzgewebeextrakt .....</b>	<b>52</b>
<b>4.4</b>	<b>Massenspektrometrische Identifikation der potenziellen DCM-Antigene .....</b>	<b>53</b>
<b>4.5</b>	<b>Generelle Antikörperbindungsmuster von an DCM erkrankten und gesunden Tieren ..</b>	<b>55</b>

<b>4.6</b>	<b>Massenspektrometrische Identifikation der regelmäßig von beiden Gruppen gebundenen Proteine</b> .....	<b>56</b>
<b>4.7</b>	<b>Validierung der potenziellen Autoantigene</b> .....	<b>57</b>
<b>4.8</b>	<b>Herzmyosin</b> .....	<b>58</b>
4.8.1	Eindimensionale Western Blots auf gereinigtem Herzmyosin .....	58
4.8.2	Massenspektrometrische Identifikation der markierten Banden .....	61
<b>4.9</b>	<b>Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)</b> .....	<b>62</b>
4.9.1	Eindimensionale Western Blots auf gereinigter GAPDH .....	62
4.9.2	Massenspektrometrische Identifikation der markierten Bande .....	64
<b>4.10</b>	<b>Glycogen Phosphorylase, brain form (GPBB)</b> .....	<b>65</b>
4.10.1	Eindimensionale Western Blots auf gereinigter GPBB.....	65
<b>4.11</b>	<b>Cardiac Actin</b> .....	<b>68</b>
4.11.1	Eindimensionale Western Blots auf gereinigtem cardiac Actin .....	68
4.11.2	Massenspektrometrische Identifikation der markierten Banden.....	72
<b>4.12</b>	<b>Aconitase</b> .....	<b>73</b>
4.12.1	Eindimensionale Western Blots auf gereinigter Aconitase.....	73
4.12.2	Massenspektrometrische Identifikation der markierten Banden.....	76
<b>4.13</b>	<b>Desmin</b> .....	<b>77</b>
4.13.1	Eindimensionale Western Blots auf gereinigtem Desmin.....	77
4.13.2	Massenspektrometrische Identifikation der markierten Bande.....	79
<b>4.14</b>	<b>Häufigkeit der autoantikörperpositiven Tiere</b> .....	<b>79</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>81</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>102</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>103</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>112</b>

μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
Abb.	Abbildung
ACTC	Cardiac Actin Gen
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CC2	C-Protein Bruchstück 2
CC2P12	Peptid 12 des CC2
CD3	Cluster of differentiation 3, Erkennungsmolekül an der Oberfläche von T-Lymphozyten
CD4	Cluster of differentiation 4, Erkennungsmolekül an der Oberfläche von T-Helferzellen
CD8	Cluster of differentiation 8, Erkennungsmolekül an der Oberfläche von zytotoxischen T-Zellen
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
cMvBP	Myosin bindendes Protein C
cTNI	Cardiac Troponin, I-Untereinheit
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
dpi	dots per inch, Bildpunkte pro Zoll
DTT	Dithiothreitol
EAC	Experimentelle autoimmune Myokarditis
ECL	Enhanced chemiluminescence, verstärkte Chemilumineszens
EKG	Elektrokardiographie
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ERU	Equine rezidivierende Uveitis
g	Gramm
GAD65	Glutamat Dekarboxylase 65 kDa

GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPBB	Glycogen Phosphorylase, brain form
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
Hsp	Hitze-Schock Protein
ID	Identifikationsnummer
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
kDa	Kilodalton
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVIDd	Linksventrikulärer Innendurchmesser in der Diastole
LVIDs	Linksventrikulärer Innendurchmesser in der Systole
M	Molar
mA	Milliampere
MALDI	Matrix assisted laser desorption/ionisation, Matrix unterstützte Laserdesorption/Ionisation
Maldi MS/MS	Matrix assistierte Laserdesorptions/Ionisations Tandem-Massenspektrometrie
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MS	Multiple Sklerose
MW	Molekulargewicht
MYH7	Schwere Kette des beta-Myosins
MYL4	Myosin light chain 4
n.s.	Nicht signifikant
ng	Nanogramm
PBS	Phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBS-T	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Tween



PCNA	Kern-Antigen proliferierender Zellen
PCR	Polymerase chain reaction
PD-1 defizient	programmed cell death–1 immuninhibitory coreceptor-defizient
pI	Isoelektrischer Punkt
PMF	Peptide mass fingerprinting
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SCID	Severe combined immunodeficiency
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
Tab.	Tabelle
TCR $\alpha\beta$	T-Zell-Rezeptor alpha beta
TEMED	NNNN'-Tetra-methylethylendiamin
TnC	Troponin, C-Untereinheit
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TnI	Troponin, I-Untereinheit
TnT	Troponin, T-Untereinheit
TOF	Time of flight, Flugzeit
TPM1	Alpha-Tropomyosin 1
V	Volt
vs.	versus
z.B.	Zum Beispiel

## 1 Einleitung

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist eine der häufigsten Ursachen für ein schweres Herzversagen beim Hund, das sehr schnell zum Tod führt. Die DCM ist charakterisiert durch die Dilatation und beeinträchtigte Kontraktilität des linken oder beider Ventrikel. Besonders häufig betroffen sind mittelgroße und große Hunderassen (Irischer Wolfshund, Dogge, Dobermann, Neufundländer, Bernhardiner).

Beim Menschen ist die DCM die Hauptursache für eine Herztransplantation. Auch in der Humanmedizin ist die Prognose für ein langes Überleben nach der Diagnosestellung ungünstig. So stirbt die Hälfte der DCM-diagnostizierten Patienten innerhalb von fünf Jahren nach der Diagnosestellung, wenn noch keine Transplantation vorgenommen wurde.

Trotz zahlreicher Untersuchungen sind die Ätiologie und die Pathogenese dieser Erkrankung in vielen Fällen bisher nur unvollständig geklärt. Unter anderem werden genetische, ernährungsbedingte, infektiöse oder toxinbedingte Ursachen diskutiert. Eine weitere Hypothese ist, dass es sich um eine Autoimmunerkrankung handelt. In der humanen DCM gibt es deutliche Hinweise auf autoaggressive Reaktionen gegen mehrere Autoantigene. Ungefähr 30% der humanen DCM-Patienten weisen Autoantikörper auf. So konnten Autoantikörper gegen sarkolemmale Proteine, mitochondriale Proteine, Hitze-Schock-Proteine und gegen Oberflächenrezeptoren identifiziert werden (Okazaki und Honjo 2005). Zum Teil konnte auch bereits eine direkte cardiopathische Wirkung einiger Autoantikörper bewiesen werden. Bei der caninen DCM gibt es bisher nur zwei Studien, die sich mit einer autoimmunen Pathogenese beschäftigten. Während in einer Studie keine Unterschiede in der Autoantikörperbindungshäufigkeit zwischen an DCM erkrankten Hunden und herzgesunden Kontrollhunden festgestellt werden konnten, konnte in einer anderen Studie eine signifikant höhere Autoantikörperbindungshäufigkeit von DCM-Hunden gegenüber gesunden Kontrollhunden festgestellt werden. Die hier auffälligen mitochondrialen Autoantigene wurden jedoch weder exakt identifiziert noch weiter charakterisiert.

Eine geeignete Methode, Autoantigene nachzuweisen ist die Auftrennung des entsprechenden Proteoms mit zweidimensionaler Gelelektrophorese und die anschließende Durchführung von Western Blots (Deeg et al. 2006). Dabei wird das

Proteom auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit den im Serum befindlichen Autoantikörpern inkubiert. Die Identifikation der Kandidaten erfolgt anschließend massenspektrometrisch.

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der zweidimensionalen Western Blots potenzielle Autoantigene der caninen DCM zu identifizieren um zu überprüfen, ob Autoimmunreaktionen bei der DCM des Hundes nachweisbar sind.

## **2 Literatur**

### **2.1 Definition und Bedeutung der dilatativen Kardiomyopathie (DCM)**

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist charakterisiert durch die Dilatation und beeinträchtigte Kontraktilität des linken oder beider Ventrikel (Richardson et al. 1996). Sie ist eine der häufigsten Ursachen für ein schweres Herzversagen (Fu und Matsui 2002) und stellt beim Menschen die häufigste Indikation für eine Herztransplantation dar (Fu und Matsui 2002; Taylor et al. 2006). Die alterskorrigierte Prävalenz wird in den USA mit 36 Fällen auf 100.000 Einwohner angegeben (Codd et al. 1989). Die Erstdiagnose wird im mittleren Lebensalter gestellt, es erkranken jedoch auch Jugendliche (Codd et al. 1989; Felker et al. 2000). Das Verhältnis von an DCM erkrankten Männern zu erkrankten Frauen beträgt 3 :1 (Codd et al. 1989). Zirka 20% der erstdiagnostizierten symptomatischen Patienten sterben innerhalb eines Jahres und 50% der Patienten sterben innerhalb von 5 Jahren (Wynne 2001). Auch beim Hund stellt die DCM eine wichtige Ursache für ein chronisches Herzversagen dar (Tidholm et al. 2001; O'Grady 2004). Häufig von der Erkrankung betroffene Rassen sind Dobermänner, Doggen, Bernhardiner und Irische Wolfshunde (Sisson 1999; Vollmar 2000; Nelson 2006). Auch beim Hund endet die Erkrankung rasch tödlich. Monnet et al. beobachteten eine mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung von 65 Tagen (Monnet et al. 1995), nur 37,5% der erkrankten Hunde überlebten ein Jahr. Eine andere Gruppe beschrieb, dass nur 17,5% der Patienten ein Jahr nach Diagnosestellung überlebten (Tidholm et al. 1997).

### **2.2 Klinisches Bild der DCM**

Das klinische Bild der DCM des Hundes ähnelt sehr dem der humanen DCM. Die DCM kann in drei Stadien unterteilt werden: Im ersten Stadium treten noch keine elektrischen Veränderungen auf. Es bestehen keine klinischen Symptome, die auf eine Herzerkrankung hinweisen. Im zweiten Stadium (okkultes Stadium) sind bereits Veränderungen mit Herz-Echokardiografie oder im Elektrokardiogramm (EKG) zu erkennen, wobei noch keine klinischen Symptome auftreten. Ab dem dritten Stadium manifestieren sich die klinischen Symptome eines Herzversagens (O'Grady 2004). Die klinischen Symptome treten meist plötzlich und erst dann auf, wenn die Kompensationsmechanismen des Herzens nicht mehr ausreichen, um den enddiastolischen linksventrikulären Druck auszugleichen (Broschk und Distl 2005).

Die Hunde werden mit Anzeichen eines kongestiven Herzversagens vorgestellt, wie z.B. einer durch ein Lungenödem verursachten Dyspnoe, Pleuraerguß oder Aszites (Tidholm et al. 2001). Außerdem können die Tiere eine herabgesetzte Leistungsfähigkeit, Gewichtsverlust, Husten und eine verminderte Futter- und Wasseraufnahme zeigen (Tidholm und Jonsson 1997). Die DCM führt zum plötzlichen Herztod oder es entwickelt sich ein kongestives Herzversagen (Vollmar 2002). Das Fortschreiten der Erkrankung und die klinischen Anzeichen variieren von Rasse zu Rasse. Die Riesenrassen (z.B.: Irischer Wolfshund) neigen zu einer langsam fortschreitenden Form der Erkrankung (Dukes-McEwan 2000). Die meisten Irischen Wolfshunde zeigen Vorhofflimmern, bevor sie klinisch auffällig werden. Dobermänner leiden meist an einer besonders schweren Form der DCM. Der Zustand der Hunde verschlechtert sich sehr schnell. Außerdem können bei dieser Rasse, im Gegensatz zu den Irischen Wolfshunden, vor allem ventrikuläre Arrhythmien festgestellt werden (Dukes-McEwan 2000).

Die Symptome der humanen DCM ähneln sehr denen der caninen DCM. Oft wird die Erkrankung beim Menschen bei Routineuntersuchungen nur durch Zufall entdeckt, da noch keine Symptome bestehen. In fortgeschritteneren Fällen kann man Symptome eines Lungenödems oder einer verminderten Herzauswurfleistung feststellen. Häufig sind die Patienten schnell erschöpft. In einigen Fällen ist auch, wie beim Hund, der plötzliche Tod das erste Symptom (Elliott 2000).

## **2.3 Ätiologie der DCM**

### **2.3.1 Ätiologie der DCM bei Menschen**

Die Ursachen der DCM des Menschen sind vielfältig. So kann sie viral bedingt, genetisch bedingt, durch Toxine bedingt, durch Autoimmunreaktionen hervorgerufen oder idiopathisch sein (Richardson et al. 1996).

#### **2.3.1.1 Virale Infektionen als Ursache**

Bis zum heutigen Zeitpunkt werden virale Infektionen als Auslöser der DCM in Verbindung gebracht, dennoch konnte bislang kein wirklicher Beweis dieser Hypothese erbracht werden. Hinweise ergaben sich daraus, dass aus endomyokardialen Biopaten replikationsfähige mRNA von sich vermehrenden Enteroviren (Coxsackievirus B) isoliert werden konnte. Es wird vermutet, dass diese Viren eine akute Myokarditis auslösen, die dann in eine DCM übergeht (Kandolf und

Hofschneider 1989; Fujioka et al. 2004). Andere cardiotrope Viren konnten nicht nachgewiesen werden (Fujioka et al. 2004). Außerdem führte bei Patienten, bei denen eine myokardiale Viruspersistenz nachgewiesen war, eine antivirale Therapie mit Interferon- $\beta$  zu einer Beseitigung des viralen Genoms und zu einer signifikanten Abnahme der diastolischen und systolischen Durchmesser des linken Ventrikels (Kuhl et al. 2003).

### **2.3.1.2 Genmutationen**

In 20% der an DCM erkrankten Patienten konnte eine familiäre Häufung der Erkrankung festgestellt werden (Michels et al. 1992). Meist handelt es sich dabei um autosomal dominante Erbgänge. Am häufigsten (in ca. 10% der Fälle familiär bedingter DCM) kommen hier verschiedene „missense“-Mutationen im Gen der schweren Kette des beta-Myosins (MYH7) vor. Dabei wird eine Aminosäure gegen eine andere ausgetauscht, was dann zu Veränderungen in der Proteinstruktur und somit zu Störungen in der Myosin–Actin Interaktion führt (Kamisago et al. 2000; Villard et al. 2005). Ein weiteres Protein, dessen Mutation zu einer DCM führt ist das Myosin bindende Protein C (cMyBP-C), das mit dem dicken Filament assoziiert ist. Hier konnten zwei „missense“-Mutationen und eine „nonsense“-Mutation nachgewiesen werden (Daehmlow et al. 2002; Nanni et al. 2003). Bis heute ist jedoch nicht bekannt, wie Mutationen dieses Proteins zu einer Herzerkrankung führen (Chang und Potter 2005). Weitere DCM-assoziierte Mutationen sind solche des cardiac Actin Gens (ACTC), die in zwei nicht miteinander verwandten DCM-betroffenen Familien gefunden wurden. Auch hier handelt es sich um „missense“-Mutationen. In den Kardiomyozyten ist ACTC die Hauptkomponente des dünnen Filaments in den Sarkomeren. Diese Mutation könnte die betroffenen Myozyten anfälliger für degenerative Prozesse machen (Olson et al. 1998). Außerdem konnten drei weitere „missense“-Mutationen des alpha-Tropomyosin 1 (TPM1) nachgewiesen werden, die vermehrt bei DCM-betroffenen Familien auftraten. Zwei dieser Mutationen führen zu einer lokalen Ladungsveränderung auf der Oberfläche des Tropomyosin-Moleküls. Die molekularen Mechanismen, die durch diese Mutationen zur DCM führen, sind jedoch noch unbekannt (Olson et al. 2001). Die alpha-TPM1-Mutation führte in japanischen Familien zunächst zu einer hypertrophen Kardiomyopathie (HCM), die sich in seltenen Fällen im weiteren Verlauf zu einer DCM entwickelte (Regitz-Zagrosek et al. 2000). Mit der DCM im Zusammenhang stehende Mutationen konnten auch in allen drei Untereinheiten des Troponins (TnT,

TnI, TnC) entdeckt werden (Chang und Potter 2005). Am häufigsten fand man „missense“-Mutationen des TnT oder des TnI, die entweder autosomal dominant oder rezessiv vererbt wurden und zum Teil zu Ladungsveränderungen des Moleküls führten (Li et al. 2001; Murphy et al. 2004; Stefanelli et al. 2004). Außerdem konnten mehrere Mutationen des TnC gefunden werden (Mogensen et al. 2004). Sechs Prozent der familiären DCM-Fälle werden durch Mutationen des Troponin-Komplexes ausgelöst (Murphy et al. 2004). Des Weiteren wird vermutet, dass Mutationen des Myofilamentes Titin (auch Connectin genannt) bei der familiären DCM eine Rolle spielen (Itoh-Satoh et al. 2002). In Einzelfällen konnten auch Mutationen der Proteine Desmin (Li et al. 1999), Metavinculin (Olson et al. 2002), Dystrophin (Kaplan und Fontaine 2001) und  $\delta$ -Sarkoglycan (Tsubata et al. 2000) gefunden werden. Hier änderte sich das klinische Bild der Erkrankung dahingehend, dass bei diesen Mutationen neben der Herzmuskulatur zum Teil auch die Skelettmuskulatur betroffen war (Li et al. 1999; Kaplan und Fontaine 2001).

#### **2.3.1.3 Toxine**

In seltenen Fällen sind toxische Ursachen für eine DCM vorhanden. Nach starkem Alkoholkonsum über Jahre hinweg kann es zu einer alkoholischen Kardiomyopathie kommen. Alkohol und sein Metabolit Acetaldehyd wirken auf Mitochondrien und das sarkoplasmatische Retikulum toxisch (Schoppet und Maisch 2001). Auch Zytostatika wie Doxorubicin, die in der Behandlung von Neoplasien angewandt werden, können durch Mitochondrienschädigung zu einer dilatativen Kardiomyopathie führen (Wallace 2003).

#### **2.3.1.4 Autoimmunität**

Über viele Jahre hinweg wird bereits eine Autoimmunität als Ursache für die DCM diskutiert. In 20-26% der an DCM erkrankten Patienten konnten durch indirekte Immunfluoreszenz Herz-spezifische Autoantikörper im Serum gezeigt werden (Caforio et al. 1990; Neumann et al. 1990), deren krankmachende Wirkung wurde bislang nicht getestet. Im Jahr 2003 konnte eine Forschergruppe bei Mäusen, die eine Defizienz des programmed-cell death immunoinhibitory coreceptors (PD-1) tragen und spontan eine DCM entwickelten, einen erhöhten Autoantikörper-Titer gegen eine Untereinheit des Troponins (cTnI) ermitteln. Einer Wildtyp-Mäusepopulation wurden dann monoklonale Antikörper mit Spezifität gegen cTnI gespritzt, was zu einer Dilatation und Dysfunktion der Herzen führte (Okazaki et al.

2003). Dies war das erste Mal, dass bewiesen werden konnte, dass Autoantikörper direkt eine DCM verursachen können.

Die bisher beim Menschen gefundenen Autoantikörper können in vier Gruppen eingeteilt werden. Bei den Spezifitäten handelt es sich um sarkolemmale Proteine, mitochondriale Proteine, Hitze-Schock-Proteine und um Oberflächenrezeptoren.

Zu den betroffenen Proteinen des Sarkolemms, gegen die von DCM-Patienten Autoantikörper gebildet wurden, gehören Myosin, Actin, Tropomyosin und Troponin I. Mehrere Studien konnten Autoantikörper gegen die alpha- und beta-Isoformen der schweren Kette des Myosins nachweisen (Caforio et al. 1990; Goldman et al. 1995). Während die beta-Isoform im Ventrikel und im Skelettmuskel exprimiert wird, kommt die alpha-Isoform nur im Atrium vor (Gorza et al. 1984). In einer weiteren Studie wurden durch Affinitäts-Säulen-Chromatographie Herzmyosin-spezifische Autoantikörper aus Seren von an DCM erkrankten Patienten gewonnen. Mit diesen Autoantikörpern wurde eine verminderte Kontraktionsfähigkeit von isolierten Ratten-Myozyten aus der Herzkammer induziert (Warraich et al. 2006). Herzmyosin ist ein organspezifisches Autoantigen, da genetisch prädisponierte Mäuselinien, die mit Herzmyosin immunisiert wurden, einen Phänotyp ähnlich der DCM entwickelten, während eine Immunisierung mit Skelettmyosin zu keiner Erkrankung führte (Neu et al. 1987). Gegen ein weiteres Protein des Sarkolemms, das cardiac Actin, konnte von einer anderen Gruppe durch zweidimensionale Immunblots ein erhöhtes Auftreten von Autoantikörpern in Seren von an DCM erkrankten Patienten nachgewiesen werden (Latif et al. 1993). Bei 71% der Patienten dieser Studie konnten Autoantikörper gegen cardiac Actin festgestellt werden. Von Latif et al. konnte auch Tropomyosin durch zweidimensionale Immunblots als Autoantigen identifiziert werden (55% der DCM-Patienten vs. 20,8% der Patienten mit ischämischem Herzleiden) (Latif et al. 1993). Bisher wurden diese beiden potenziellen Autoantigene nicht durch Tierversuche bestätigt. Eine israelische Forschergruppe konnte mittels ELISA bei 15% der DCM-Patienten Autoantikörper gegen cardiac Troponin I (cTnI) feststellen. Keine der Kontrollen zeigte diese Autoantikörper im Serum. Es konnte jedoch kein Einfluss dieser Autoantikörper auf kultivierte neonatale Ratten-Myozyten aus dem Ventrikel festgestellt werden (Shmilovich et al. 2006). In einer anderen Studie konnte durch Injektion von monoklonalen anti-cTnI-Antikörpern bei PD-1-defizienten Mäusen (programmed cell death-1 immuninhibitory coreceptor) eine Dilatation und Dysfunktion des Herzens



ausgelöst werden (Okazaki et al. 2003). Dies weist darauf hin, dass zumindest bei PD-1-defizienten Mäusen cTnI-Antikörper eine DCM auslösen können.

Zu den mitochondrialen Proteinen, gegen die von DCM-Patienten Autoantikörper gebildet werden, gehören Enzyme der Atmungskette. Seren von an DCM erkrankten Patienten enthielten Autoantikörper gegen den ADP-ATP-Carrier, die in der Lage waren, den Nukleotid-Transport zu hemmen. In einer experimentellen Studie wurden Meerschweinchen mit Herz-ADP-ATP-Carrier immunisiert. Daraufhin zeigten sie eine Verringerung der zytosolischen-mitochondrialen Differenz des Phosphorylierungs-Potenzials, was zu einer Verschlechterung der Herzleistung führte. Dieser Parameter hängt allein von der Funktionsfähigkeit des ADP-ATP-Carriers ab (Schulze et al. 1990). Diese Beobachtungen konnten nur in den Mitochondrien der Herzen, nicht jedoch in den Mitochondrien von Nieren oder Leber gemacht werden. Desweiteren konnte mittels Immunadsorptions-Studien eine Organ-Spezifität gezeigt werden. Nach Immunadsorption der Autoantikörper konnte keine weitere Hemmung der ADP-ATP-Carrier beobachtet werden (Schulze et al. 1990). Eine andere Gruppe konnte mittels Immunblots Nicotinamid-adenin-Dinucleotid-Dehydrogenase (Autoantikörperbildung bei 17% der DCM-Patienten (n=75) vs. 5% bei Kontrollen (n=182)), Ubiquinol-cytochrom-c Reduktase (39% bzw. 20% bei den DCM-Patienten vs. 15% bzw. 10% bei den Kontrollen) und die Lipoamid-Dehydrogenase (Antikörperbildung bei 15% der Patienten vs. 10% bei den Kontrollen) als Autoantigene bei der DCM des Menschen identifizieren (Pohlner et al. 1997). Alle drei Proteine sind ubiquitär exprimiert. Es ist noch nicht bekannt, ob Autoantikörper gegen diese Enzyme tatsächlich eine DCM auslösen können.

Eine weitere Gruppe von Proteinen, gegen die von DCM-Patienten Autoantikörper gebildet werden, sind Hitze-Schock-Proteine (Hsp). Autoantikörper gegen Hitze-Schock-Proteine können in Seren von an verschiedenen Autoimmunerkrankungen erkrankten Patienten gefunden werden (Matsumori und Kawai 1982). Da Hitze-Schock-Proteine von Menschen und Bakterien sehr hoch konserviert sind, werden Antikörper gegen Hitze-Schock-Proteine in der Regel als Zeichen einer vorhergegangenen viralen oder bakteriellen Infektion angesehen (Matsumori und Kawai 1982). Bei DCM-Patienten konnte signifikant häufiger eine Autoantikörperbildung gegen Hsp60 (10% der DCM Patienten und 1% der gesunden Kontrollen) und Hsp70 (14% der DCM-Patienten und 2% der gesunden Kontrollen) festgestellt werden als bei gesunden Kontrollen. Die Autoren führen dies auf eine

vorangegangene Infektion zurück, die zur Auslösung der DCM führte (Portig et al. 1997). Weitere Experimente, mit denen pathogenetische Hintergründe geklärt werden müssen, stehen noch aus.

Zu den Membranrezeptoren, gegen die von DCM-Patienten Autoantikörper gebildet werden gehören beta-1-Adrenorezeptoren und muskarinerge Rezeptoren. Bei ca. 30% der DCM-Patienten sind Autoantikörper gegen  $\beta_1$ -Adrenorezeptoren im Serum nachweisbar (Staudt et al. 2001). In einem Experiment wurden zehn Kaninchen mit einem synthetisch hergestellten Peptid, das der Sequenz der zweiten extrazellulär gelegenen Schleife des  $\beta_1$ -Adrenorezeptors entsprach, immunisiert. Die immunisierten Kaninchen entwickelten morphologische Veränderungen des Herzens, die einer dilatativen Kardiomyopathie ähnelten. Kaninchen, die mit einem M2-muskarinergen Rezeptor immunisiert wurden, entwickelten ebenfalls morphologische Veränderungen des Herzens, hier aber vor allem des rechten Ventrikels (Matsui et al. 1997). Eine andere Gruppe konnte zeigen, dass beta-1-Adrenorezeptor-Antikörper bei Kardiomyozyten adulter Ratten eine Apoptose induzieren (Staudt et al. 2003).

### **2.3.2 Ätiologie der DCM beim Hund**

Die Ätiologie der DCM des Hundes ist deutlich weniger untersucht als die der DCM des Menschen. Beim Hund werden ähnliche Ursachen wie beim Menschen vermutet. So wurden ernährungsbedingte, virale, toxische, genetische und immunologische Ursachen mit der DCM in Zusammenhang gebracht und untersucht (Tidholm et al. 2001; O'Grady 2004).

#### **2.3.2.1 Ernährungsbedingte Ursachen**

Bei einer Gruppe amerikanischer Cocker Spaniel mit DCM konnten niedrige Plasma-Taurin-Werte festgestellt werden (Taurinmangel). Die Plasma-Carnitin-Werte waren leicht erniedrigt oder lagen im Referenzbereich. Die Hunde wurden mit Taurin oder Carnitin supplementiert, was zu einer Erhöhung der jeweiligen Werte im Plasma und zur Verbesserung des klinischen Zustandes führte. In der Studie konnte gezeigt werden, dass bei Amerikanischen Cocker Spaniels mit DCM eine Supplementierung mit Taurin und Carnitin zu einer Verbesserung der Funktion des linken Ventrikels führte (Kittleson et al. 1997). In einer Studie mit an DCM erkrankten Dalmatinern konnte dagegen keine Taurin- oder Carnitindefizienz nachgewiesen werden (Freeman et al. 1996), so dass vermutet werden kann, dass die Taurin- und Carnitindefizienz ein auf wenige Rassen beschränktes Problem darstellt.

### **2.3.2.2 Virale Ursachen**

Virale Agenzien konnten nur in wenigen Myokardproben von an DCM erkrankten Hunden mittels PCR nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich immer um canines Adenovirus Typ 1. Canines Parvovirus, Adenovirus Typ 2 und Herpesviren konnten nicht nachgewiesen werden (Maxson et al. 2001).

### **2.3.2.3 Toxine**

Wie beim Menschen, so ist auch beim Hund die Kardiotoxizität des Chemotherapeutikums Doxorubizin eine bekannte Nebenwirkung. Jede toxisch bedingte Myokardschädigung kann zu einem verminderten kardialen Auswurf, Arrhythmien und Myozytendegeneration führen (Nelson 2006).

### **2.3.2.4 Genmutationen**

Da die DCM bei verschiedenen Rassen gehäuft auftritt, liegt der Verdacht nahe, dass die Erkrankung vererbt wird. Bisher konnte jedoch keine DCM-verursachende Mutation bei Hunden nachgewiesen werden (Kittleson 1998; Hyun und Filippich 2006).

Beim Menschen sind verschiedene, DCM-verursachende Genmutationen bekannt. Verschiedene Forschergruppen versuchten diese oder ähnliche Mutationen auch bei Hunden zu finden. Bei mehreren Hunden verschiedener Rassen, die an DCM erkrankt waren, wurden die Proteine Dystrophin und  $\alpha$ -Sarcoglycan auf Mutationen untersucht. Es konnten keine Unterschiede zwischen einer gesunden Kontrollgruppe und den DCM-kranken Hunden festgestellt werden. Dies lässt vermuten, dass Dystrophin- oder  $\alpha$ -Sarcoglycan-Veränderungen keine Rolle in der DCM des Hundes spielen (Spier et al. 2001). Eine andere Gruppe versuchte, nachdem beim Menschen eine Mutation in den Exons 5 und 6 des cardiac Actin Gens nachgewiesen worden war (Olson et al. 1998), diese Mutation auch beim Dobermann nachzuweisen. Die Exons 2 bis 6 des cardiac Actin Gens wurden dazu mittels PCR sequenziert und anschließend analysiert. Es konnten jedoch keine Unterschiede zwischen den an DCM erkrankten Dobermännern und gesunden Kontrollhunden festgestellt werden (Meurs et al. 2001). Außerdem wurde untersucht, ob die beim Menschen nachgewiesene Mutation im Desmin-Gen (Li et al. 1999) auch bei Dobermännern nachweisbar ist. Dabei konnten beim Dobermann keine Veränderungen im Desmin-Gen festgestellt werden (Stabej et al. 2004). Für verschiedene Hunderassen wurden Erbganganalysen mit rasseabhängig unterschiedlichen Ergebnissen durchgeführt.

Bei an DCM erkrankten Doggen stimmten Stammbaumanalysen mit einem autosomal rezessiven Erbgang überein (Meurs et al. 2001). Bei der Analyse von Stammbäumen zweier Boxerfamilien wurde ein autosomal dominanter Erbgang ermittelt (Meurs et al. 1999). Eine andere Gruppe untersuchte einen Wurf Portugiesischer Wasserhunde, der an einer der DCM ähnlichen Herzerkrankung starb. Aufgrund der Stammbaum-Analyse wurde hier ein autosomal rezessiver Erbgang vermutet (Dambach et al. 1999).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass viele Untersuchungen zu genetischen Ursachen der DCM beim Hund gemacht wurden, bisher aber keine mit DCM korrelierenden Genmutationen nachgewiesen werden konnten (Hyun und Filippich 2006).

### **2.3.2.5 Autoimmunität**

Zu einer möglichen autoimmunen Ursache der DCM des Hundes gibt es bis heute nur wenige Untersuchungen. Bisher wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz und Western Blots nach Unterschieden in der Immunreaktion zwischen an DCM erkrankten Hunden und herzgesunden Kontrollhunden gesucht. Die Forschergruppe konnte zwischen den beiden Gruppen keine Unterschiede in der Autoantikörperspezifität oder der Häufigkeit der Autoantikörperbindung feststellen. Alle Seren, auch die der gesunden Hunde, reagierten ohne Unterschiede auf mehrere Banden der Herzpräparation (Cobb et al. 1994). In einer anderen Studie konnten bei 30% von an DCM erkrankten Englischen Cocker Spaniels antimitochondriale Antikörper nachgewiesen werden. Getestet wurde auf Mitochondrien, die aus Ratten-Myokard gewonnen wurden. Serum-Autoantikörper, die spezifisch auf Herz-Mitochondrien reagierten, wurden mittels Staphylokokken-Agglutinations-Assay erfasst (Day 1996). Aktuellere Untersuchungen konnten mittels Pubmed-Recherche (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) nicht gefunden werden (Stand Februar 2007).

## **2.4 Pathogenese der autoimmunen DCM**

Die funktionelle Rolle der kardialen Autoantikörper bei der dilatativen Kardiomyopathie ist noch unklar. Es ist möglich, dass sie die entzündliche Antwort auf einen Untergang der Myozyten darstellen, was bedeuten würde, dass es sich um ein Epiphänomen handelt. Andererseits könnten kardiale Autoantikörper auch eine

aktive Rolle in der Pathogenese der DCM spielen (Felix et al. 2000). Außerdem weisen mehrere Studien darauf hin, dass die durch Autoimmunität hervorgerufene DCM eine T-Zell-vermittelte Erkrankung ist (Schwimmbeck et al. 1996).

#### **2.4.1 Pathogenität der Autoantikörper**

Einige Studien weisen auf eine direkte Pathogenität der Autoantikörper hin. So konnten mehrere Untersucher durch Entfernung von Autoantikörpern aus dem Plasma von DCM-Patienten mittels Immunadsorption eine Verbesserung der Herzfunktion feststellen (Wallukat et al. 1996; Dorffel et al. 2000; Felix et al. 2000; Muller et al. 2000; Mobini et al. 2003; Staudt et al. 2006). Alle Studien wurden mit DCM-Patienten durchgeführt, bei denen Autoantikörper gegen den  $\beta$ -Adrenorezeptor nachweisbar waren. Immunglobuline der Klasse G (also auch die Autoantikörper, die der Immunglobulinklasse G angehören) wurden mittels Immunadsorption über eine Säule entfernt. Im Anschluss an die Immunadsorption fand eine IgG-Substitution statt, um das Infektionsrisiko zu minimieren. In nachfolgenden Messungen waren die Autoantikörper-Titer gegen den  $\beta_1$ -Adrenorezeptor deutlich abgesunken. Bei den mittels Immunadsorption behandelten DCM-Patienten konnte eine signifikante Verbesserung der Herzfunktion festgestellt werden. Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) stieg signifikant an, der linksventrikuläre Innendurchmesser in der Diastole (LVIDd) und der linksventrikuläre Innendurchmesser in der Systole (LVIDs) nahmen signifikant ab (Muller et al. 2000). Bei einer nicht mittels Immunadsorption behandelten DCM-Vergleichsgruppe konnten weder Veränderungen in der Autoantikörperhäufigkeit, noch in der Herzfunktion festgestellt werden. Der positive Effekt in der behandelten Gruppe hielt bei den verschiedenen Studien unterschiedlich lange an. In einer Studie von Wallukat et al. konnten 75 Tage nach Immunadsorption Werte festgestellt werden, die denen vor Immunadsorption entsprachen (Autoantikörpertiter und Herzfunktion) (Wallukat et al. 1996). Zwischenzeitlich kam es aber zu einer Verbesserung der Herzfunktion und zu einer Reduktion der Autoantikörper (Wallukat et al. 1996). In einer neueren Studie konnte sechs Monate nach Immunadsorption noch keine erneute Verschlechterung der Herzfunktion festgestellt werden (Staudt et al. 2006). Eine weitere Gruppe untersuchte den Zusammenhang zwischen der Entfernung von Autoantikörpern gegen den  $\beta_1$ -Adrenorezeptor und der hämodynamischen Verbesserung durch Immunadsorption. Zweiunddreißig Prozent der an der Studie teilnehmenden, an DCM erkrankten Patienten waren vor der Behandlung  $\beta_1$ -Adrenorezeptor-

Autoantikörper-positiv. Eine hämodynamische Verbesserung der Herzfunktion konnte aber bei allen mit Immunadsorption behandelten Patienten festgestellt werden. Da die Therapie auch bei  $\beta_1$ -Adrenorezeptor-Autoantikörper-negativen Patienten erfolgreich war, stellt sich die Frage, was zur Verbesserung bei diesen Patienten geführt hat (Mobini et al. 2003). Eventuell wurden pathogenetisch relevante Autoantikörper anderer Spezifität bei diesen Patienten mitentfernt.

#### **2.4.2 Rolle von T-Zellen in der DCM**

Mehrere Studien weisen darauf hin, dass die durch Autoimmunität ausgelöste DCM primär eine T-Zell-mediierte Erkrankung ist.

Bei einer Mäusepopulation wurde durch Injektion von gereinigtem Herz-Myosin eine Myokarditis ausgelöst. Im Anschluss wurden gereinigte T-Zellen dieser Mäuse auf gesunde SCID (severe combined immunodeficiency)-Mäuse transferiert. Diese Mäuse sind nicht in der Lage, T- und B-Zellen zu bilden. Die SCID-Mäuse entwickelten nach der Übertragung  $CD3^+$ -T-Zellen eine akute Myokarditis (Smith und Allen 1991). Ungefähr 20% der Fälle akuter Myokarditis entwickeln sich beim Menschen zu einer DCM (Jane-wit und Tuohy 2006). Ein Transfer der Antimyosin-Antikörper konnte dagegen keine Erkrankung der SCID-Mäuse auslösen (Smith und Allen 1991). Diese Daten stehen damit im Widerspruch zu neueren Erkenntnissen, nach denen die Übertragung von Autoantikörpern zu einer dilatativen Kardiomyopathie führt (Okazaki et al. 2003). Um die an der Auslösung einer DCM beteiligten Lymphozyten weiter zu charakterisieren, wurden Lymphozyten-Kulturen, die aus Myokard-Biopsien von Myokarditis- und DCM-Patienten stammten, angelegt. Die Mehrheit der Zellen war  $CD3^+$ -positiv und somit als T-Lymphozyten identifiziert. Die T-Lymphozyten konnten mittels FACS-Analyse entweder als  $CD4^+$ - (42%) oder als  $CD8^+$ -positiv (51%) identifiziert werden. Es konnten dagegen nur wenige Makrophagen oder natürliche Killerzellen erkannt werden, so dass das Myokard im wesentlichen von  $CD4^+$ - oder  $CD8^+$ -positiven Zellen infiltriert war (Schwimmbeck et al. 1996).

Für die Auslösung einer autoimmunen Myokarditis scheinen keine B-Zellen notwendig zu sein. So erkrankten auch B-Zell-defiziente Mäuse, die mit Herzmyosin immunisiert wurden, an einer Myokarditis. Dies lässt vermuten, dass autoreaktive T-Zellen durch Makrophagen oder dendritische Zellen aktiviert werden (Malkiel et al. 1999).

Die experimentelle Induktion vieler Autoimmunerkrankungen scheint von der Aktivierung der CD4<sup>+</sup>-T-Helfer-Zellen abhängig zu sein, während CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten (zytotoxische T-Zellen) eine Rolle im Fortschreiten der Erkrankung spielen. Um die Rolle von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bei der autoimmunen Myokarditis zu erforschen, wurden CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>-defiziente Mäuse mit Herzmyosin immunisiert, um eine autoimmune Myokarditis und nachfolgend eine DCM auszulösen. CD8<sup>+</sup>-defiziente Mäuse entwickelten schwerere Erkrankungen als nicht defiziente Kontrollmäuse. Anders als erwartet entwickelten CD4<sup>+</sup>-defiziente Mäuse eine autoimmune Myokarditis mit Infiltration von TCRαβ<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>-T-Zellen im Herzgewebe und dem Auftreten von Autoantikörpern. Dies deutet darauf hin, dass das Fehlen von CD4<sup>+</sup>- oder von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen keinen signifikanten Einfluss auf die Auslösung der autoimmunen Myokarditis hat (Penninger et al. 1993).

### **2.4.3 Pathohistologie der caninen DCM**

Histologisch können zwei unterschiedliche Formen der caninen DCM beschrieben werden. Bei den meisten großen und mittelgroßen Hunderassen, wie z.B. Irischen Wolfshunden, kommt eine Form der DCM vor, die durch dünne, separierte, wellenförmige Myokardfibrillen in einer vermehrten Intrazellulärsubstanz gekennzeichnet ist („attenuated wavy fibres“) (Tidholm et al. 1998; Tidholm und Jonsson 2005). Wellenförmige Myokardfibrillen sind charakteristische Anzeichen für eine akute myokardiale Ischämie sowohl beim Hund, als auch beim Menschen (Eichbaum 1975) und wurden auch bei humanen DCM-Patienten beschrieben (McCarthy et al. 1995). Die Myokardzellen haben einen um die Hälfte verringerten Durchmesser und ein wellenförmiges Aussehen. Die Myozyten sind durch einen deutlichen, zellfreien Freiraum voneinander getrennt, was das Vorhandensein von Ödemflüssigkeit vermuten lässt. Oft liegt eine diffuse Infiltration durch eine subendokardial gelegene Fibrose vor (Tidholm et al. 1998). Die veränderten Myozyten sind am häufigsten in der Wand des linken Ventrikels zu finden (Tidholm et al. 2000).

Die andere Form der DCM ist gekennzeichnet durch Muskelfaserdegeneration und -atrophie. Degenerative Veränderungen in Form von Myozytolyse und Myofibrillennekrose führen zu einer weitgehenden Atrophie mit großen Bereichen myokardialer Fibrose und fettiger Infiltration. Diese Veränderungen wurden bei Dobermännern und Boxern beschrieben (Calvert et al. 1982; Harpster 1991; Everett et al. 1999).

Möglicherweise stellen diese zwei histologisch differenzierbaren DCM-Formen verschiedene Krankheitsverläufe dar (Tidholm und Jonsson 2005).

#### **2.4.4 Pathohistologie der humanen DCM**

Pathohistologisch findet sich bei der humanen DCM ein Nebeneinander atrophischer und reaktiv-hypertrophischer Kardiomyozyten mit unspezifischen degenerativen Veränderungen. Es kommt zu einer interstitiellen Fibrose (Ferrans 1989). Hypertrophierte und atrophische Zellen liegen in Arealen mit interstitieller Fibrose und erscheinen isoliert vom restlichen Myokard, der Zellverbund ist durch die Vermehrung der extrazellulären Matrix aufgelöst (Schaper 1993). Diese Veränderungen ähneln denen, die bei den großen Hunderassen, wie z.B. dem Irischen Wolfshund beobachtet werden konnten.

Bei immunhistochemischen Untersuchungen von Myokardproben von an DCM erkrankten Patienten konnte in 48% der Proben eine Infiltration von T-Lymphozyten festgestellt werden (Kuhl et al. 1996). In einer neueren Studie konnte nur in 14% der Myokardbiopsien eine Infiltration mit T-Lymphozyten gesehen werden (Prochorec-Sobieszek et al. 2006). Die das Myokard infiltrierenden T-Lymphozyten wurden von einer anderen Forschergruppe vor allem als CD4<sup>+</sup>-T-Zellen identifiziert (Klappacher et al. 1993). In weiteren immunhistochemischen Untersuchungen von Myokardbiopsien DCM-kranker Patienten konnte eine vermehrte Anreicherung von IgG, dem Komplementfaktor C5b-9 und von Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF $\alpha$ ) beobachtet werden. Man vermutet, dass Immunglobuline der Klasse G an der Komplementaktivierung mitwirken und so an dem Fortschreiten der Erkrankung beteiligt sind. TNF- $\alpha$  löst eine Apoptose der Kardiomyozyten aus (Zwaka et al. 2002).

## **2.5 Zweidimensionales Western Blotting**

### **2.5.1 Zweidimensionale Auftrennung des Proteoms mit 2D Gelelektrophorese**

Die zweidimensionale Gelelektrophorese, die eine Auftrennung komplexer Proteingemische nach dem isoelektrischen Punkt, dem Molekulargewicht, der Löslichkeit und der relativen Abundanz der einzelnen Proteine ermöglicht, ist die wichtigste Methode für die Auftrennung eines Proteoms (Gorg et al. 2004). Die Auftrennung der Proteine erfolgt dabei in der ersten Dimension mittels isoelektrischer Fokussierung, an die sich eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese in der zweiten Dimension anschliesst (Gorg et al. 2004). Eine deutliche Verbesserung der von



O'Farrell beschriebene Technik wurde nach Etablierung der zweidimensionalen Gelelektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG-Streifen) durch Gorg et al. erreicht (O'Farrell 1975; Gorg et al. 2004), was zu einer gesteigerten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse führte. So können mit der zum heutigen Zeitpunkt zur Verfügung stehenden Methode, abhängig von der Gelgröße und dem pH-Gradienten, bis zu 5000 Proteine pro Gel aufgetrennt, detektiert und quantifiziert werden (Gorg et al. 2004). Damit ermöglicht die zweidimensionale Gelelektrophorese eine Auftrennung komplexer Proteingemische von Gewebeproben, Körperflüssigkeiten, Biopsien, kultivierten Zelllinien sowie von Extrakten aus Mikroorganismen (Wittmann-Liebold et al. 2006).

### **2.5.2 Identifikation von Autoantigenen mit 2D Western Blots**

Die mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennten Proteome können nachfolgend nach der von Towbin beschriebenen Methode auf Nitrozellulosemembranen transferiert werden (Towbin et al. 1979). Mit Hilfe dieses als Western Blotting bezeichneten Verfahrens ist es möglich, verschiedene Proteine über Bindungen mit Antikörpern auf der Membran nachzuweisen. Deeg et al. konnten mit dieser Methode in Seren von an equiner rezidivierender Uveitis (ERU) erkrankten Pferden Autoantikörper gegen verschiedene retinale Proteine nachweisen (Deeg et al. 2006). Hierzu wurden PVDF-Membranen verwendet, auf die dann Proteine porciner Retina transferiert wurden. Diese Membranen wurden dann mit Seren von ERU-Patienten und Kontrollen inkubiert. Die Bindung von Autoantikörpern wurde mit Hilfe eines Kaninchen anti-Pferd IgG-POD-Antikörpers und anschließender ECL-Entwicklung sichtbar gemacht. Die so gekennzeichneten Spots wurden dann aus einem Referenz-Silbergel ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie identifiziert. Mit dieser Methode konnten neue Autoantigene identifiziert werden, deren weitere Charakterisierung ergab, dass sie bei der ERU eine pathogenetische Rolle spielen (Deeg et al. 2006). Obwohl die ERU T-Zell-mediiert ist, erwies sich die Methode der Autoantigensuche über die Analyse der Autoantikörperspezifität als geeignet, pathogenetisch relevante, bislang unbekannte Autoantigene zu identifizieren.

In der humanen DCM-Forschung wurden bisher nur wenige Untersuchungen mit 2D-Gelelektrophorese und anschließendem Immunblotting unternommen. Mit dieser Methode konnten aber schon einige Autoantigene gefunden werden. Eine Forschergruppe konnte die Hitze-Schock-Proteine 60 (hsp60) und 70 (hsp70) und

das Hitze-Schock-Protein 70 verwandte Protein (hsc70) als Autoantigen identifizieren (Portig et al. 1997). Eine andere Gruppe identifizierte mit dieser Methode mehrere mitochondriale Proteine als Autoantigene. Bei diesen Proteinen handelte es sich um eine Untereinheit der Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Dehydrogenase, zwei Kernproteine der Ubiquinol-Cytochrom-c Reduktase, die Lipoamid-Dehydrogenase und eine Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase (Pohlner et al. 1997). Eine Validierung dieser Autoantigene erfolgte letztlich allerdings nicht (Pub-Med Recherche Februar 2007).

In einer weiteren Studie wurden mit Hilfe von zweidimensionalen Immunblots einige weitere Autoantigene, wie z.B. eine schwere und eine leichte Kette des Myosins, cardiac Actin und Tropomyosin, identifiziert (Latif et al. 1993).

Bei der caninen DCM versuchten bisher nur wenige Gruppen, Autoantigene zu identifizieren. Eine Gruppe versuchte mittels eindimensionaler Western Blots in Seren von DCM-kranken Hunden herzreaktive Autoantikörper zu detektieren. Die Seren wurden auf canine myokardiale Proteine, die eindimensional mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden, getestet. Allerdings stellte diese Gruppe fest, dass alle Seren, auch die von gesunden Hunden, mit den Herz-Antigenen reagierten und es in der Spezifität keine Unterschiede gab (Cobb et al. 1994). Mittels zweidimensionaler Elektrophorese und anschließend Immunblotting wurden laut Datenbank-Recherche (Pub-Med, Stand Februar 2007) noch keine Autoantigene in der caninen DCM gesucht.

### **2.5.3 Massenspektrometrische Identifikation von Proteinen**

Seit Ende der 80er Jahre ist die Massenspektrometrie eine der wichtigsten Analysemethoden für die Peptid- und Proteinanalytik. Bei der von Karas und Hillenkamp eingeführten matrix-unterstützten Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI) wird die Probe in eine geeignete Matrix, aus kleinen organischen Molekülen bestehend, die bei der eingestrahnten Laserwellenlänge eine hohe Absorption zeigen, eingebettet (Karas und Hillenkamp 1988).

Das zu analysierende Protein wird dazu aus dem 2D-Gel ausgeschnitten, mit Trypsin, eine Endopeptidase, die spezifisch nach den Aminosäuren Arginin und Lysin spaltet, in kleine Fragmente geschnitten, deren Größen sich aus der Primärsequenz des Proteins genau vorhersagen lassen. Diese Probe wird dann zusammen mit der Matrix auf eine Stahlplatte aufgetragen (Kokkristallisation) und in das Massenspektrometer eingeschleust. Mit Hilfe des Lasers werden die

Peptid/Matrixkristalle dann beschossen und dabei sowohl ionisiert als auch in die Gasphase gebracht. Daraufhin werden die gasförmigen Peptide im Vakuum unter Hochspannung beschleunigt und über die genaue Messung der Flugzeit bis zum Detektor, ihre genaue Größe bestimmt. Die gemessenen Peptidgrößen werden dann in der Datenbankanalyse mit den zu erwartenden Größen verglichen und bei signifikanter Übereinstimmung der Muster identifiziert.

Aufgrund der Automatisierung der Messung ist die MALDI-MS für die Analyse großer Probenzahlen geeignet, womit eine schnelle und sensitive Methode zur Identifikation von Proteinen zur Verfügung steht.

Anfang des 21. Jahrhunderts wurde ein hochauflösendes MALDI-TOF/TOF-Tandem-Massenspektrometer eingeführt. Hiermit ist eine hohe Durchlaufleistung und eine sehr sensitive Peptid-Sequenzierung möglich (Medzihradzky et al. 2000; Bienvenut et al. 2002). Das Gerät kombiniert die Vorteile der hoch sensiblen Peptid-Analyse mittels MALDI und die umfassende Fragment-Information, die durch die hochenergetische kollisions-induzierte Dissoziation erstellt wird (Medzihradzky et al. 2000) und führt damit zu einer weiteren Verbesserung bei der Proteinanalytik.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Probenmaterial

Für die Charakterisierung der humoralen Immunantwort von Hunden mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) wurden 140 Seren von 140 Hunden getestet und sechs unterschiedlichen Gruppen zugeteilt. Sowohl die Gruppe der an DCM erkrankten Tiere (n=78), als auch die Gruppe der gesunden Kontrollhunde (n=62) wurde in drei Untergruppen aufgeteilt. Die Untergruppen umfassen: 1. Hunde mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund (53 an DCM erkrankte Hunde, 33 gesunde Kontrollhunde), 2. Irische Wolfshunde (15 an DCM erkrankte Wolfshunde, 15 gesunde Wolfshunde), 3. Dobermänner (10 an DCM erkrankte Dobermänner, 14 gesunde Dobermänner).

	<b>DCM-Hunde (n=78)</b>	<b>Gesunde Kontrollhunde (n=62)</b>
<b>Hunde mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund</b>	53	33
<b>Irische Wolfshunde</b>	15	15
<b>Dobermänner</b>	10	14

**Abb. 3.1.1:** Gruppeneinteilung der auf Autoreaktivität getesteten Hunde

Die Seren der 53 an DCM erkrankten Hunde mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund stammten aus dem Klientel der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München. Die klinische Diagnose DCM wurde von Herrn Dr. Michael Deinert (jetzt: Tierklinik am Sandpfad, 69168 Wiesloch) mit Hilfe von Auskultation, Elektrokardiographie, Röntgen des Thorax und Echokardiographie gestellt.

Die Auswahl der 33 herzgesunden Kontrolltiere verschiedener Rassen erfolgte randomisiert.

Zwei weitere Gruppen bestanden aus 15 an DCM erkrankten Wolfshunden und 15 herzgesunden Wolfshunden. Die Seren der erkrankten Wolfshunde stammten zum größten Teil aus dem Klientel der Tierärztlichen Klinik am Kaiserberg, Duisburg. Die Seren der Kontrolltiere stammten von als herzgesund beurteilten Wolfshunden verschiedener Züchter. Die Diagnose „herzgesund“ wurde bei einer in Deutschland anerkannten Zuchtuntersuchung gestellt. Die klinische Diagnose DCM wurde von

Herrn Dr. Jan-Gerd Kresken (Duisburg) oder Frau Prof. Dr. Cordula Poulsen Nautrup (Institut für Tieranatomie I, LMU München) gestellt.

Weitere zwei Gruppen bestanden aus zehn an DCM erkrankten Dobermännern und 14 herzgesunden Dobermännern. Die Seren der erkrankten Dobermänner stammten wiederum zum größten Teil aus dem Klientel der Tierärztlichen Klinik am Kaiserberg, Duisburg. Der überwiegende Anteil der Seren der als herzgesund beurteilten Dobermänner stammte aus der Chirurgischen Tierklinik der LMU München (Vorstand Frau Prof. Dr. Ulrike Matis). Die Diagnose „herzgesund“ wurde bei einer in Deutschland anerkannten Zuchtuntersuchung gestellt.

Die im Western Blot eingesetzten Antigenpräparationen stammten aus dem Herz eines herzgesunden Pferdes, das in der Klinik für Pferde der LMU aufgrund einer nicht heilbaren Erkrankung eingeschläfert wurde.

### **3.1.1 Serumgewinnung**

Nach Desinfektion der Injektionsstelle mit 70% Ethanol<sup>1</sup> wurde Blut aus der Vena cephalica oder der Vena saphena entnommen und im Serumröhrchen<sup>2</sup> bei 37° C für zwei bis drei Stunden inkubiert. Das Serum wurde nach zwölfminütiger Zentrifugation bei 290 x g abpipettiert, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert.

### **3.1.2 Antigenpräparationen**

Aus jeder der vier Herzkammern (rechter und linker Vorhof, rechte und linke Hauptkammer) wurde ein ca. 1 cm<sup>3</sup> großes, alle Schichten beinhaltendes, Gewebestück entnommen. Die Gewebswürfel wurden einzeln zunächst manuell, dann mit Hilfe eines Potters (Potter S)<sup>3</sup> zerkleinert und mit Proteaseinhibitor (Roche complete)<sup>4</sup> versetzt. Nachdem je 1,5 ml des Probenmaterials in 2-ml-Reaktionsgefäße überführt wurden, wurden diese mit einem perforierten Deckel verschlossen. Ein Eintauchen der Gefäße in flüssigen Stickstoff führte zum sofortigen Gefrieren der Proben. Unmittelbar danach konnte im Vakuum eines Lyophilisators das gefrorene Wasser durch Sublimation entzogen werden.

Nach Abschluss der Lyophilisation wurde das verbleibende Pellet, je nach Größe, in 50-100 µl RNAse-freiem Wasser gelöst.

---

<sup>1</sup> Alle nicht extra aufgeführten Chemikalien: Fa. AppliChem, Darmstadt

<sup>2</sup> Fa. Sarstedt, Nürnberg

<sup>3</sup> Fa. B. Braun Biotech International, Melsungen

<sup>4</sup> Fa. Roche, Mannheim

## 3.2 Puffer und Lösungen

### 3.2.1 Puffer

#### Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) pH 7,2

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,45 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g

ad 1000 ml Aqua dest.

Zur Herstellung von PBS-Tween (PBS-T) pH 7,2 wurden zusätzlich 0,05% Tween-20 (0,5 ml/1000 ml PBS) zugesetzt.

#### Tris-HCl-Puffer, 1 M, pH 6,8

Tris	12,11 g
------	---------

mit 5 M HCl auf pH 6,8 titrieren,  
ad 100 ml Aqua bidest.

### 3.2.2 Puffer und Lösungen für die zweidimensionale Gelelektrophorese

#### Lysepuffer (zu 1 ml aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt)

Harnstoff (9 M) <sup>5</sup>	27,00 g
Thioharnstoff (2 M) <sup>6</sup>	7,60 g
CHAPS (4%) <sup>7</sup>	2,00 g
DTT (65 mM) <sup>8</sup>	0,50 g

ad 50 ml Aqua bidest.

Bei Raumtemperatur (RT) fünf Stunden rühren.

Vor Gebrauch wurden pro 1 ml Lysepuffer 0,1 ml Aqua bidest. zugesetzt.

---

<sup>5</sup> Fa GE Healthcare, Freiburg

<sup>6</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>7</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>8</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

### **Äquibrierungslösung**

1M Tris-HCl pH 6,8	50 ml
Harnstoff <sup>9</sup>	360,00 g
Glycerin	300 ml
SDS	18,00 g

ad 1000 ml Aqua bidest.

### **Agarose-Lösung, 0,5%**

Agarose <sup>10</sup>	0,25 g
-----------------------	--------

ad 50 ml Elektrophoresepuffer.

Aufkochen und anschließend auf 58°C temperieren.

Vor der Verwendung wurden zusätzlich 0,5 ml SDS-Lösung 20% zugesetzt.

## **3.2.3 Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

### **Gelpuffer, 1,5 M, pH 8,8**

Tris	18,15 g
------	---------

mit 5 M HCl auf pH 8,8 titrieren,

ad 100 ml Aqua bidest.

### **Dodecylsulfat Na-Salz (SDS)-Lösung, 10%**

Dodecylsulfat Na-Salz (SDS)	10,00 g
-----------------------------	---------

ad 100 ml Aqua bidest.

### **Dodecylsulfat Na-Salz (SDS)-Lösung, 20%**

Dodecylsulfat Na-Salz (SDS)	20,00 g
-----------------------------	---------

ad 100 ml Aqua bidest.

### **Ammoniumpersulfatlösung (APS), 10%**

Ammoniumpersulfat	0,10 g
-------------------	--------

ad 1 ml Aqua bidest.

---

<sup>9</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

<sup>10</sup> Fa. Invitrogen, Karlsruhe

**Tris-HCl-Puffer, 0,5 M, pH 6,8**

Tris	6,00 g
------	--------

mit 5 M HCl auf pH 6,8 titrieren,  
ad 100 ml Aqua bidest.

**Elektrophoresepuffer-Stammlösung, pH 8,3**

Tris	15,00 g
Glycin	72,00 g
SDS	5,00 g

ad 1000 ml Aqua bidest.

Die Stammlösung wurde zur Elektrophorese 1:5 mit Aqua dest. verdünnt.

**Tris-HEPES-SDS Laufpuffer-Stammlösung für Fertiggele**

Tris	121,00 g
HEPES	2,38 g
SDS	10,00 g

Ad 1000 ml Aqua bidest.

Die Stammlösung wurde zur Elektrophorese 1:10 mit Aqua dest. verdünnt.

**Probenpuffer (reduzierend)**

Aqua bidest.	4,00 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,00 ml
Glycerin, wasserfrei	0,80 ml
SDS-Lösung, 10%	1,60 ml
Bromphenolblau-Lösung	0,20 ml
2-Mercaptoethanol	0,40 ml

ergeben 8,00 ml Probenpuffer.



### 3.2.4 Lösungen für das Semy-Dry-Blotting

#### Anodenpuffer I, 0,3 M, pH 10,4

Tris	36,33 g
Methanol, reinst	200 ml

ad 1000 ml Aqua dest.

#### Anodenpuffer II, 25 mM, pH 10,4

Tris	3,03 g
Methanol, reinst	200 ml

ad 1000 ml Aqua dest.

#### Kathodenpuffer, pH 9,4

Tris	3,03 g
6-Aminocaprinsäure <sup>11</sup>	5,25 g
Methanol, reinst	200 ml

ad 1000 ml Aqua dest.

#### Ponceau-Färbelösung

Ponceau S <sup>12</sup>	2g
Trichloressigsäure	30 ml

ad 1000 ml Aqua bidest.

#### PBS-Tween-Polyvinylpyrrolidone (PBS-T-PVP) pH 7,2

Polyvinylpyrrolidone (PVP40) <sup>13</sup>	10,00 g
--	---------

ad 1000 ml PBS-T.

#### Tris-HCl-Puffer, 0,1 M, pH 8,6

Tris	12,11 g
------	---------

ad 1000 ml Aqua bidest.

---

<sup>11</sup> Fa. Merck, Darmstadt

<sup>12</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>13</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

## ECL-Lösung

Lösung 1 (bei 4°C gelagert)

0,1 M Tris-HCL (pH 8,6)	200 ml
Luminol <sup>14</sup>	0,05 g

Lösung 2 (bei RT dunkel gelagert)

Para-Hydroxycoumarinsäure <sup>15</sup>	0,011 g
---	---------

in 10 ml Dimethylsulfoxid.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)

Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Lösungen in folgendem Verhältnis gemischt:

- 1 ml Lösung 1
- + 0,3 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)
- + 100 µl Lösung 2

### 3.3 Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Antigenpräparationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben erfolgte nach der von Bradford beschriebenen Methode (Bradford 1976). Durch eine Komplexbildung des Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blau G-250 mit Proteinen, verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 470 nm auf 595 nm.

Die Reaktionslösung setzte sich folgendermaßen zusammen:

H <sub>2</sub> O	800 µl
Bradford-Reagenz <sup>16</sup>	200 µl

Zur Erstellung einer Eichkurve diente ein BSA Standard<sup>17</sup>, der in den Konzentrationen 0, 2, 4, 6, 8 µg/ml Reaktionslösung gemessen wurde.

Die Proben wurden zu je einem Milliliter der Reaktionslösung pipettiert. Das Volumen der zu messenden Proteinlösung wurde dabei so gewählt, dass die Messwerte im linearen Bereich der Eichkurve lagen. Die photometrische Bestimmung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm.

---

<sup>14</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>15</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>16</sup> Fa. BioRad, München

<sup>17</sup> Fa New England Biolabs, Frankfurt

### 3.4 Zweidimensionale Gelelektrophorese

#### 3.4.1 Rehydratisierung der Proben

Zur isoelektrischen Fokussierung wurden auf 11 cm langen Plastikstreifen fixierte, getrocknete Polyacrylamidgele mit einem immobilisierten, nichtlinearen pH-Gradienten von 3-11 eingesetzt (Immobiline™ DryStrip pH 3-11 NL, 11 cm)<sup>18</sup>. Das Auftragen der Probe erfolgte durch Rehydratisierung der Streifen. Dazu wurde die Probe zuerst in einer Rehydratationsflüssigkeit gelöst, die sich folgendermaßen zusammensetzte:

Probe + Lysepuffer 210 µl

Pharmalyte 3-10<sup>19</sup> 2,2 µl

Bromphenolblau<sup>20</sup> 1,1 µl

Nachdem die Rehydratationslösung gleichmäßig in die Vertiefung einer Quellkammer einpipettiert wurde, wurde die Schutzfolie vom trockenen Gelstreifen abgezogen und dieser mit der Gelfläche auf die Probe aufgelegt, ohne dass sich Luftblasen zwischen Rehydratationslösung und Streifen befanden. Um zu verhindern, dass der im Lysepuffer enthaltene Harnstoff auskristallisiert, wurde der Streifen anschließend mit entgastem Paraffinöl überschichtet. Durch Aufnahme der probehaltigen Rehydratationslösung hatten sich die trockenen Streifen nach fünf Stunden rehydriert (In-Gel Hydration).

#### 3.4.2 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte in einer Multiphor II Elektrophoreseeinheit<sup>21</sup>. Beim Aufbau der Elektrophoreseeinheit wurde zwischen Kühlplatte und Wanne, sowie zwischen Wanne und Streifenhalter, Paraffinöl pipettiert, um eine gleichmäßige Temperatur von 20°C während der Fokussierung aufrechtzuerhalten. Die rehydratisierten Streifen wurden so auf dem Streifenhalter platziert, dass ihre saure Seite zur Kathode, die basische Seite zur Anode zeigte. Die Elektroden wurden auf die beiden Streifenenden aufgesetzt und die Gelstreifen mit entgastem Paraffinöl überschichtet.

---

<sup>18</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

<sup>19</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

<sup>20</sup> Fa. Merck, Darmstadt

<sup>21</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

Die isoelektrische Fokussierung wurde mit Hilfe eines EPS 3501 XL Electrophoresis Power Supply<sup>22</sup> folgendermaßen durchgeführt:

<b>Phase</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Spannung (V)</b>	150	300	1000
<b>Zeit (h)</b>	2	3	13

### 3.4.3 Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele für die 2. Dimension

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension wurden Minigele in einer Größe von 7,5 cm x 8 cm und einer Geldicke von 0,75 mm verwendet. Zum Gießen der Gele wurde ein BV 102 Mini Slab Gel Gießstand<sup>23</sup> verwendet. Die Gradientengele wurden nach einer von Rehm beschriebenen Methode (Rehm 2002) erstellt. Hierzu wurden pro Gel nachstehende Acrylamid-Lösungen hergestellt:

	<b>Aqua bidest.</b>	<b>Glycerin</b>	<b>Gelpuffer</b>	<b>Acrylamid (30%)<sup>24</sup></b>
<b>9%-Lösung</b>	1,125 ml		0,625 ml	0,750 ml
<b>15%-Lösung</b>	0,400 ml	0,225 ml	0,625 ml	1,250 ml

Unmittelbar vor dem Gießen der Gele wurden zu jeder Lösung 12,5 µl APS 10% sowie 5 µl TEMED zugegeben.

In eine Pipette wurde zuerst die 9%-Lösung und nachfolgend die 15%-Lösung aufgezogen. Nachdem einige Luftblasen durch die Pipette gezogen wurden, bildete sich der Gradient. Die Lösung wurde im Anschluß zwischen die beiden Glasplatten des Gelgießstandes pipettiert und die Geloberfläche mit Isopropanol überschichtet. Nach einer Polymerisierungszeit von einer Stunde und Entfernung des Isopropanols konnte das Gel zur Proteinauftrennung in der zweiten Dimension verwendet werden.

<sup>22</sup>Fa. GE Healthcare, Freiburg

<sup>23</sup>Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg

<sup>24</sup>Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg

### 3.4.4 Äquilibrierung und 2. Dimension

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die Streifen zweimal äquilibriert. Hierzu wurden sie jeweils zehn Minuten auf dem Schüttler nacheinander in folgenden Lösungen inkubiert:

1. Reduktionslösung: Äquilibrierungslösung + DTT<sup>25</sup> (0,3g/30ml)
2. Carbamylierungslösung: Äquilibrierungslösung + Jodacetamid<sup>26</sup> (1,44g/30ml)

Der Carbamylierungspuffer enthielt außerdem 0,01% Bromphenolblau<sup>27</sup>, um die Lauffront bei der anschließenden SDS-Gelelektrophorese sichtbar zu machen.

Für eine Reduktion von elektroosmotischen Effekten beim Proteintransfer enthielt die Äquilibrierungslösung Harnstoff und Glycerin. Ein Zusatz von DTT zum ersten Äquilibrierungspuffer diente der Bewahrung der reduzierenden Bedingungen, die anschließend mit Jodacetamid in stabile Carbamidomethylierungen umgewandelt wurden.

Nach der Äquilibrierung wurden die Streifen auf das Polyacrylamidgel aufgelegt, ohne dass sich Luftblasen zwischen dem Gel und dem Streifen befanden, und anschließend mit in Laufpuffer aufgekochter und auf 58°C temperierter Agarose (0,5%) überschichtet. Nachdem die Agarose abgekühlt war, wurden die Gele in die Elektrophoresekammern eingesetzt und diese mit Laufpuffer befüllt. Die Elektrophorese erfolgte während der ersten 30 Minuten mit einer konstanten Spannung von 60 V und nachfolgend mit einer konstanten Spannung von 175 V (BP 500 Plus Power Supply)<sup>28</sup>. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Umgebungstemperatur von 4°C, um eine Überhitzung der Gele zu unterbinden. Der Lauf wurde beendet, kurz bevor die blaue Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte. Anschließend wurden die Gele gefärbt oder zum Immunblotting weiter verwendet.

---

<sup>25</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

<sup>26</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>27</sup> Fa. Merck, Darmstadt

<sup>28</sup> Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg

### 3.4.5 Färbung der Gele

Alle Färbungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Gele befanden sich dabei in Plastikschaalen auf einem Schüttler.

#### 3.4.5.1 Silberfärbung

Die Silberfärbung der Gele umfasste die unten aufgeführten Schritte. Alle Lösungen wurden vor Gebrauch jeweils frisch hergestellt. Die Sensitivität dieser Färbemethode liegt bei 0,3 – 10 ng Protein (Switzer et al. 1979).

	Zeit	Lösung	Herstellung von 1 Liter
<b>Fixierung</b>	2 x 20 min	50% Methanol 12% Essigsäure 0,0185% Formaldehyd	500 ml Methanol + 200 ml 60% Essigsäure ad 1000 ml H <sub>2</sub> O + 500µl Formaldehyd 37%
<b>Inkubation</b>	3 x 10 min	50% Ethanol	500 ml Ethanol + 500 ml H <sub>2</sub> O
<b>Inkubation</b>	1 x 0,2 min	0,8 mM Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	200 mg Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>29</sup> /1000 ml H <sub>2</sub> O
<b>Waschen</b>	2 x kurz	H <sub>2</sub> O	
<b>Silberimprägnierung</b>	1 x 20 min	11,8 mM AgNO <sub>3</sub> 0,028% Formaldehyd	2 g AgNO <sub>3</sub> /1000 ml H <sub>2</sub> O + 750 µl Formaldehyd 37%
<b>Waschen</b>	1 x kurz	H <sub>2</sub> O	
<b>Entwicklung</b>	variabel	0,57 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,02 mM Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,0185% Formaldehyd	60 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /1000 ml H <sub>2</sub> O + 25 ml Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -Lösung (s.o.) + 500 µl Formaldehyd 37%
<b>Stoppen</b>	>10 min	50 % Methanol 12% Essigsäure	500 ml Methanol + 200 ml 60% Essigsäure ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
<b>Konservierung</b>	>20 min	20% Ethanol 2% Glycerin	200 ml Ethanol + 25 ml 80% Glycerin ad 1000 ml H <sub>2</sub> O

<sup>29</sup> Fa. Merck, Darmstadt

### 3.4.6 Western Blot

Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mit einem diskontinuierlichen Puffersystem in einem Semi-dry-Elektroblotter<sup>30</sup> vom Gel auf eine Membran überführt. Nachdem die Filterpapiere<sup>31</sup> und die Nitrozellulosemembran<sup>32</sup> auf die Größe des Geles zugeschnitten wurden, wurde das Blot-Sandwich folgendermaßen aufgebaut (Abb. 3.4.5):

Auf die anodische Platte des Elektroblotters wurden zwei in Anodenpuffer I getränkte Filterpapiere und ein in Anodenpuffer II getränktes Filterpapier gelegt. Darauf wurden die in Aqua bidest. getränkte Nitrozellulosemembran und anschließend das SDS-Gel aufgelegt. Zum Abschluß wurden drei in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere auf das Gel aufgelegt und mit einer Glaspipette die die Elektrophorese störenden Luftblasen ausgestrichen und anschließend die kathodische Platte aufgesetzt.



Abb. 3.4.5: Aufbau des Blotsandwiches

Der elektrophoretische Transfer erfolgte mit Hilfe eines BP 500 Plus Power supply<sup>33</sup> bei einer Stromstärke von  $2,5 \text{ mA/cm}^2$  und einer Transferzeit von 30 Minuten.

### 3.4.7 Immunblot

Nachdem die Membran mit einer PBS-Tween-Polyvinylpyrrolidone (PBS-T-PVP)-Lösung blockiert worden war (Inkubationszeit mindestens zwei Stunden) und nachdem sie im Anschluss dreimal zehn Minuten gewaschen wurde, wurde sie mit dem 1:2000 in PBS-T verdünnten Patientenserum für drei Stunden bei

<sup>30</sup> Blue Flash-L, Fa Serva Electrophoresis, Heidelberg

<sup>31</sup> 3MM Chr, Fa. Whatman, Dassel

<sup>32</sup> Hybond-ECL, Nitrocellulose, Porengröße  $0,45 \mu\text{m}$ , Fa. GE Healthcare, Freiburg

<sup>33</sup> Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg

Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für je fünf Minuten mit PBS-T gewaschen. Um die gebundenen Antikörper sichtbar zu machen, wurde ein zweiter Peroxidase (POD)-konjugierter Antikörper verwendet. Die Membran wurde für eine Stunde mit dem 1:10000 in PBS-T verdünnten Kaninchen anti-Hund-IgG-POD Antikörper<sup>34</sup> inkubiert. Vor der Sichtbarmachung des Signals durch die Enhanced-chemilumineszenz (ECL)-Entwicklung wurde die Membran sechsmal für je zehn Minuten in PBS-T gewaschen. Die ECL-Lösung wurde wie vorher beschrieben angesetzt und auf die Membran aufgetragen, die Detektion der Lumineszenz erfolgte mit einem Röntgenfilm<sup>35</sup> bei einer Belichtungszeit von 30 bis 60 Sekunden. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur, die Membran wurde auf einem Plattenschüttler gewaschen und inkubiert.

### **3.4.8 Kolloidale Goldfärbung**

Zur besseren Spotidentifikation zwischen Immunblot und dem gefärbten Gel wurden die Proteine auf der Nitrozellulosemembran mit einer kolloidalen Goldlösung<sup>36</sup> angefärbt. Diese Färbung basiert auf der selektiven Bindung von negativ geladenen, hydrophoben Goldpartikeln an positiv geladene, hydrophobe Gruppen der Proteine, wodurch das kolloidale Gold die Proteine dunkelrot anfärbt. Die Sensitivität der Methode liegt unterhalb des Nanogramm-Bereiches (Moeremans et al. 1985).

Die Nitrozellulosemembran wurde vor der Färbung dreimal zehn Minuten in Aqua bidestillata gewaschen. Anschließend wurde die kolloidale Goldfärbung so aufgetragen, dass sie die Membran gut bedeckt, und für ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Färbung wurde die Membran dreimal je fünf Minuten mit Aqua bidest. gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet.

---

<sup>34</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>35</sup> SUPER-2000G, ortho, Fa.FUJI, Vertrieb durch Fa. Christiansen, Planegg

<sup>36</sup> Fa. Fluka, Vertrieb über Fa. Sigma, Deisenhofen



### 3.5 Eindimensionale Gelelektrophorese

#### 3.5.1 Durchführung der Elektrophorese mit selbst hergestellten Gelen

Die eindimensionale Auftrennung der Herzproteine erfolgte nach der von Laemmli beschriebenen Methode der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli 1970). In einer Mini Protean II Cell Gießkammer<sup>37</sup> wurden Gele mit einer Größe von 8 x 7 cm und einer Geldicke von 0,75 mm gegossen. Dabei wurde ein Trenngel mit einer Trennstrecke von 5 cm und einer Acrylamidkonzentration von 10% mit einem Sammelgel mit einer Länge von 2 cm und einer Acrylamidkonzentration von 4% überschichtet. Zur Herstellung von zwei Gelen wurden folgende Lösungen angesetzt:

	<b>10%ige Lösung</b>	<b>4%ige Lösung</b>
<b>Aqua bidest</b>	4,20 ml	6,17 ml
<b>Gelpuffer pH 8,8</b>	2,50 ml	
<b>Tris-HCl-Puffer, 0,5 M, pH 6,8</b>		2,50 ml
<b>Acrylamidlösung 30%</b>	3,30 ml	1,33 ml
<b>SDS-Lösung, 10%</b>	100 µl	100 µl

Unmittelbar vor dem Gießen wurden zusätzlich jeweils 50 µl APS 10% sowie 20 µl TEMED zugegeben.

Nachdem das Trenngel gegossen war, wurde dieses mit Aqua bidest. überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, konnte das Wasser wieder entfernt werden und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet werden. Um eine Auftrennung mehrerer Proben in einem Gel zu ermöglichen, wurde vor der Polymerisierung ein Kamm zur Vorformung von Probenaschen in das Sammelgel eingelassen, der nach erfolgter Polymerisierung wieder entfernt werden konnte.

Die aufzutrennende Antigenpräparation wurde im Verhältnis 1:3 mit reduzierendem Probenpuffer verdünnt und fünf Minuten bei 95°C erhitzt. Um später die Bandenhöhe ablesen zu können, wurde in einer Tasche ein Molekulargewichtsmarker<sup>38</sup> aufgetrennt, der Standardproteine mit bekanntem Molekulargewicht enthielt. Die restlichen Taschen wurden mit je 20 µl des Probengemisches befüllt. Die Elektrophoresekammern wurden mit Elektrophoresepuffer befüllt, nachdem die Gele in die Kammern eingesetzt waren. Während der ersten zehn Minuten erfolgte die

<sup>37</sup> Fa. BioRad, München

<sup>38</sup> Fa. Fermentas, St. Leon-Rot

Elektrophorese mit einer konstanten Stromstärke von 10 mA pro Gel, danach mit einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel (Power Pac 300 Power Supply)<sup>39</sup>.

### 3.5.2 Durchführung der Elektrophorese mit Fertiggelelen

Die eindimensionale Auftrennung der gereinigten Kandidatenproteine als Antigene erfolgte auf Fertiggelelen (Gradient 4 - 20%)<sup>40</sup>. Die Fertiggele wurden in eine Bio-Rad Mini Protean II Cell Kammer eingespannt. Anschließend wurden die Elektrophoresekammern mit Tris-HEPES-SDS Laufpuffer befüllt und 30 Minuten bei 4°C stehen gelassen, damit die Gele wieder etwas aufquellen konnten. Die aufzutrennende Antigenpräparation wurde im Verhältnis 1:3 mit reduzierendem Probenpuffer verdünnt und fünf Minuten bei 95°C erhitzt. Zur Ermittlung der Bandenhöhe wurde in einer Tasche ein Molekulargewichtsmarker aufgetrennt, welcher Standardproteine mit bekanntem Molekulargewicht enthielt. Die restlichen Taschen wurden mit je 20µl des Probengemisches befüllt. Die Elektrophorese fand unter den gleichen Bedingungen wie unter 3.5.1 beschrieben statt.

Im Anschluß wurden die Gele entweder gefärbt (Silberfärbung oder kolloidale Coomassiefärbung) oder auf eine Nitrozellulosemembran geblottet.

Wurde das Gel auf eine Nitrozellulosemembran geblottet, so wurde die Membran im Anschluss an den Western Blot mit Ponceau-S gefärbt.

### 3.5.3 Kolloidale Coomassiefärbung

Parallel zu jedem Lauf wurde jeweils mit einem Gelstreifen eine Silberfärbung (siehe 3.4.5.1) und eine Färbung mit kolloidalem Coomassie (Imperial Protein Stain)<sup>41</sup> durchgeführt, um später die im Blot markierten Banden mittels Massenspektrometrie zu identifizieren (Sensitivität  $\geq 3$  ng).

Das SDS-Gel wurde nach der Elektrophorese dreimal für je fünf Minuten mit Aqua bidest. gewaschen. Anschließend wurde das Gel mit der Färbelösung bedeckt und zwei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde das Gel durch mehrmaliges Waschen mit Aqua bidest. entfärbt, bis nur noch die Proteinbanden angefärbt waren.

---

<sup>39</sup> Fa. BioRad, München

<sup>40</sup> Fa. Pierce, Bonn

<sup>41</sup> Fa. Pierce, Bonn

### 3.5.4 Ponceau-Färbung der geblotteten Membranen

Nach Beendigung des Blots wurde die Nitrozellulosemembran für zehn Minuten in Ponceau-S-Färbelösung gefärbt und anschließend dreimal kurz mit Aqua bidest. gewaschen, um die transferierten Proteinbanden sichtbar zu machen. Zum einen kann so der Erfolg und die Qualität des Proteintransfers überprüft werden, zum anderen hat man eine Orientierung über den Verlauf der Banden, wenn man die Membran in einzelne Streifen zerschneidet. Die Sensitivität liegt bei 250-500 ng Protein (Salinovich und Montelaro 1986). Die Membranen wurden in Streifen geschnitten und anschließend in separate Inkubationskammern eingelegt. Anschließend wurden die Streifen mit PBS wieder entfärbt.

### 3.5.5 Immunblot

Nachdem die Streifen mit PBS-T-PVP über Nacht bei 4°C blockiert wurden, wurden sie mit den verdünnten Patientenseren für drei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Bei den Immunblots, bei denen die Autoantikörperreaktion auf die vier verschiedenen Herzkammern (rechter und linker Vorhof, rechte und linke Hauptkammer) getestet wurde, um eventuell Membranproteine als Autoantigene zu identifizieren, waren die Hundeseren 1:400 verdünnt. Bei den Immunblots zur Validierung der Reaktion auf die einzelnen gereinigten Kandidatenproteine (Herzmyosin<sup>42</sup>; Glyceraldehyd-3-phosphatase<sup>43</sup>; Glycogen phosphorylase, brain form<sup>44</sup>; cardiac Actin<sup>45</sup>; Aconitase<sup>46</sup>; Desmin<sup>47</sup>) als Antigenquelle wurden die Seren in einer Verdünnung von 1:5000 aufgetragen. Anschließend wurden die Streifen dreimal für je fünf Minuten mit PBS-T gewaschen. Um die gebundenen Antikörper sichtbar zu machen, wurde ein sekundärer Peroxidase (POD)-konjugierter Antikörper verwendet. Die Streifen wurden für eine Stunde mit dem in PBS-T verdünnten Kaninchen anti-Hund-IgG-POD<sup>48</sup>-Antikörper inkubiert (Verdünnung in Blots zur Identifikation von Membran-Autoantigenen 1:10000, in den Blots zur Validierung der gefundenen Autoantigene 1:50000). Die genaue Anzahl der für die Validierung verwendeten Serumproben schwankte je nach verfügbarer Proteinmenge. Vor der Sichtbarmachung des Signals durch die Enhanced-chemilumineszens (ECL)-

---

<sup>42</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>43</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>44</sup> Fa. Biomol, Hamburg

<sup>45</sup> Fa. Progen Biotechnik, Heidelberg

<sup>46</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>47</sup> Fa. Progen Biotechnik, Heidelberg

<sup>48</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

Entwicklung wurde die Membran sechsmal für je zehn Minuten in PBS-T gewaschen. Die ECL-Lösung wurde wie vorher beschrieben angesetzt und auf die Membran aufgetragen, die Detektion der Lumineszens erfolgte mit einem Röntgenfilm bei einer Belichtungszeit von 30 Sekunden bis 5 Minuten, je nach Stärke des erhaltenen Signals.

### **3.6 Massenspektrometrische Identifikation von Proteinen**

#### **3.6.1 Entfärben und Verdauen der Proteinspots**

Die massenspektrometrisch zu analysierenden Spots wurden mit einem Skalpell aus den Gelen ausgeschnitten. Vor der Rehydratation der Spots in je 100 µl Millipore-Wasser musste noch die Folie<sup>49</sup> von den Gelstücken gelöst werden, mit der die Gele bis zur weiteren Verarbeitung verpackt waren. Nach Entfernen der Plastikfolie wurden die silbergefärbten Spots mit folgenden Lösungen entfärbt:

30 mM Kaliumferricyanid<sup>50</sup> (98,76 mg ad 10 ml H<sub>2</sub>O)

100 mM Natriumthiosulfat<sup>51</sup> (248,18 mg ad 10 ml H<sub>2</sub>O)

Die frisch angemachten Lösungen wurden vor ihrer Verwendung im Verhältnis 1:2 gemischt. Die Gelstücke blieben bis zur sichtbaren Entfärbung in einer 96-Loch-Polystrol-Platte<sup>52</sup> in je 100 µl der Entfärbelösung und wurden anschließend einmal eine Minute und zweimal je fünf Minuten in H<sub>2</sub>O, sowie dreimal für je 15 Minuten in Acetonitril<sup>53</sup> (40%) gewaschen. Die mit kolloidalem Coomassie gefärbten Gele wurden nicht entfärbt.

Der Spotverdau erfolgte mit Trypsin, wodurch eine Spaltung der Proteine zwischen den Aminosäuren Arginin und Lysin stattfand und somit genau definierte Proteinfragmente resultierten. Hierzu wurde eine Trypsin-Lösung (0,5 µg Trypsin<sup>54</sup>/µl) mit einer Tris-Lösung (1mM) im Verhältnis 1:50 verdünnt. Von dieser Lösung wurden pro Spot maximal 10 µl zugegeben. Anschließend wurden die Gelstücke über Nacht bei einer Temperatur von 37°C mit der Verdauungslösung inkubiert.

---

<sup>49</sup> Fa. DETI GmbH, Mechesheim

<sup>50</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>51</sup> Fa. Merck, Darmstadt

<sup>52</sup> Fa. Nunc, Wiesbaden

<sup>53</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>54</sup> Fa. Promega, Mannheim

### 3.6.2 Massenanalyse

Die massenspektrometrische Analyse der verdauten Proteinspots erfolgte mittels MALDI-TOF peptide mass fingerprinting und MS/MS in einem MALDI-TOF/TOF tandem Massenspektrometer<sup>55</sup>.

Die Ionisation der Analytmoleküle erfolgte in Form der matrixunterstützten Laserdesorption/Ionisation (MALDI). Als Matrix diente  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure, welche in Form folgender Lösung eingesetzt wurde:

2,5 mg  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure<sup>56</sup> pro

1 ml 70% Acetonitril<sup>57</sup> + 0,1% Trifluoressigsäure<sup>58</sup>

Auf dem Probenhalter wurden je 0,5  $\mu$ l dieser Lösung mit 0,5  $\mu$ l der verdauten Probe vermischt. Nachdem das Lösungsmittel verdunstet war und damit eine Kokristallisation der Analytmoleküle mit den Matrixmolekülen eingetreten war, konnte der Probenhalter in das Massenspektrometer eingelegt werden. Nach Erzeugung eines Hochvakuums konnte der Beschuss der Kristalle mit einem UV-Laser erfolgen. Die Auftrennung der durch den Laserimpuls gebildeten und innerhalb der Ionenquelle beschleunigten Ionen erfolgte mittels eines Flugzeitanalysators (TOF-Analysator, engl. time-of-flight), der die Ionen nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis (m/z-Verhältnis) auftrennt, wobei das Verhältnis von Molekülmasse und Ladung dem Quadrat der Flugzeit proportional ist. Die Detektion der Ionen erfolgte mit Hilfe eines Sekundärelektronenvervielfachers (SEV) zur Signalverstärkung und eines Transientenrekorders zur Digitalisierung des Signals. Das digitalisierte Signal wurde in einen Computer eingelesen und mit einem Datenverarbeitungsprogramm kalibriert und analysiert. Zusätzlich zur Messung der Massenspektren der jeweiligen Peptide (peptide mass fingerprinting, PMF) erfolgte eine Sequenzanalyse der im PMF signalstärksten Peptide (MS/MS).

Zur Ermittlung der Spektren im positiven Ionen Reflektor Modus wurden 2500 Laserschüsse gemittelt und mit Hilfe einer externen Kalibrierung analysiert. Die Kalibrierung erfolgte anhand der Standardpeptide Angiotensin-2-acetat mit einer monoisotopischen Masse des [M+H]<sup>+</sup> Ionensignals bei 1046.54 Da, Substanz P (1347.74 Da), Bombesin (1619.82 Da), und ACTH 18-3 (2465.20 Da)<sup>59</sup>. Die

<sup>55</sup> ABI 4700 Proteomics Analyzer, Fa. Applied Biosystems, USA

<sup>56</sup> Fa. Bruker Daltonics, Bremen

<sup>57</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>58</sup> Fa. PerkinElmer, Rodgau - Jügesheim

<sup>59</sup> Alle Kalibrationspeptide von Fa. Sigma, Deisenhofen

Bestimmung der monoisotopischen Peakmassen mit einer minimalen relativen Intensität von fünf und einer lokalen Unschärfe mit einer Spanne von 200 m/z erfolgte automatisch innerhalb des Massenbereichs von 800-4000 kD. Bis zu sieben der intensivsten Ionensignale mit einer relativen Intensität >30 wurden als Precursor für die MS/MS-Erfassung ausgewählt, wobei Trypsin-Autolyse-Peaks und Matrixionensignale ausgeschlossen wurden. Im MS/MS positiven Ionenmodus wurden bei 1 kV Kollisionsenergie, einem Druck der Kollisionsgasluft von  $1,6 \times 10^{-6}$  torr und vorgegebener Kalibration jeweils 4000 Spektren gemittelt. Die monoisotopischen Peakmassen wurden, bei einer minimalen relativen Intensität von 10 und einer lokalen Unschärfe mit einer Spanne von 200 m/z, automatisch bestimmt.

### 3.6.3 Datenbanksuche

Mit Hilfe der MASCOT<sup>®</sup> Datenbank Suchmaschine v1.9<sup>60</sup>, die in eine GPS-Explorer Software integriert war, wurden die kombinierten PMF- und MS/MS-Peptid-Massenlisten mit den Einträgen in den öffentlichen Proteindatenbanken verglichen. Zur Ermittlung dienten die SWISS-PROT Datenbank (Version 20051206; 201594 Sequenzen) und die MSDB Metadatenbank (Version 20040703; 1501893 Sequenzen) unter Beachtung folgender Parameter:

Einträge beschränkt auf Mammalia (39612 und 252365 Sequenzen), 65 ppm Massentoleranz, 0,3 Da Fragmenttoleranz, Trypsinschnitt, maximal eine nicht geschnittene Trypsinspaltstelle, Carbamidomethylierung als feste Modifikation und Oxidation von Methioninen als variable Modifikation. Ein Protein galt als identifiziert, wenn der wahrscheinlichkeitsbasierte MOWSE Score signifikant ( $p < 0,05$ ) für die jeweilige Datenbank war (Protein Scores größer als 58 waren signifikant für SwissProt, Scores größer als 67 waren signifikant für MSDB), wenn die passenden Peptidmassen im Spektrum vorhanden waren und die theoretischen Massen der signifikanten Proteine mit den im Experiment beobachteten Werten übereinstimmten.

Die genannten Datenbanken sind über das World Wide Web frei zugänglich unter:

Mascot: <http://www.matrixscience.com>

SwissProt: <http://www.expasy.org>

MSDB: <http://csc-fserve.hh.med.ic.ac.uk/msdb.html>

---

<sup>60</sup> Matrix Science Ltd., UK

### **3.7 Densitometrische Bildanalyse der eindimensionalen Immunoblots**

Zur quantitativen Analyse der Intensität der Autoantikörperbindung in den eindimensionalen Immunblots wurden die Schwärzungsgrade der Immunblot-Signale densitometrisch bestimmt.

Hierzu wurden die entwickelten Röntgenfilme mit einem Scanner (ImageScanner)<sup>61</sup> unter Verwendung der Software LabScan 5.0<sup>62</sup> mit einer Auflösung von 600 dpi eingescannt. Die Bestimmung der Intensitäten der Signale erfolgte mit dem 1D-Analyseprogramm ImageQuantTL<sup>63</sup>. Dabei entspricht die Intensität der Stärke der Pixelintensität der jeweiligen Bande.

### **3.8 Statistische Auswertung der Autoantikörperprävalenz**

Die an DCM erkrankten Hunde wurden zunächst in drei Gruppen eingeteilt. Bei der ersten Gruppe handelte es sich um eine gemischte Gruppe von Hunden verschiedener Rassen unterschiedlichen Alters (n = 53). In der zweiten Gruppe wurden 15 an DCM erkrankte Irische Wolfshunde zusammengefasst. Die dritte Gruppe bestand aus zehn an DCM erkrankten Dobermännern. Zu jeder der drei Gruppen erkrankter Hunde wurde eine entsprechende Kontrollgruppe mit herzgesunden Hunden gebildet (gemischte Gruppe n = 32, Wolfshunde n = 15, Dobermänner n = 14).

Die Unterschiede in der Häufigkeit der Autoantikörper zwischen gesunden und an DCM erkrankten Hunden wurden mit dem Chi-Quadrat-Test statistisch überprüft. Dazu wurde das frei im Internet erhältliche Programm „Web Chi Square Calculator“ ([http://www.georgetown.edu/faculty/ballc/webtools/web\\_chi.html](http://www.georgetown.edu/faculty/ballc/webtools/web_chi.html)) verwendet.

Dabei wurden Unterschiede in der Autoantikörperhäufigkeit für jedes einzelne Autoantigen im Vergleich zwischen an DCM erkrankten und gesunden Hunden der gemischten Gruppe (gemischt), sowie zwischen an DCM erkrankten und gesunden Irischen Wolfshunden (Wolfshunde) und zwischen an DCM erkrankten und gesunden Dobermännern (Dobermänner) verifiziert. Außerdem wurden die Unterschiede in der Autoantikörperhäufigkeit berechnet, indem alle drei DCM-Gruppen (n = 78) mit allen drei herzgesunden Gruppen (n = 62) verglichen wurden. Bei Berechnungen, die alle in dieser Studie verwendeten Gruppen einbeziehen, wurden diese Gruppen

---

<sup>61</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

<sup>62</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

<sup>63</sup> Fa. GE Healthcare, Freiburg

entsprechend als „alle“ bezeichnet („Alle“ = DCM n = 78 gesamt, Kontrollen n = 62 gesamt).

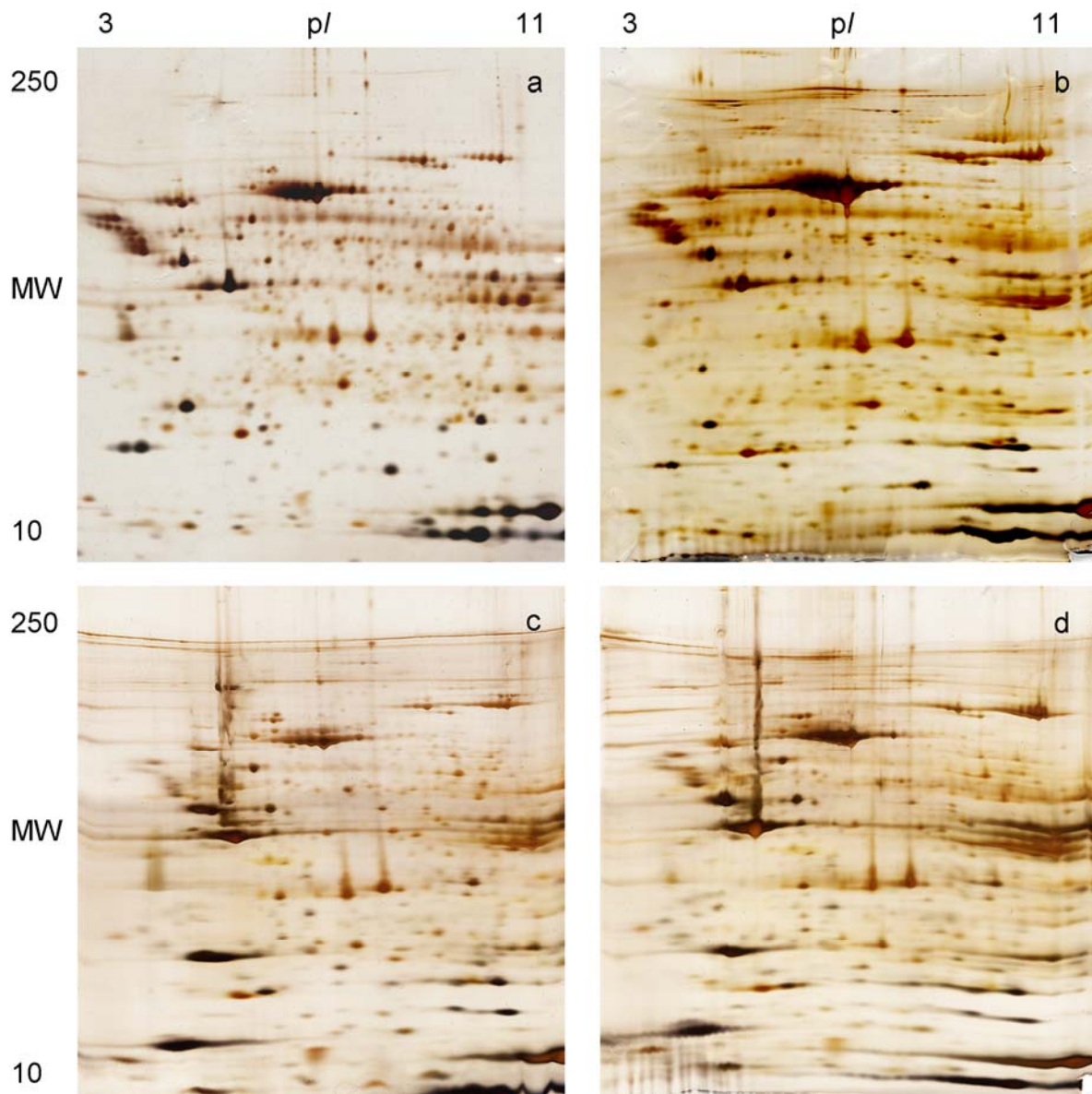


## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zweidimensionale Auftrennung von Vorhof- und Herzkammerproteom als Autoantigenquelle

Als Autoantigenquelle für die zweidimensionalen Western Blots wurden zunächst die Proteome des linken und rechten Atriums (Vorhof) sowie des linken und rechten Ventrikels (Herzkammer) mit zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt. Es wurde gesundes Herzgewebe verwendet, um die unveränderte Expression des gesamten Herzproteoms zu gewährleisten. Dabei wurden die Proteine zunächst in der ersten Dimension nach dem isoelektrischen Punkt und anschließend in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

So befinden sich im linken oberen Bereich des Gels Proteine mit hohem Molekulargewicht und einem isoelektrischen Punkt im sauren Bereich, im unteren rechten Bereich des Gels liegen entsprechend Proteine mit geringem Molekulargewicht und einem isoelektrischen Punkt im basischen Bereich (Abb. 4.1.1).



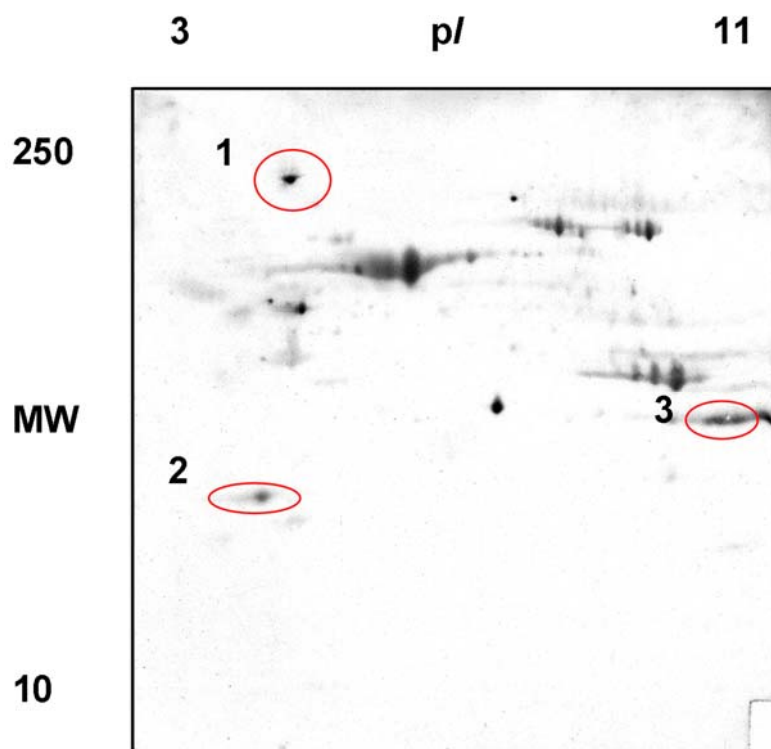
**Abb. 4.1.1** Zweidimensional aufgetrennte Proteome von Herzgewebe, Silberfärbung; a) linker Vorhof b) rechter Vorhof c) linke Kammer d) rechte Kammer Auftrennung nach isoelektrischem Punkt über pH-Gradienten von 3-11 (horizontal) und nach Molekulargewicht (vertikal, SDS-Gradient 9-15%)

Die Auftrennung des gesamten Gewebeproteoms von linkem (Abb. 4.1.1 a) und rechtem Vorhof (Abb. 4.1.1 b), sowie der linken (Abb. 4.1.1 c) und rechten Herzkammer (Abb. 4.1.1 d) über die zweidimensionale Gelelektrophorese führte zu einer hochauflösenden Proteinkarte mit mehreren hundert Proteinen. Während die Proteome der linken und rechten Seite der jeweiligen Struktur ziemlich ähnlich sind (Abb. 4.1 a/b linkes und rechtes Atrium, 4.1.1 c/d linker und rechter Ventrikel), zeigen

sich im Proteinmuster der beiden Strukturen Vorhof und Kammer erhebliche Unterschiede.

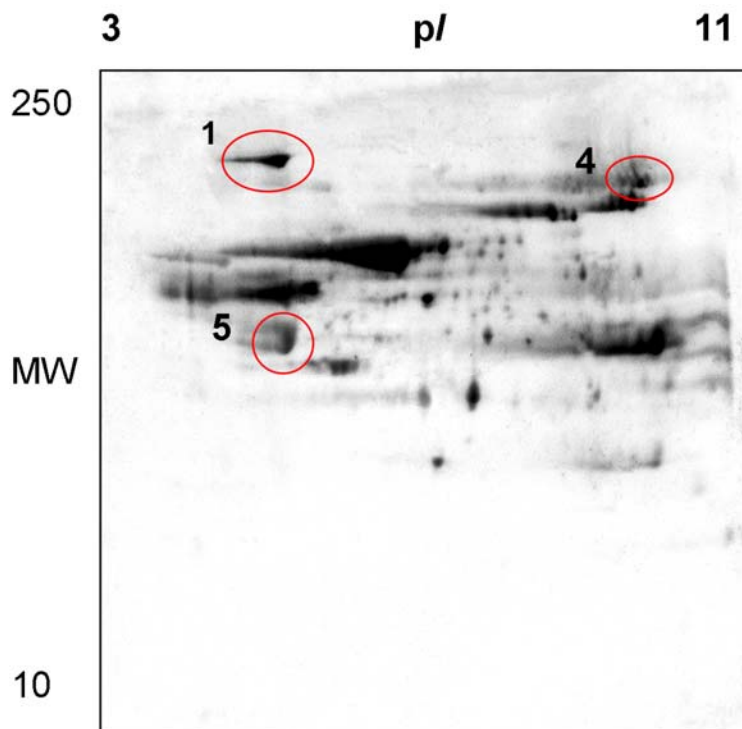
#### 4.2 Bindungsmuster von Autoantikörpern der an DCM erkrankten Hunde auf zweidimensional aufgetrennten Herzgewebeproteomen

Um die Spezifität der Autoantikörper von DCM-Tieren zu untersuchen, wurden jeweils die Proteome von Vorhof- oder Herzkammerngewebe auf Western Blot Membranen transferiert und danach mit Serum inkubiert. Auf den vier verwendeten Proteomen (Abb. 4.1.1) wurde die humorale Immunreaktion von jeweils zehn DCM-Tieren getestet und die Reaktion mit der von zehn herzgesunden Kontrolltieren verglichen. Die im Immunblot detektierten Spots wurden nach einer abschließenden kolloidalen Goldfärbung der Membranen dem korrespondierenden Spot in einem mitgeführten und mit Silber gefärbten Gel zugeordnet. Anschließend wurde der Spot aus dem Silbergel ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie identifiziert.



**Abb. 4.2.1** Immunblot mit Serum von DCM-Patient Nr. 30 auf dem Proteom des linken Vorhofes. Die häufiger von Tieren der DCM-Gruppe als von gesunden Kontrollhunden gebundenen Proteine 1, 2 und 3, sind rot umrahmt.

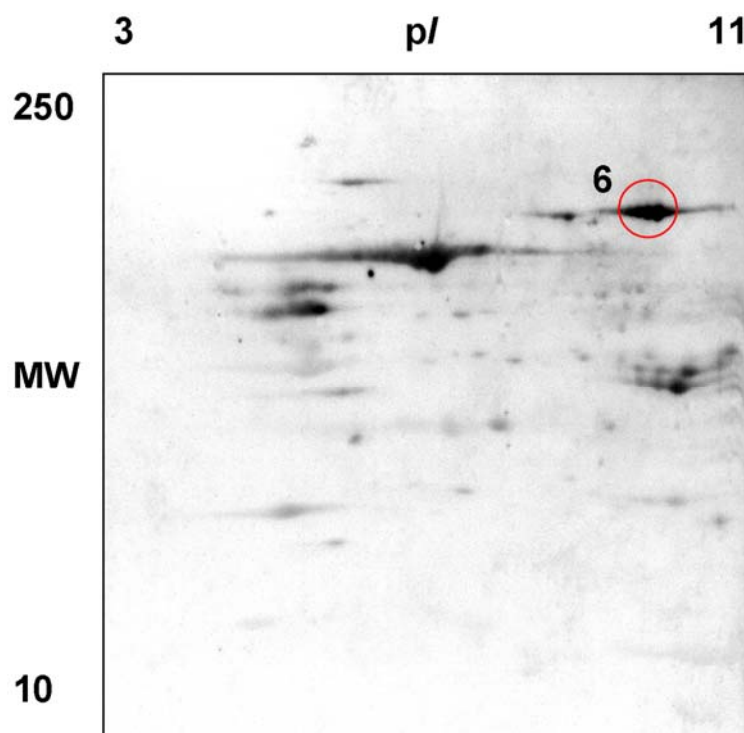
Auf der Proteinkarte des linken Vorhofes befanden sich mehrere Proteine, gegen die häufiger eine Serumreaktion von an DCM erkrankten Tieren als von den herzgesunden Kontrolltieren feststellbar war. In Abbildung 4.2.1 ist ein Western Blot mit linkem Vorhofproteom gezeigt, der mit dem Serum von DCM-Patient Nr. 30 inkubiert wurde. Die Proteinspots Nr. 1 und 2 wurden regelmäßig von DCM-Hunden gebunden. Beide Proteine liegen im sauren Bereich, unterscheiden sich aber im Molekulargewicht deutlich. Neben diesen beiden Proteinspots wurde in diesem Western Blot noch ein weiteres Protein gebunden (Abb. 4.2.1, Protein 3). Dieses Protein, ein basisches Protein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 40 kDa, wurde auch vermehrt von an DCM erkrankten Tieren gebunden. Außerdem wurden weitere Proteine gebunden, was aber auch in den anderen durchgeführten Western Blots zu erkennen war. Diese Proteine wurden regelmäßig sowohl von gesunden, als auch von kranken Tieren markiert.



**Abb. 4.2.2** Immunblot mit Serum von DCM-Patient „Ginny“ auf dem Proteom des linken Vorhofes. Die rot markierten Proteine 1, 4 und 5 wurden häufiger von Tieren der DCM-Gruppe gebunden, als von gesunden Kontrolltieren.

Einige der Patientenserum detektierten im linken Vorhofproteom mehrere der Proteine gleichzeitig, die sich in der Bindungshäufigkeit deutlich von den gesunden Tieren unterschieden. So wurden zum Beispiel vom DCM Patienten „Ginny“, neben den immer gebundenen Proteinen, zwei Proteine mit saurem isoelektrischen Punkt und unterschiedlichen Molekulargewichten (Abb. 4.2.2, Spots Nr. 1 und 5) und ein basisches Protein mit hohem Molekulargewicht markiert (Abb. 4.2.2, Spot Nr. 4). Diese drei Proteinspots wurden vermehrt von Tieren der DCM-Gruppe gebunden. Eine einzelne Bindung dieser Proteine konnte auch regelmäßig in anderen DCM-Blots beobachtet werden.

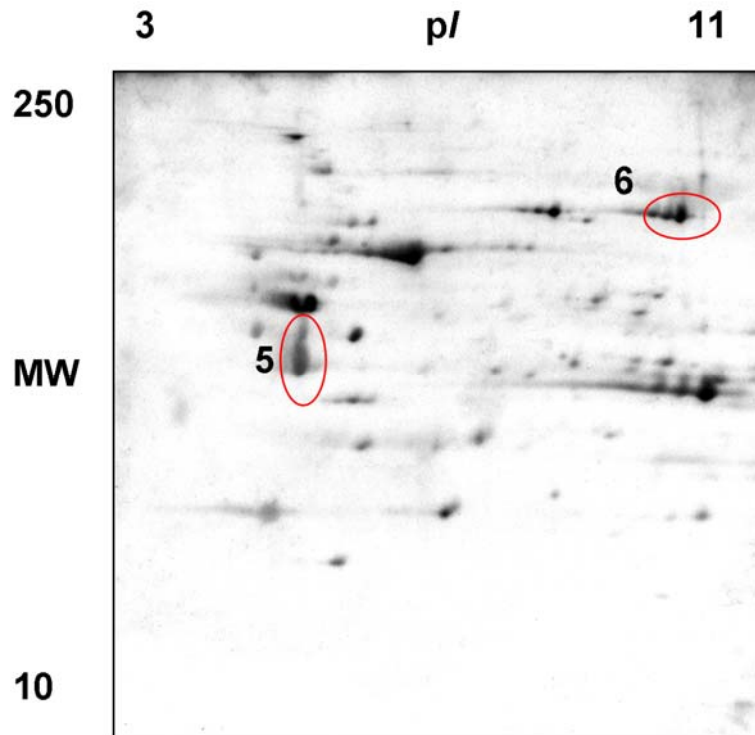
Bei Western Blots mit dem Proteom des rechten Vorhofes konnten die gleichen auffälligen Reaktionen beobachtet werden.



**Abb. 4.2.3.** Immunblot mit Serum von DCM-Patient Nr. 6 auf dem Proteom der rechten Herzkammer. Der rote Kreis zeigt Protein 6, das häufiger von Tieren der DCM-Gruppe als von gesunden Kontrolltieren gebunden wurde.

Protein 6, ein basisches Protein mit hohem Molekulargewicht, wurde häufiger von an DCM erkrankten Tieren markiert als von herzgesunden Kontrolltieren. Ein

repräsentatives Beispiel einer positiven Reaktion auf Protein 6 eines DCM Serums (Patient Nr. 6) ist in Abbildung 4.2.3 gezeigt.

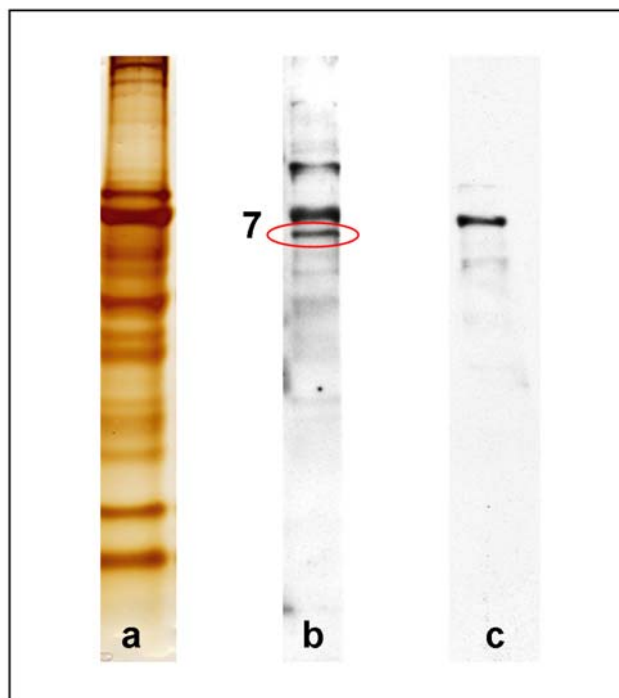


**Abb. 4.2.4** Immunblot mit Serum von DCM Patient Nr. 20 auf dem Proteom der linken Herzkammer. Die Proteine 5 und 6 (rote Markierung) wurden häufiger von Tieren der DCM-Gruppe gebunden, als von gesunden Kontrolltieren.

Die Reaktion auf Protein 6 war auch im Proteom der linken Herzkammer detektierbar (siehe Abb. 4.2.4, rechts oben, rot markiert). Darüber hinaus war häufig eine Reaktion auf Protein Nummer 5 bei DCM-Hunden im Vergleich zu den herzgesunden Kontrolltieren nachweisbar (Abb. 4.2.4, links).

#### 4.3 Bindungsmuster von Autoantikörpern der an DCM erkrankten Hunde auf eindimensional aufgetrenntem Herzgewebeextrakt

Die hochauflösende Auftrennung des Proteoms durch die zweidimensionale Gelelektrophorese ist eine sehr geeignete Technik für die Aufbereitung komplexer Proteinmuster zum Screening von Autoantikörperbindungen. Ein Nachteil der zweidimensionalen Gelelektrophorese ist allerdings der Verlust von Membranproteinen in der Auftrennung (Rabilloud 2002). Deshalb wurde zusätzlich überprüft, ob DCM-Tiere Autoantikörper gegen eine eindimensional aufgetrennte Herzpräparation aufweisen, da in dieser auch Membranproteine erfasst werden.



**Abb. 4.3.1** Immunblot mit Serum von DCM-Patient Nr.14 (b) auf eindimensional aufgetrenntem Herzgewebeextrakt (Silberfärbung, a), Proteinbande 7 wurde häufiger von DCM-Tieren gebunden. Im Vergleich Silberfärbung des 1D aufgetrennten Herzgewebeextraktes (a) und Immunblot mit Serum eines gesunden Kontrolltieres (c)

Dabei fiel in den durchgeführten 1D-Blots die Bindung eines weiteren Proteins auf (Protein 7), das von DCM-Seren erkannt wurde.



#### 4.4 Massenspektrometrische Identifikation der potenziellen DCM-Antigene

Spot ID <sup>a</sup>	Protein Name <sup>b</sup>	Species <sup>c</sup>	Accession number <sup>d</sup>	MW (Da) <sup>e</sup>	pI	Protein score <sup>g</sup>
1	Myosin heavy chain, cardiac muscle alpha isoform	Mus musculus	MYH6_MOUSE	224224	5,57	226
2	Myosin light polypeptide 4	Rattus norvegicus	MYL4_RAT	21137	4,96	259
3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Sus scrofa	G3P_PIG	35910	8,52	239
4	Glycogen phosphorylase, brain form	Rattus norvegicus	PYGB_Rat	96174	6,24	230
5	Actin, alpha cardiac	Mus musculus	ACTC_MOUSE	42334	5,23	286
6	Aconitate hydratase, mitochondrial	Sus scrofa	ACON_PIG	86448	8,24	181
7	Desmin	Bos taurus	DESM_BOVIN	53522	5,21	390

**Tab. 4.4.1 Massenspektrometrisch identifizierte Proteine im Herzgewebe von Hunden**

- a) Nummer des korrespondierenden Spots bzw. Bande in Abb. 4.2.1 - 4.3.1
- b) Name des identifizierten Proteins, wie in SwissProt Datenbank (<http://www.expasy.org>) geführt
- c) Spezies, bei der das entsprechende Protein die größte Homologie zum identifizierten Protein aufweist
- d) Entry name, wie in SwissProt Datenbank geführt
- e) Theoretisches Molekulargewicht des identifizierten Proteins (Dalton)
- f) Theoretischer isoelektrischer Punkt des identifizierten Proteins (pI)
- g) Wahrscheinlichkeitsbasierter MOWSE Score, wie von Mascot gegeben.

Dieser Score ist der negative dekadische Logarithmus für die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei dem Treffer um ein Zufallsereignis handelt. Die angegebenen Proteine wiesen einen signifikanten Score ( $p < 0,05$ ) auf, wobei Scores größer als 58 für die Suche in der SwissProt Datenbank signifikant waren.



Die ausgewählten Proteinspots oder Proteinbanden wurden mit Hilfe von Massenspektrometrie identifiziert (MALDI-TOF-TOF). Die resultierenden Peptiddaten wurden mit der Datenbank Swiss-Prot ausgewertet. Alle Proteine konnten eindeutig identifiziert werden (Tab. 4.4.1).

Bei Protein 1 handelt es sich um eine schwere Kette des Myosins, Herzmuskel-alpha-Isoform, die ausschließlich im Vorhof exprimiert wird.

Protein 2, ein saures Protein mit niedrigem Molekulargewicht wurde als Myosin light polypeptide 4 identifiziert. Dieses Myosin kommt in embryonalen Muskelzellen, aber auch in Muskelzellen des Vorhofes vor.

Protein 3 konnte eindeutig als Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) identifiziert werden. GAPDH ist ubiquitär im Zytoplasma der Zelle lokalisiert und spielt eine Rolle bei der Glykolyse.

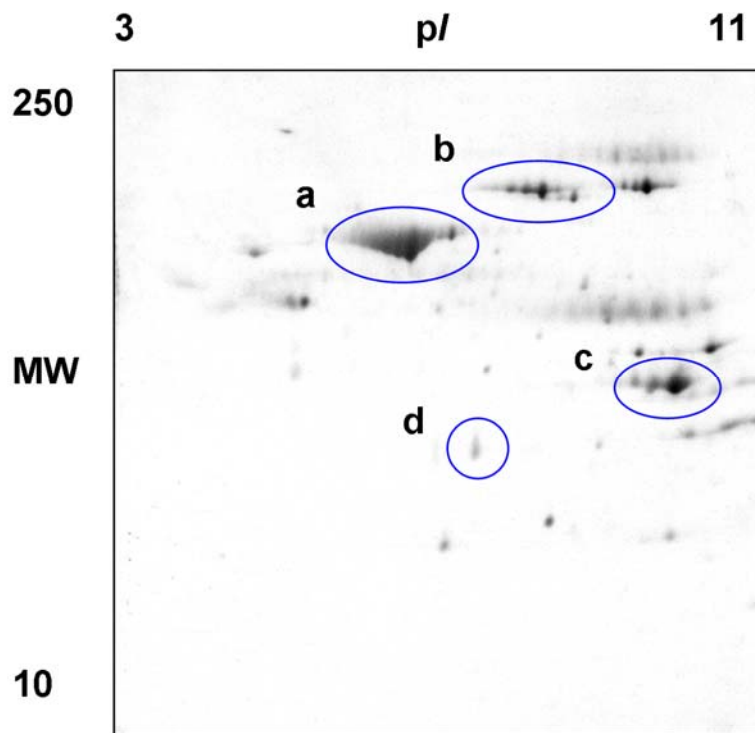
Protein 4 wurde als Glycogen phosphorylase, brain form (GPBB) identifiziert. Die GPBB ist ein wichtiges allosterisches Enzym im Kohlenhydrat-Stoffwechsel.

Protein 5 konnte als alpha cardiac Actin identifiziert werden. Diese Form des Actins wird nur im Herzen exprimiert. Actin stellt einen wesentlichen Bestandteil des kontraktiven Apparates dar.

Protein 6 wurde als mitochondriale Aconitat Hydratase (Aconitase) identifiziert. Aconitase spielt eine Rolle im Zitratzyklus und ist deshalb ubiquitär exprimiert.

Die aus dem eindimensionalen Gel stammende Proteinbande Nr. 7 konnte massenspektrometrisch als Desmin identifiziert werden. Desmin ist ein Intermediärfilament, das in allen Muskelzellen zu finden ist.

#### 4.5 Generelle Antikörperbindungsmuster von an DCM erkrankten und gesunden Tieren



**Abb. 4.5.1** Immunblot mit Serum von Kontrollhund Nr. 10 auf dem Proteom des rechten Vorhofes. Generelle humorale Reaktion auf Herzproteine. Protein a, b, c und d wurden regelmäßig sowohl von DCM kranken, als auch von herzgesunden Hunden gebunden.

Gegen mehrere Proteine waren sowohl bei kranken, als auch bei gesunden Kontrolltieren regelmäßig Reaktionen nachweisbar, ohne dass sich Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten (Abb. 4.5.1). Besonders auffällig war hier Spot a, der durch eine sehr starke Markierung auffiel (blau markiert, mittig oben). Protein a, mit einem mittleren Molekulargewicht, liegt im leicht sauren Bereich. Des Weiteren wurden Protein b (basisch, hohes Molekulargewicht), c (basisch, mittleres Molekulargewicht) und d (leicht basisch, niedriges Molekulargewicht) häufig von beiden Gruppen gebunden.

#### 4.6 Massenspektrometrische Identifikation der regelmäßig von beiden Gruppen gebundenen Proteine

Spot ID <sup>a</sup>	Protein name <sup>b</sup>	Species <sup>c</sup>	Accession number <sup>d</sup>	MW (Da) <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Protein score <sup>g</sup>
a	Serum albumin precursor	<i>Equus caballus</i>	ALBU_HORSE	70550	5,95	454
b	Serotransferrin precursor	<i>Equus caballus</i>	TRFE_HORSE	80268	6,83	635
c	Creatine kinase M-type	<i>Sus scrofa</i>	KCRM_PIG	43259	6,61	245
d	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	<i>Bos taurus</i>	MDHC_BOVIN	36307	6,24	307

**Tab. 4.6.1** Massenspektrometrische Identifikation der Proteine des Herzproteoms, die regelmäßig von Seren beider Gruppen gebunden wurden.

Die hochgestellten Buchstaben sind in der Legende von Tab. 4.4.1 erläutert.

Auch diese Proteine wurden mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF-TOF) analysiert. Die resultierenden Peptiddaten wurden mit den Datenbanken Swiss-Prot und MSDB ausgewertet. Wiederum konnten alle Proteine eindeutig identifiziert werden (Tab. 4.6.1).

Bei den Proteinen, gegen die sich die humorale Immunreaktion zwischen kranken und gesunden Hunden nicht unterschied, handelte es sich um Serum-Albumin (a), Serotransferrin (b), Kreatinkinase, M-Typ (c) und die zytoplasmatische Malat-Dehydrogenase (d).

Serum-Albumin ist eines der häufigsten Plasmaproteine. Seine Hauptfunktion ist die Regulation des kolloidosmotischen Druckes im Blut. Außerdem dient es als Transportprotein.

Serotransferrine sind eisenbindende Transportproteine, die für die Eisenversorgung der Körperzellen verantwortlich sind.

Isoenzyme der Kreatinkinase spielen eine zentrale Rolle bei der Energie-Transduktion in Geweben mit hohem Energiebedarf, wie zum Beispiel im Skelett- und Herzmuskel.

Die zytoplasmatische Malat-Dehydrogenase ist ein Enzym, das am Zitratzyklus beteiligt ist.

#### **4.7 Validierung der potenziellen Autoantigene**

Nach der Identifikation von sieben potenziellen Autoantigenen bei der DCM des Hundes erfolgte ein breites Screening auf die einzelnen, hochgereinigten Kandidatenproteine. Dies diente zum einen dazu, zu bestätigen, ob die Immunreaktion tatsächlich gegen die identifizierten Proteine gerichtet ist und zum anderen zur statistischen Überprüfung der jeweiligen Autoantikörperhäufigkeit. Dazu wurde die Immunreaktion von 78 an DCM erkrankten Hunden und von 62 gesunden Kontrolltieren auf das jeweilige Kandidatenantigen überprüft.

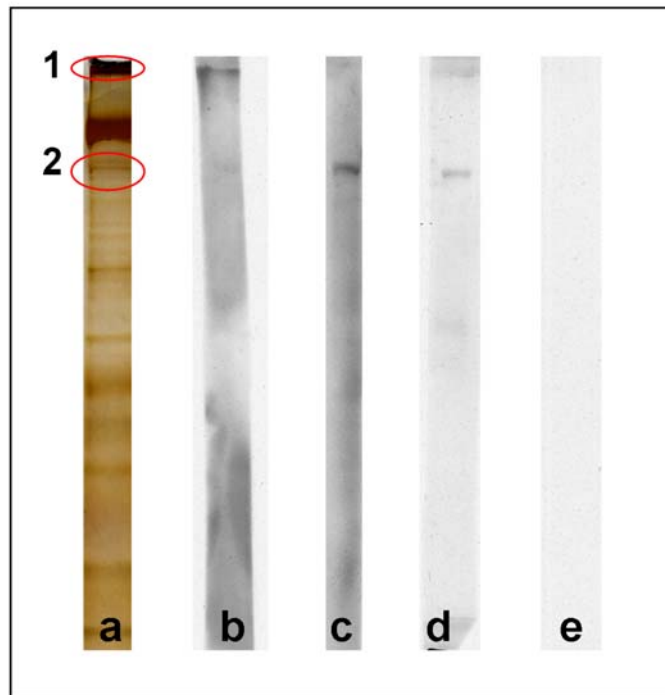
Dabei wurden Western Blots mit den gereinigten Kandidatenproteinen als Antigene durchgeführt.

Da bei mehreren Präparationen trotz Verwendung jeweils nur eines gereinigten Proteins, offensichtlich mehrere Banden im Blot markiert wurden, erfolgte die statistische Auswertung für jede Bande gesondert.

Anschließend wurde wiederum per Massenspektrometrie ermittelt, welche Proteine in den jeweiligen Präparationen enthalten waren und gegen welche die Autoantikörper gerichtet waren. Die Prävalenz der Autoantikörper-positiven Tiere wurde im Chi-Quadrat Test jeweils zwischen allen an DCM erkrankten Tieren und allen herzgesunden Kontrollen verglichen (alle), sowie getrennt für die gemischte Gruppe DCM erkrankter Hunde und gesunder Kontrollhunde (gemischt), die Gruppe DCM-kranker und gesunder Wolfshunde (Wolfshunde) und die Gruppe der an DCM erkrankten und gesunden Dobermänner (Dobermänner).

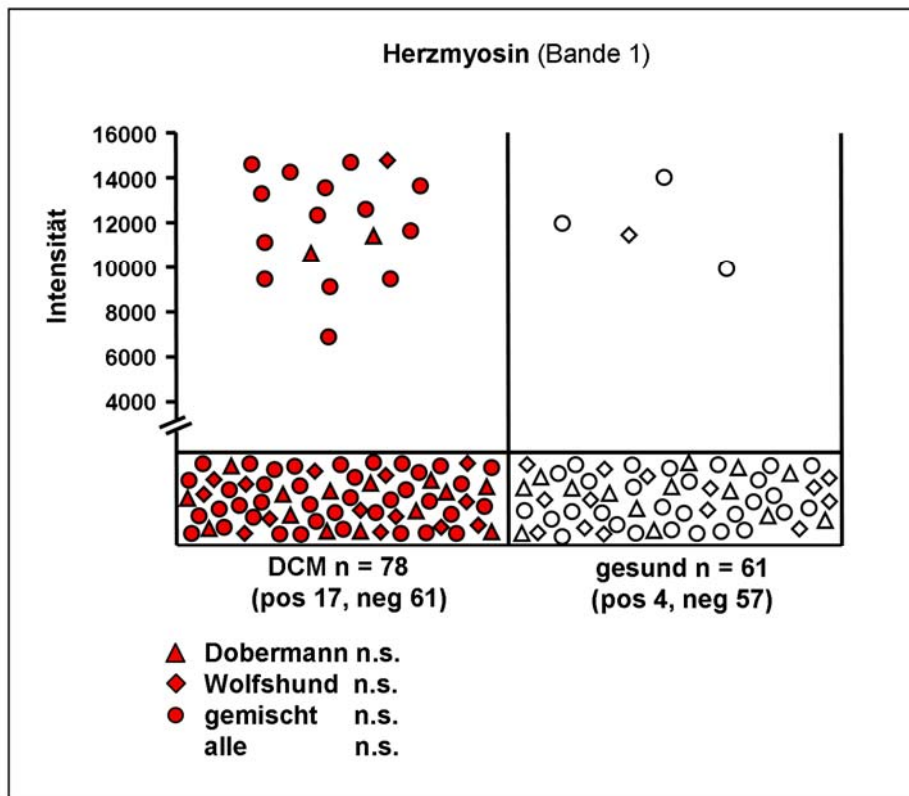
## 4.8 Herzmyosin

### 4.8.1 Eindimensionale Western Blots auf gereinigtem Herzmyosin



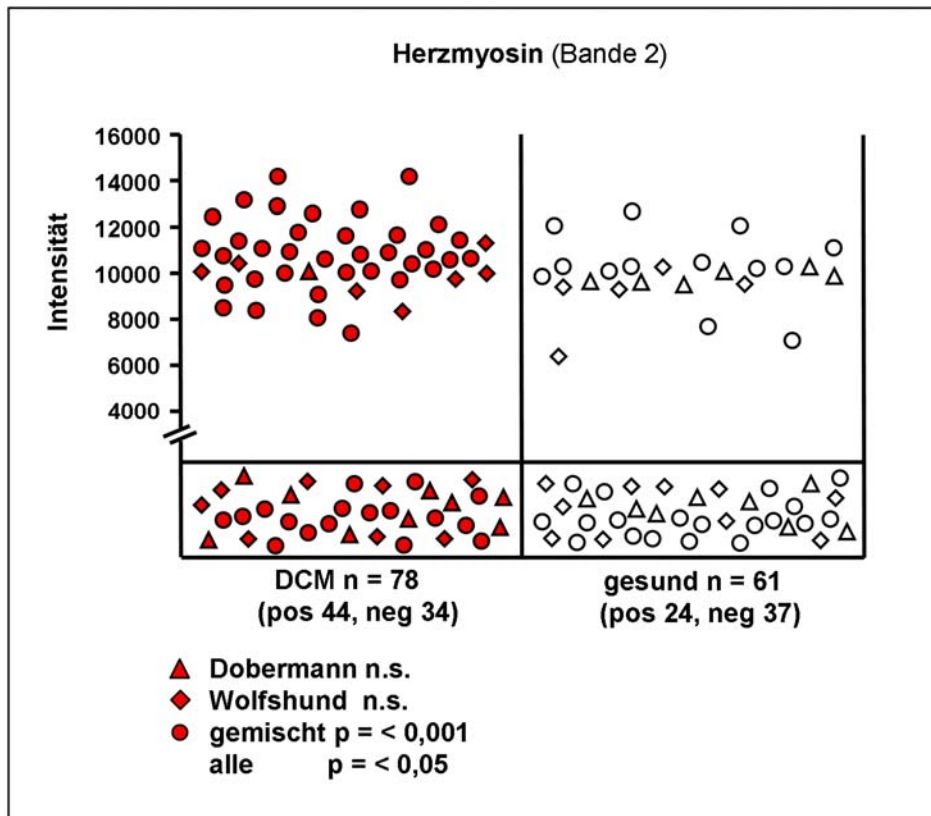
**Abb. 4.8.1** a) Gereinigtes Herzmyosin, aufgetrennt in 4-20% SDS Gel, Silberfärbung, mehrere Banden sichtbar. b) - e) Beispiele für auftretende Reaktivitäten im Western Blot, b) Positive Reaktion nur mit Bande 1, DCM Tier Nr. 58 c) nur mit Bande 2, DCM Tier Nr. 19 d) Bande 1 und 2 markiert, DCM Tier Nr. 46 e) negativ, Kontrolltier „Luzi“.

Die 78 DCM-Seren und 61 Seren von herzgesunden Kontrollhunden wurden in 1D Western Blots auf ihre Reaktivitäten auf gereinigtes Herzmyosin getestet. In der parallel angefertigten Silberfärbung des im 4-20% SDS Gel aufgetrennten Herzmyosins waren mehrere angefärbte Banden zu erkennen. In den 1D Western Blots fanden mit zwei der Banden positive Reaktionen statt (Abb. 4.8.1 Bande 1 und 2). Die Banden wurden entweder einzeln (Abb. 4.8.1 b und c) oder in Kombination markiert (Abb. 4.8.1 d). Die Mehrzahl der herzgesunden Tiere markierte im Gegensatz zu den an DCM erkrankten Hunden keine Bande (Abb. 4.8.1 e). Exemplarisch wurden in Abbildung 4.8.1 die Western Blots der DCM-Hunde Nr.58 (b), 19 (c) und 46 (d) und des Kontrollhundes „Luzi“ (e) dargestellt.



**Abb. 4.8.2** Screening von 78 DCM- und 61 Kontrollseren auf gereinigtem Herzmyosin (Bande 1, Abb. 4.8.1), linke Spalte DCM-Tiere, rechte Spalte gesunde Tiere. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier, positive Tiere liegen oberhalb der Linie. ● : an DCM erkrankter Hund der gemischten Gruppe, ◆ : an DCM erkrankter Wolfshund, ▲ : an DCM erkrankter Dobermann, ○ : gesunder Hund der gemischten Gruppe, ◇ : gesunder Wolfshund, △ : gesunder Dobermann. Auf der y-Achse wird die Intensität der Bande angezeigt. In keiner der Gruppen konnte ein signifikanter Unterschied in der Autoantikörperhäufigkeit festgestellt werden. (n.s = Autoantikörperhäufigkeit DCM vs. gesund nicht signifikant im Chi-Quadrat Test).

Die Ergebnisse der 1D-Western Blots auf gereinigtem Herzmyosin (Bande 1) wurden in einem Diagramm dargestellt. Auf der y-Achse wird die Intensität der Bandenschwärzung angezeigt. Links, rot markiert, sind die DCM-Tiere dargestellt, rechts, weiß, die herzgesunden Kontrolltiere. 17 von 78 kranken und 4 von 61 gesunden Tieren wiesen Autoantikörper gegen Bande 1 der Herzmyosinpräparation auf. Mit Verwendung des Chi-Quadrat Tests konnte kein signifikanter Unterschied in der Autoantikörperhäufigkeit zwischen den jeweiligen Gruppen festgestellt werden.



**Abb. 4.8.3** Screening von 78 DCM- und 61 Kontrollseren auf gereinigtem Herzmyosin (Bande 2, Abb. 4.8.1); links DCM-Tiere, rechts gesunde Tiere. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier, positive Tiere liegen oberhalb der Linie. ● : an DCM erkrankter Hund der gemischten Gruppe, ◆ : an DCM erkrankter Wolfshund, ▲ : an DCM erkrankter Dobermann, ○ : gesunder Hund der gemischten Gruppe, ◇ : gesunder Wolfshund, △ : gesunder Dobermann. Auf der y-Achse wird die Intensität der Bande angezeigt. In der gemischten DCM-Gruppe konnte eine signifikant erhöhte Häufigkeit der Markierung der Bande 2 festgestellt werden ( $p \leq 0,001$ ). In der Wolfshunde- und der Dobermann-Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die Auswertung der Western Blots der Herzmyosinpräparation auf Bande 2 ergab 44 positive DCM-Tiere und 24 positive gesunde Kontrolltiere. Mittels des Chi-Quadrat-Tests konnte in der gemischten Gruppe von DCM-Tieren und herzgesunden Kontrolltieren ein signifikanter Unterschied ( $p \leq 0,001$ ) zwischen den Gruppen festgestellt werden. Bande 2 des Herzmyosins wurde signifikant häufiger von DCM-Seren markiert, als von Seren herzgesunder Kontrollhunde. In den Wolfshunde- und Dobermann-Gruppen konnte dagegen kein signifikanter Unterschied in der Autoantikörperbindung erkannt werden. Auch die Berechnung der Autoantikörperhäufigkeit unter Einbeziehung aller an DCM erkrankten Tiere im

Vergleich zu allen gesunden Kontrollhunden ergab einen signifikanten Unterschied (Gruppe „alle“,  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.8.2 Massenspektrometrische Identifikation der markierten Banden

<b>Banden Nr.<sup>a</sup></b>	<b>Protein Name<sup>b</sup></b>	<b>Species<sup>c</sup></b>	<b>Accession number<sup>d</sup></b>	<b>MW (Da)<sup>e</sup></b>	<b>pI<sup>f</sup></b>	<b>Protein score<sup>g</sup></b>
1	<i>Myosin heavy chain, cardiac muscle beta isoform</i>	<i>Sus scrofa</i>	<i>MYH7_PIG</i>	222973	5,56	416
	<b>und</b> <i>Myosin heavy chain, cardiac muscle alpha isoform</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>MYH6_HUMAN</i>	223550	5,6	266
2	<i>Myosin heavy chain, cardiac muscle beta isoform</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>MYH7_RAT</i>	222945	5,64	352
	<b>und</b> <i>Myosin heavy chain, cardiac muscle alpha isoform</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>MYH6_MOUSE</i>	223426	5,57	213

**Tab. 4.8.4** Massenspektrometrisch identifizierte Proteine aus der gereinigten Herzmyosin Präparation.

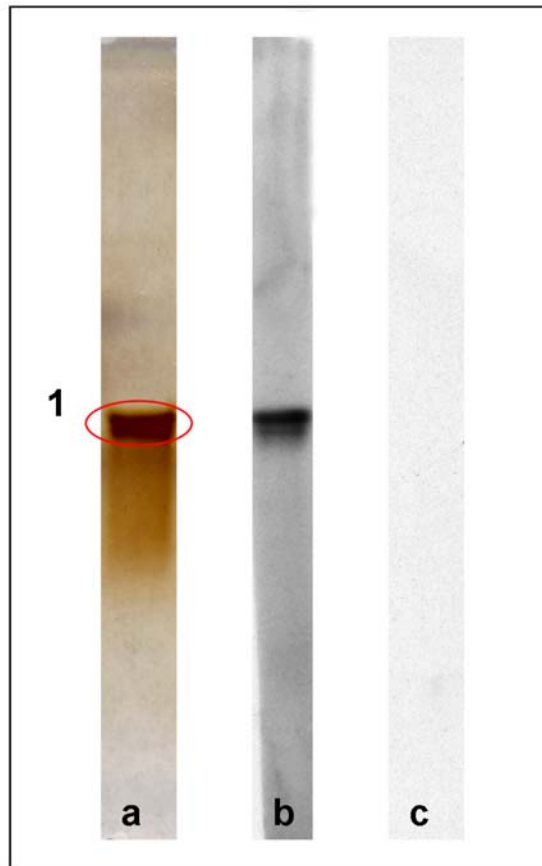
Die hochgestellten Buchstaben sind in der Legende von Tab .4.4.1 erläutert.

Mit Hilfe von Massenspektrometrie konnten beide ausgeschnittenen Banden eindeutig identifiziert werden. In beiden Fällen handelte es sich um die schwere Kette des Herzmyosins.



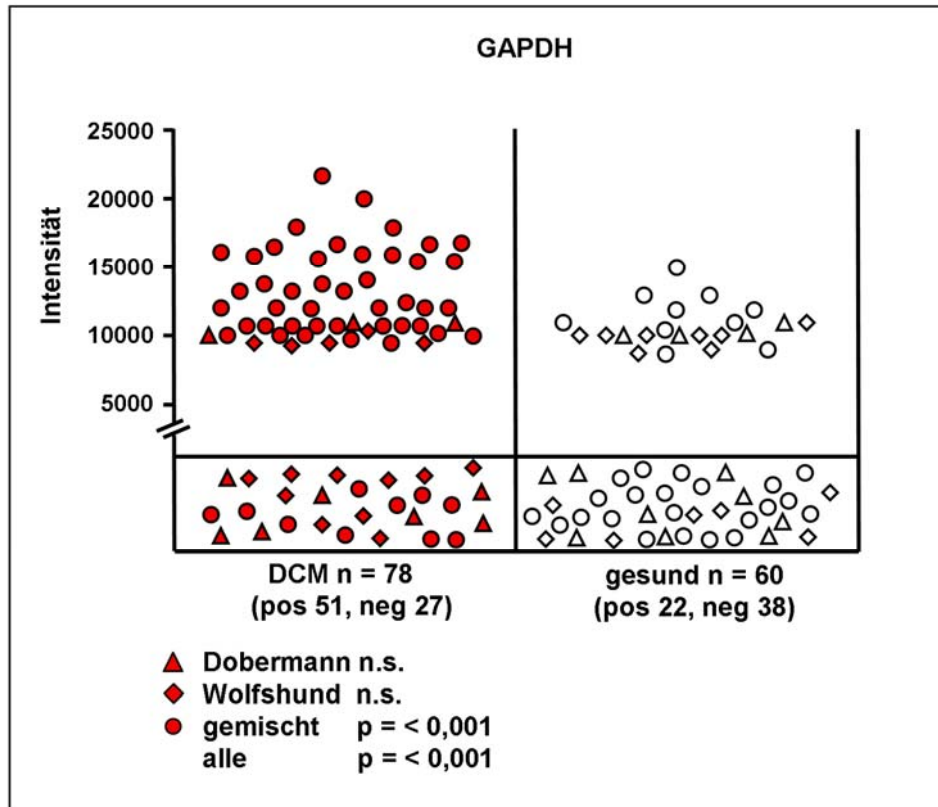
## 4.9 Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

### 4.9.1 Eindimensionale Western Blots auf gereinigter GAPDH



**Abb. 4.9.1** a) Gereinigte Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), aufgetrennt in 4-20% SDS Gel, Silberfärbung, eine Bande sichtbar. b) Bande 1 markiert, Patient Nr. 48, c) negativ, Kontrollhund „Hope“.

Die 78 DCM-Seren und die 60 Seren von herzgesunden Kontrollhunden wurden in 1D-Western Blots auf ihre Reaktivitäten auf gereinigte Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) getestet. In der parallel angefertigten Silberfärbung der im 4-20% SDS Gel aufgetrennten GAPDH ist eine angefärbte Bande zu erkennen (Abb. 4.9.1 a). Exemplarisch wurde in Abbildung 4.9.1 die positive Reaktion des DCM-Patienten Nr. 48 (Abb. 4.9.1 b) und die negative Reaktion von Kontrollhund „Hope“ (Abb. 4.9.1 c) dargestellt. Von den herzgesunden Hunden wurde die Bande seltener erkannt als von den DCM-Hunden.



**Abb. 4.9.2** Screening von 78 DCM- und 60 Kontrollseren auf gereinigter GAPDH (Bande 1, Abb. 4.4.9), links DCM-Tiere, rechts gesunde Tiere. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier, positive Tiere liegen oberhalb der Linie. ● : an DCM erkrankter Hund der gemischten Gruppe, ◆ : an DCM erkrankter Wolfshund, ▲ : an DCM erkrankter Dobermann, ○ : gesunder Hund der gemischten Gruppe, ◇ : gesunder Wolfshund, △ : gesunder Dobermann. Auf der y-Achse wird die Intensität der Bande angezeigt. In der gemischten DCM-Gruppe konnte eine signifikant erhöhte Markierung der Bande 1 festgestellt werden ( $p \leq 0,001$ ). In der Wolfshunde- und der Doberman-Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied (n.s.) festgestellt werden.

Bei 51 von 78 erkrankten Hunden und bei 22 von 60 gesunden Kontrollhunden fand im eindimensionalen Western Blot eine positive Reaktion statt. Mit Verwendung des Chi-Quadrat-Tests konnte in der gemischten Gruppe von DCM-Tieren und herzgesunden Kontrolltieren ein signifikanter Unterschied in der Autoantikörperhäufigkeit ( $p \leq 0,001$ ) zwischen den Gruppen festgestellt werden. Die GAPDH wurde signifikant häufiger von Seren erkrankter Hunde markiert als von Seren herzgesunder Kontrollhunde (alle,  $p \leq 0,001$ ). In den Wolfshunde- und Dobermann-Gruppen konnte hingegen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (n.s.).

#### 4.9.2 Massenspektrometrische Identifikation der markierten Bande

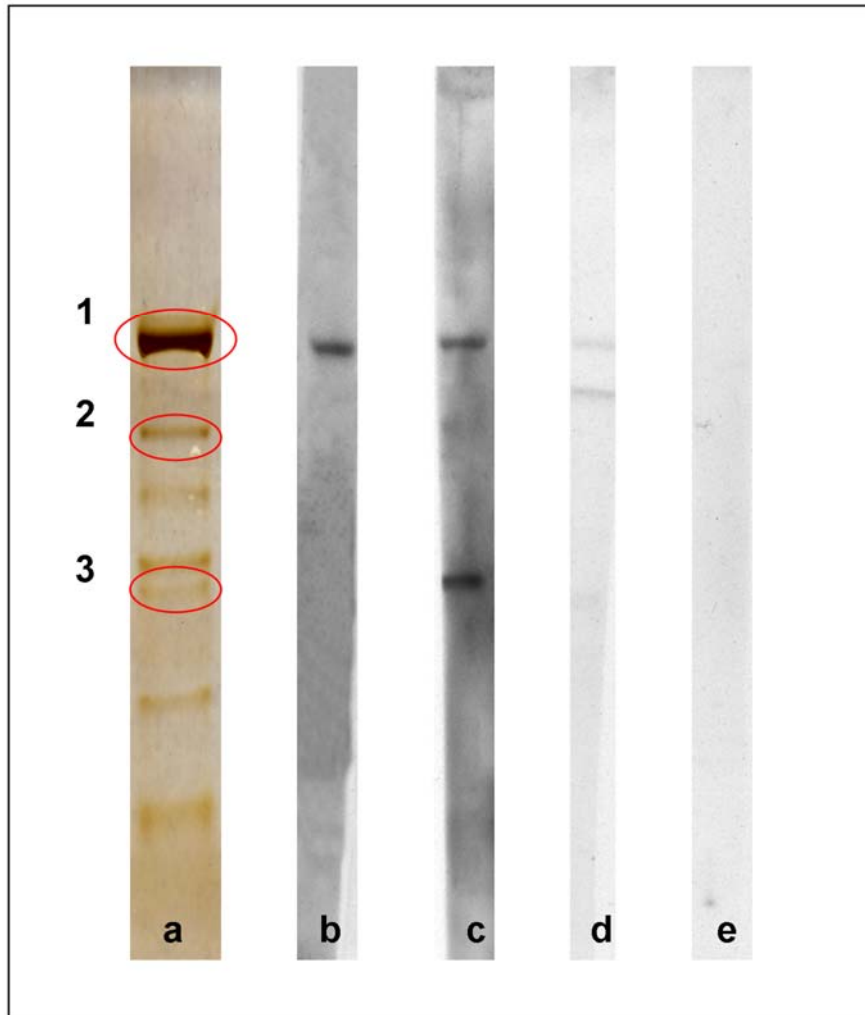
<b>Banden Nr.<sup>a</sup></b>	<b>Protein Name<sup>b</sup></b>	<b>Species<sup>c</sup></b>	<b>Accession number<sup>d</sup></b>	<b>MW (Da)<sup>e</sup></b>	<b>pI<sup>f</sup></b>	<b>Protein score<sup>g</sup></b>
1	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	Sus scrofa	G3P_PIG	35682	8,52	418

**Tab. Nr. 4.9.3** Massenspektrometrisch identifiziertes Protein aus der gereinigten GAPDH Präparation. Die hochgestellten Buchstaben sind in der Legende von Tab. 4.4.1 erläutert.

Die aus dem Silbergel (Abb. 4.9.1, a) ausgeschnittene Bande konnte massenspektrometrisch eindeutig als Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bestätigt werden.

## 4.10 Glycogen Phosphorylase, brain form (GPBB)

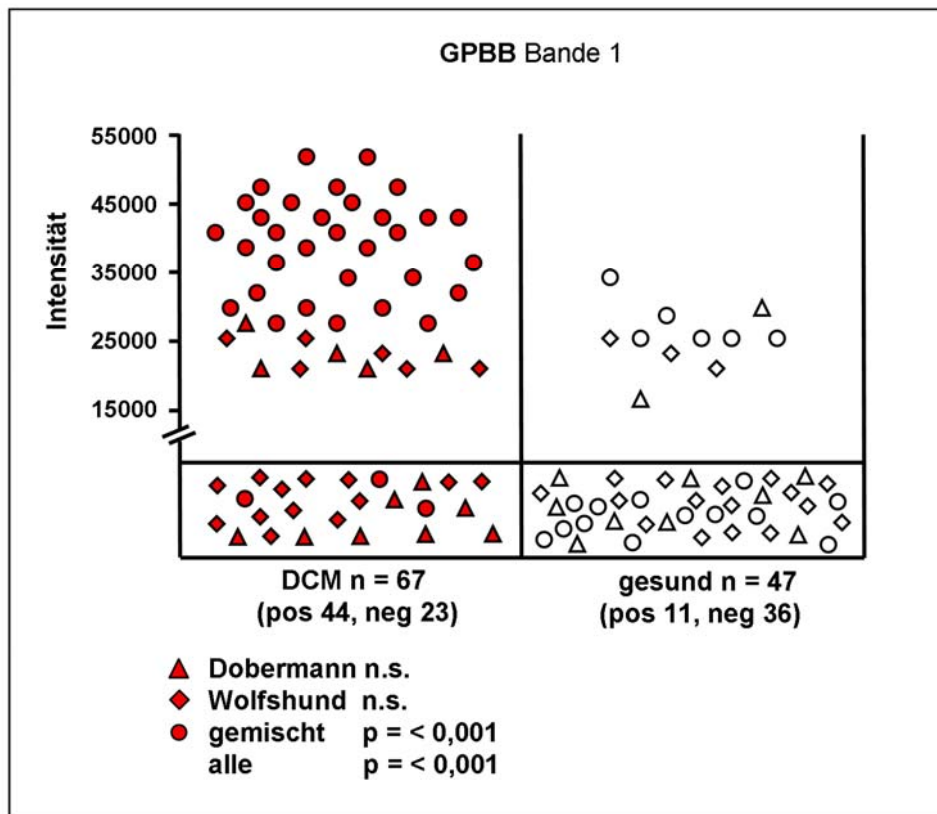
### 4.10.1 Eindimensionale Western Blots auf gereinigter GPBB



**Abb. 4.10.1** a) Gereinigte Glycogen Phosphorylase, brain form (GPBB) aufgetrennt in 4-20% SDS Gel, Silberfärbung, 7 Banden sichtbar. b) – d) Auftretende Reaktivitäten im Western Blot, b) Positive Reaktion nur mit Bande 1, Patient Nr. 36, c) Bande 1 und 3, Patient Nr. 10 aus der gemischten Gruppe, d) Bande 1 und 2 markiert, Patient Nr. 25, e) Negativ, Kontrollhund „Miles“.

67 DCM-Seren und 47 Seren von herzgesunden Kontrollhunden wurden in 1D Western Blots auf ihre Reaktivitäten auf gereinigte Glycogen Phosphorylase, brain form (GPBB) getestet. In der parallel angefertigten Silberfärbung der im 4-20% SDS Gel aufgetrennten GPBB sind sieben angefärbte Banden zu erkennen (Abb. 4.10.1 a). In den 1D Western Blots fanden mit drei der Banden positive Reaktionen statt (Abb. 4.10.1 Bande 1, 2 und 3). Beispielhaft sind in Abbildung 4.10.1 die positiven

Reaktionen von Patient Nr. 36, 10 und 25 aus der gemischten Gruppe und die negative Reaktion vom gesunden Kontrolltier „Miles“ dargestellt. Die Banden wurden entweder einzeln (Abb. 4.10.1 b, Patient Nr. 36) oder in Kombination gebunden (Abb. 4.10.1 c, d, Patient Nr. 10 der gemischten Gruppe und Patient Nr. 25). Die Mehrheit der herzgesunden Tiere markierte keine Bande (Abb. 4.10.1 e, Kontrollhund „Miles“).



**Abb. 4.10.2** Screening von 67 DCM- und 47 Kontrollseren auf gereinigter GPBB (Bande 1, Abb.4.10.1), links DCM-Tiere, rechts gesunde Tiere. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier, positive Tiere liegen oberhalb der Linie. ● : an DCM erkrankter Hund der gemischten Gruppe, ◆ : an DCM erkrankter Wolfshund, ▲ : an DCM erkrankter Dobermann, ○ : gesunder Hund der gemischten Gruppe, ◇ : gesunder Wolfshund, △ : gesunder Dobermann. Auf der y-Achse wird die Intensität der Bande angezeigt. In der gemischten DCM-Gruppe konnte eine signifikant erhöhte Markierung der Bande 1 festgestellt werden ( $p \leq 0,001$ ). In der Wolfshunde- und der Dobermann-Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

44 der 67 Patientenseren und 11 der 47 Kontrollseren gesunder Hunde markierten Bande 1 des GPBB. Mit Verwendung des Chi-Quadrat-Tests konnte in der gemischten Gruppe von DCM-Tieren und herzgesunden Kontrolltieren ein signifikanter Unterschied in der Autoantikörperhäufigkeit ( $p \leq 0,001$ ) zwischen den

Gruppen festgestellt werden. Die GPBB wurde signifikant häufiger von DCM-Seren markiert, als von Seren herzgesunder Kontrolltiere (alle,  $p \leq 0,001$ ). Zwischen den Wolfshunde- und Dobermann-Gruppen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied erkannt werden (n.s.).

#### 4.10.2 Massenspektrometrische Identifikation der markierten Banden

<b>Banden Nr.<sup>a</sup></b>	<b>Protein Name<sup>b</sup></b>	<b>Species<sup>c</sup></b>	<b>Accession number<sup>d</sup></b>	<b>MW (Da)<sup>e</sup></b>	<b>pI</b>	<b>Protein score<sup>g</sup></b>
1	Glycogen phosphorylase, brain form	Homo sapiens	PYGB_HUMAN	96503	6,41	749
2	Serum albumin precursor	Bos taurus	ALBU_BOVIN	69248	5,82	224
	<b>und</b> Glycogen phosphorylase, brain form	Homo sapiens	PYGB_HUMAN	96503	6,41	88
3	Glycogen phosphorylase, brain form	Homo sapiens	PYGB_HUMAN	96503	6,41	47

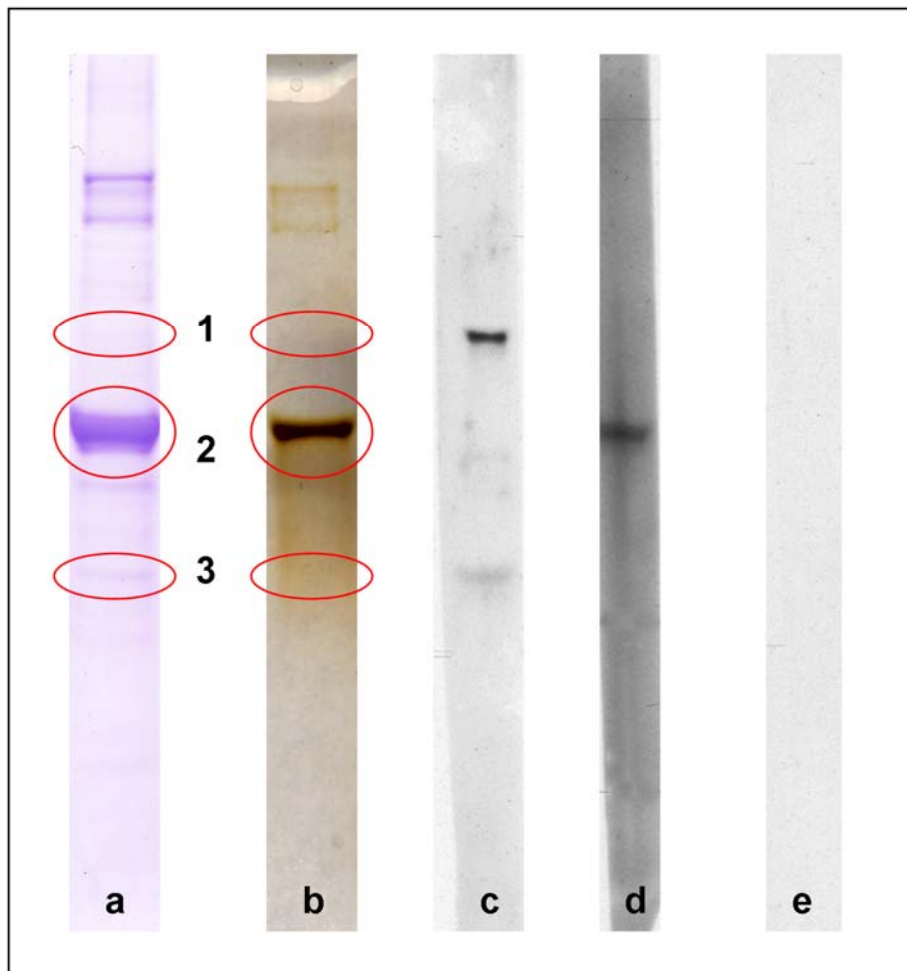
**Tab. 4.10.3** Massenspektrometrisch identifizierte Proteine aus der gereinigten GPBB Präparation.

Die hochgestellten Buchstaben sind in der Legende von Tab. 4.4.1 erläutert.

Die drei aus dem Silbergel (Abb. 4.10.1, a) ausgeschnittenen Banden, gegen die im Western Blot Reaktionen auftraten, konnten mit Massenspektrometrie eindeutig identifiziert werden. Es handelte sich bei allen drei Banden um Glycogen Phosphorylase, brain form. Bei der zweiten Bande konnte zusätzlich Serum Albumin massenspektrometrisch identifiziert werden.

## 4.11 Cardiac Actin

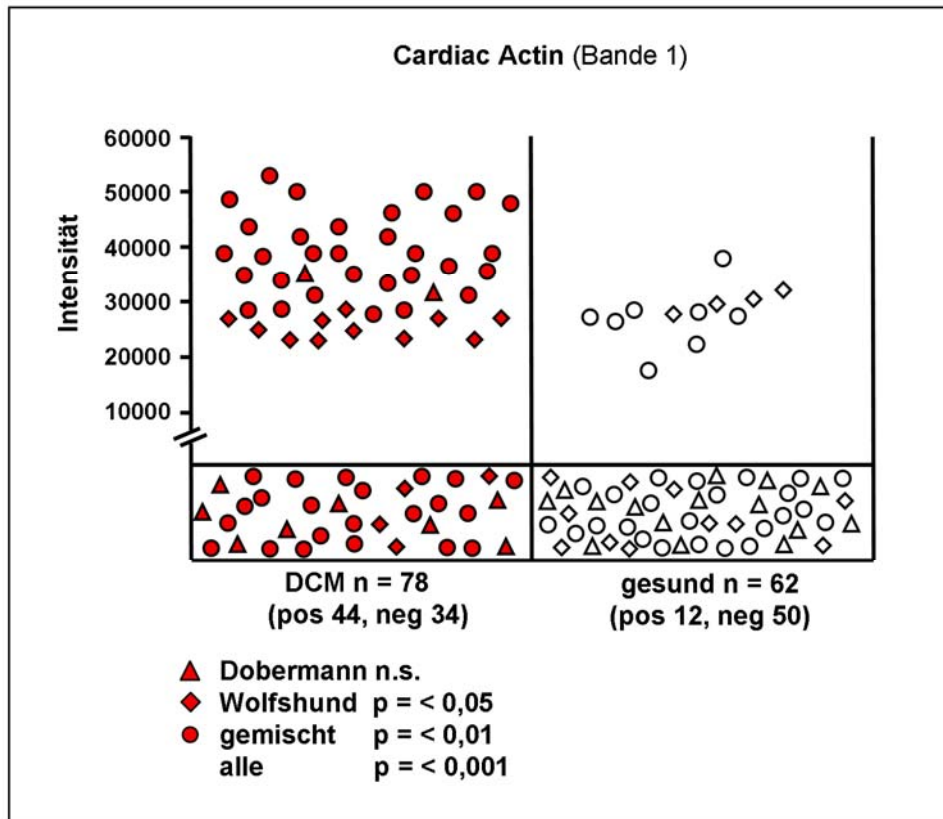
### 4.11.1 Eindimensionale Western Blots auf gereinigtem cardiac Actin



**Abb. 4.11.1** Gereinigtes cardiac Actin, aufgetrennt in 4-20% SDS-Gel, gefärbt mit kolloidaler Coomassie-Färbung (a) und Silberfärbung (b), mehrere Banden sichtbar, c - e) Auftretende Reaktivitäten im Western Blot, c) Positive Reaktion mit Bande 1 und 3, Patient Nr. 22, d) Positive Reaktion mit Bande 2, Patient Nr. 6 der gemischten Gruppe, e) keine Reaktion, Kontrollhund „Dina“.

78 DCM-Seren und 62 Seren von herzgesunden Kontrollhunden wurden in 1D Western Blots auf ihre Reaktivitäten auf gereinigtes cardiac Actin getestet. In den gleichzeitig angefertigten Färbungen (kolloidales Coomassie, a und Silberfärbung, b) des im 4-20% SDS Gel aufgetrennten cardiac Actins sind mehrere angefärbte Banden zu sehen (Abb. 4.11.1 a und b). Aufgrund der schwachen Anfärbung der Banden wurden zwei verschiedene Färbungen durchgeführt. In den 1D Western Blots fanden mit drei der Banden positive Reaktionen statt (Abb. 4.11.1, Bande 1, 2

und 3). Exemplarisch sind die Immunblots der Patienten Nr. 22 (Markierung der Banden 1 und 3) und Nr. 6 (Markierung der Bande 2) und des Kontrolltieres „Dina“ (keine Reaktion) dargestellt. Von den herzgesunden Hunden wurden seltener Banden gebunden als von den DCM-Hunden (Abb. 4.11.1 e).

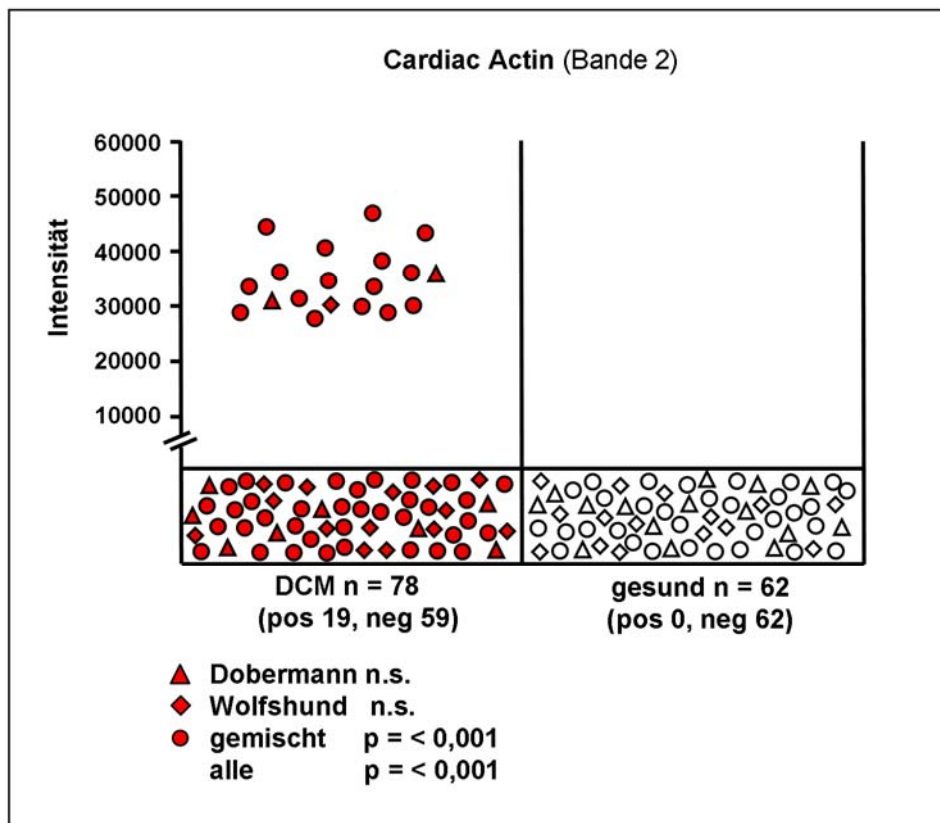


**Abb. 4.11.2** Screening von 78 DCM- und 62 Kontrollseren auf gereinigtem cardiac Actin (Bande 1, Abb. 4.11.2), links DCM-Tiere, rechts gesunde Tiere. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier, positive Tiere liegen oberhalb der Linie. ● : an DCM erkrankter Hund der gemischten Gruppe, ◆ : an DCM erkrankter Wolfshund, ▲ : an DCM erkrankter Dobermann, ○ : gesunder Hund der gemischten Gruppe, ◇ : gesunder Wolfshund, △ : gesunder Dobermann. Auf der y-Achse wird die Intensität der Bande angezeigt. In der gemischten DCM-Gruppe konnte eine signifikant erhöhte Häufigkeit der Markierung der Bande 1 festgestellt werden ( $p \leq 0,01$ ). Dieser Unterschied ergab sich auch für die Gruppe der an DCM erkrankten Wolfshunde ( $p \leq 0,05$ ). In der Dobermann-Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

44 der 78 an DCM erkrankten Hunde und 12 der 62 Kontrollhunde markierten cardiac Actin, Bande 1. Mit Verwendung des Chi-Quadrat-Tests konnte in der gemischten Gruppe von DCM-Tieren und herzgesunden Kontrolltieren ein signifikanter Unterschied ( $p \leq 0,01$ ) zwischen den Gruppen festgestellt werden. Auch zwischen



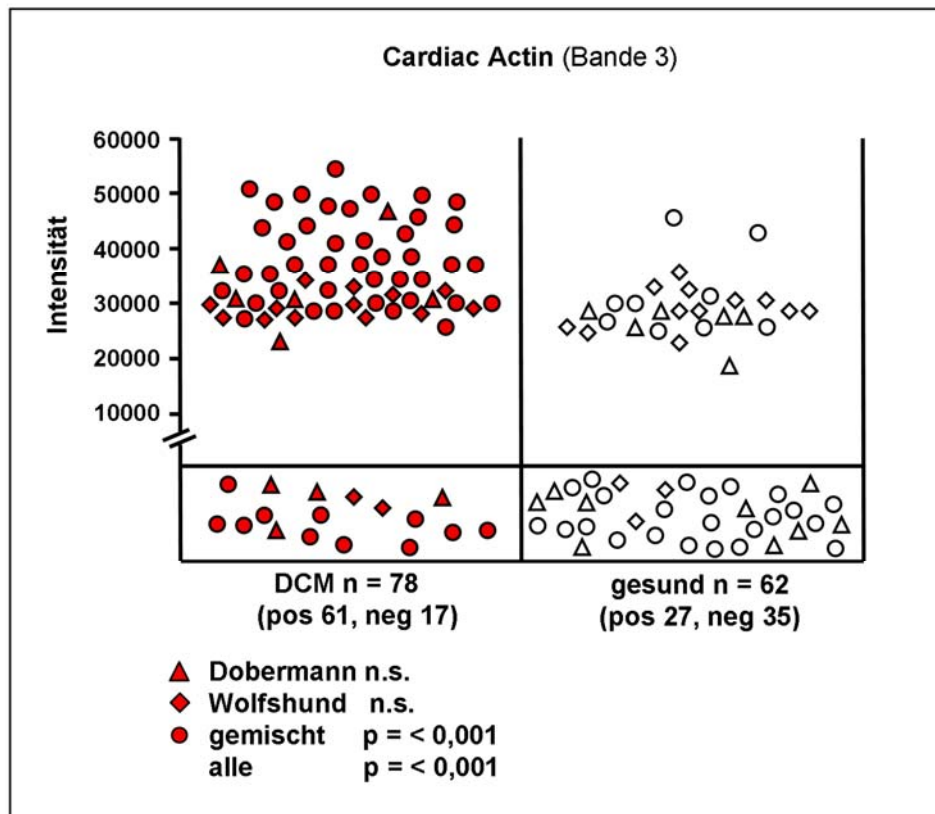
den DCM-Wolfshunden und den herzgesunden Wolfshunden konnte ein signifikanter Unterschied ( $p \leq 0,05$ ) bemerkt werden. Das cardiac Actin (Bande 1) wurde signifikant häufiger von DCM-Seren markiert als von Seren herzgesunder Kontrolltiere („alle“,  $p \leq 0,001$ ). Zwischen den Dobermann-Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.



**Abb. 4.11.3** Screening von 78 DCM- und 62 Kontrollseren auf gereinigtem cardiac Actin (Bande 2, Abb.4.11.2), links DCM-Tiere, rechts gesunde Tiere. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier, positive Tiere liegen oberhalb der Linie. ● : an DCM erkrankter Hund der gemischten Gruppe, ◆ : an DCM erkrankter Wolfshund, ▲ : an DCM erkrankter Dobermann, ○ : gesunder Hund der gemischten Gruppe, ◇ : gesunder Wolfshund, △ : gesunder Dobermann. Auf der y-Achse wird die Intensität der Bande angezeigt. In der gemischten DCM-Gruppe konnte eine signifikant erhöhte Häufigkeit der Markierung der Bande 2 festgestellt werden ( $p \leq 0,001$ ). In der Wolfshunde- und der Doberman-Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Von den 78 Seren der an DCM erkrankten Hunden reagierten 19 Seren positiv auf cardiac Actin, Bande 2. Bei keinem der 62 Seren von herzgesunden Kontrollhunden fand eine positive Reaktion statt. Mit Verwendung des Chi-Quadrat-Tests konnte in der gemischten Gruppe von DCM-Tieren und herzgesunden Kontrolltieren ein

signifikanter Unterschied in der Autoantikörperhäufigkeit ( $p \leq 0,001$ ) zwischen den Gruppen festgestellt werden. Das cardiac Actin (Bande 2) wurde signifikant häufiger von DCM-Seren gebunden als von Seren herzgesunder Kontrolltiere („alle“,  $p \leq 0,001$ ). In den Wolfshunde- und Dobermann-Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied erkannt werden (n.s.).



**Abb. 4.11.4** Screening von 78 DCM- und 62 Kontrollseren auf gereinigtem cardiac Actin (Bande 3, Abb.4.11.2), links DCM-Tiere, rechts gesunde Tiere. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier, positive Tiere oberhalb der Linie. ● : an DCM erkrankter Hund der gemischten Gruppe, ◆ : an DCM erkrankter Wolfshund, ▲ : an DCM erkrankter Dobermann, ○ : gesunder Hund der gemischten Gruppe, ◇ : gesunder Wolfshund, △ : gesunder Dobermann. Auf der y-Achse wird die Intensität der Bande angezeigt. In der gemischten DCM-Gruppe konnte eine signifikant erhöhte Markierung der Bande 3 festgestellt werden ( $p \leq 0,001$ ). In der Wolfshunde- und der Dobermann-Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

61 der 78 DCM-Hunde und 27 der 62 Kontrollhunde markierten cardiac Actin, Bande 3. Mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests konnte in der gemischten Gruppe von DCM-Tieren und herzgesunden Kontrolltieren ein signifikanter Unterschied in der Autoantikörperhäufigkeit ( $p \leq 0,001$ ) zwischen den Gruppen festgestellt werden. Das

cardiac Actin wurde signifikant häufiger von DCM-Seren markiert, als von Seren herzgesunder Kontrolltiere (alle,  $p \leq 0,001$ ). In den Wolfshunde- und Dobermann-Gruppen hingegen konnte kein signifikanter Unterschied erkannt werden.

#### 4.11.2 Massenspektrometrische Identifikation der markierten Banden

<b>Banden Nr.<sup>a</sup></b>	<b>Protein Name<sup>b</sup></b>	<b>Species<sup>c</sup></b>	<b>Accession number<sup>d</sup></b>	<b>MW (Da)<sup>e</sup></b>	<b>pI<sup>f</sup></b>	<b>Protein score<sup>g</sup></b>
1	Actin, alpha cardiac	Mus musculus	ACTC_MOUSE	41992	5,23	127
2	Actin, alpha cardiac	Mus musculus	ACTC_MOUSE	41992	5,23	445
3	Actin, alpha cardiac	Mus musculus	ACTC_MOUSE	41992	5,23	183

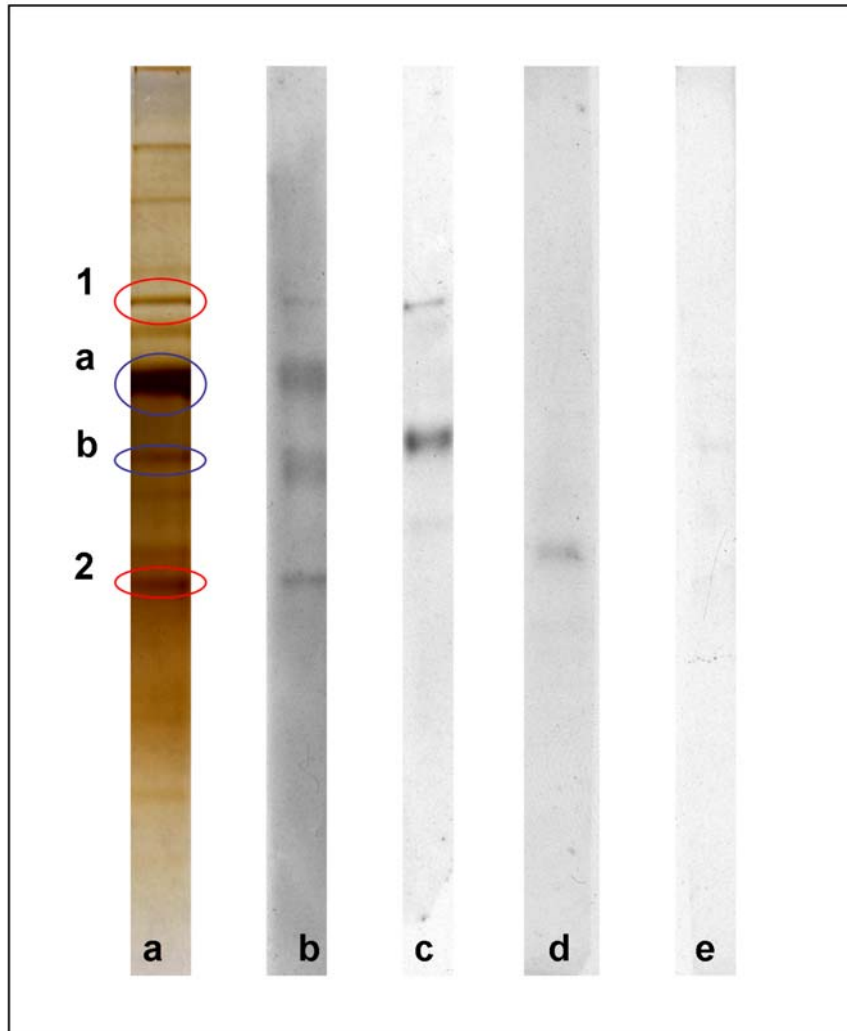
**Tab. Nr. 4.11.5** Massenspektrometrisch identifizierte Proteine aus der gereinigten cardiac Actin Präparation.

Die hochgestellten Buchstaben sind in der Legende von Tab. 4.4.1 erläutert.

Alle drei aus dem Silbergel oder dem mit kolloidalem Coomassie gefärbten Gel (Abb. 4.11.1 a und b) ausgeschnittenen Banden konnten eindeutig identifiziert werden. Es handelte sich bei allen drei Proteinen um alpha cardiac Actin.

## 4.12 Aconitase

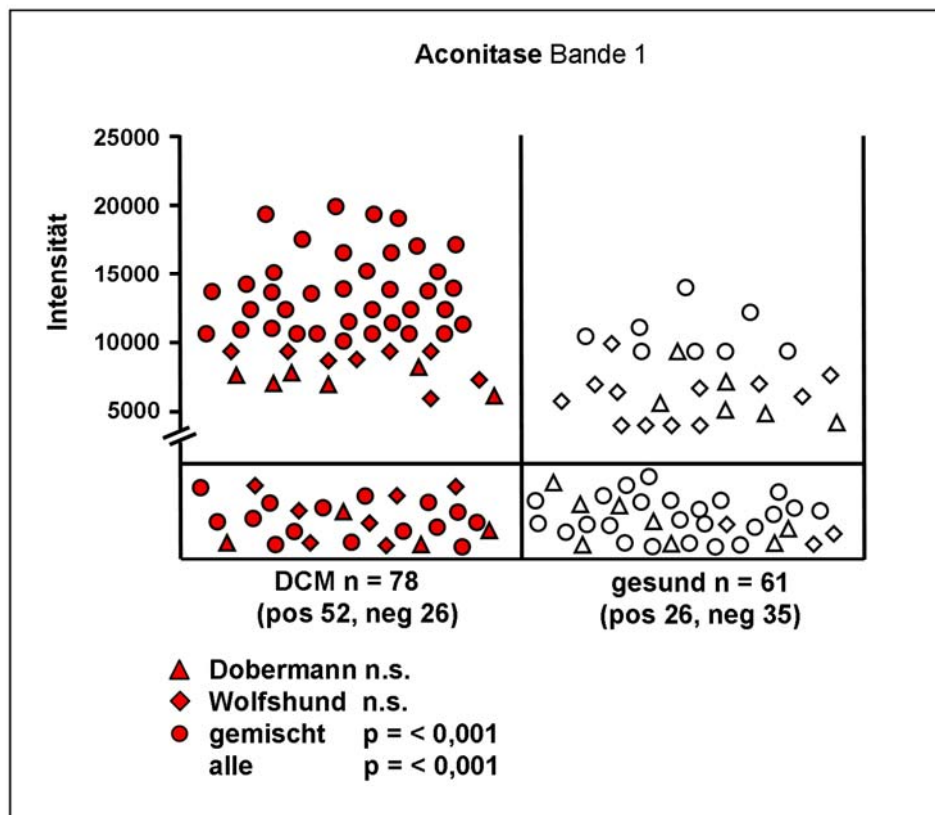
### 4.12.1 Eindimensionale Western Blots auf gereinigter Aconitase



**Abb. 4.12.1** a) gereinigte Aconitase, aufgetrennt in 4-20% SDS Gel, Silberfärbung, mehrere Banden sichtbar. b) – d) Auftretende Reaktivitäten im Western Blot, b) Positive Reaktion auf die Banden 1, 2, a und b, Patient Nr. 4, c) positive Reaktion auf Bande 1 und b, Patient Nr. 14 der Dobermann-Gruppe d) nur Bande 2 markiert, Patient Nr. 43 der Dobermann-Gruppe, e) keine Reaktion, Kontrollhund „Zoe“.

Die 78 DCM-Seren und 61 Seren von herzgesunden Kontrollhunden wurden in 1D Western Blots auf ihre Reaktivitäten auf gereinigte Aconitase getestet. In der gleichzeitig durchgeführten Silberfärbung der im 4-20% SDS Gel aufgetrennten Aconitase sind mehrere angefärbte Banden zu erkennen (Abb. 4.12.1 a). In den 1D Western Blots fanden mit vier der Banden positive Reaktionen statt (Abb. 4.12.1 Bande 1, 2, a und b). Von den herzgesunden Hunden wurden die Banden 1 und 2

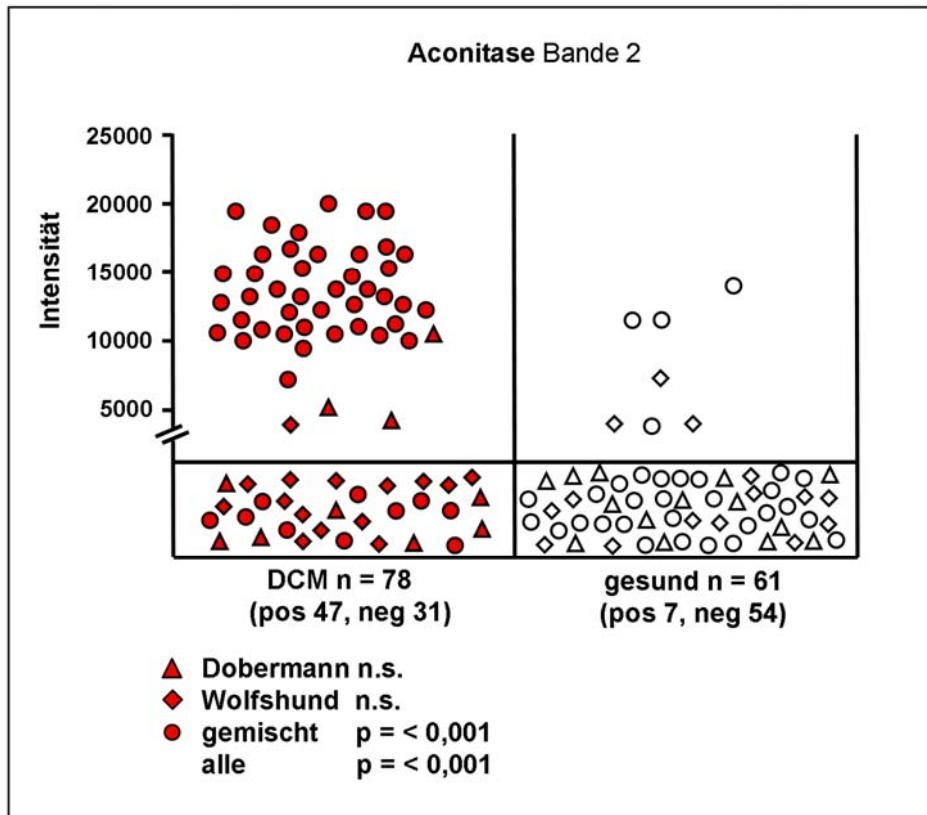
seltener markiert als von den DCM-Hunden. Die Mehrzahl der herzgesunden Tiere markierte keine der beiden rot hervorgehobenen Banden (Abb. 4.4.12 e).



**Abb. 4.12.2** Screening von 78 DCM- und 61 Kontrollseren auf gereinigter Aconitase (Bande 1, Abb. 4.12.1), links DCM-Tiere rechts gesunde Tiere. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier, positive Tiere liegen oberhalb der Linie. ● : an DCM erkrankter Hund der gemischten Gruppe, ◆ : an DCM erkrankter Wolfshund, ▲ : an DCM erkrankter Dobermann, ○ : gesunder Hund der gemischten Gruppe, ◇ : gesunder Wolfshund, △ : gesunder Dobermann. Auf der y-Achse wird die Intensität der Bande angezeigt. In der gemischten DCM-Gruppe konnte eine signifikant erhöhte Markierung der Bande 1 festgestellt werden ( $p \leq 0,001$ ). In der Wolfshunde- und der Dobermann-Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied in der Autoantikörperhäufigkeit festgestellt werden.

Die Auswertung der Western Blots der Aconitasepräparation auf Bande 1 ergab 52 positive DCM-Tiere und 26 positive gesunde Kontrolltiere. Mittels des Chi-Quadrat-Tests konnte in der gemischten Gruppe von DCM-Tieren und herzgesunden Kontrolltieren ein signifikanter Unterschied in der Antikörperhäufigkeit ( $p \leq 0,001$ ) zwischen den Gruppen festgestellt werden. Die Aconitase (Bande 1) wurde signifikant häufiger von DCM-Seren markiert als von Seren herzgesunder

Kontrolltiere („alle“,  $p \leq 0,001$ ). In den Wolfshunde- und Dobermann-Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied erkannt werden (n.s.).



**Abb. 4.12.3** Screening von 78 DCM- und 61 Kontrollseren auf gereinigter Aconitase (Bande 4, Abb.4.12.1), links DCM-Tiere, rechts gesunde Tiere. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier, positive Tiere liegen oberhalb der Linie. ● : an DCM erkrankter Hund der gemischten Gruppe, ◆ : an DCM erkrankter Wolfshund, ▲ : an DCM erkrankter Dobermann, ○ : gesunder Hund der gemischten Gruppe, ◇ : gesunder Wolfshund, △ : gesunder Dobermann. Auf der y-Achse wird die Intensität der Bande angezeigt. In der gemischten DCM-Gruppe konnte eine signifikant erhöhte Markierung der Bande 2 festgestellt werden ( $p \leq 0,001$ ). In der Wolfshunde- und der Dobermann-Gruppe konnte hingegen kein signifikanter Unterschied in der Autoantikörperbindung festgestellt werden.

47 der 78 an DCM erkrankten Hunde und 7 der 61 getesteten gesunden Kontrollhunde reagierten positiv mit Bande 2 der Aconitasepräparation. Mit Verwendung des Chi-Quadrat-Tests konnte in der gemischten Gruppe von DCM-Tieren und herzgesunden Kontrolltieren ein signifikanter Unterschied ( $p \leq 0,001$ ) zwischen den Gruppen festgestellt werden. Die Aconitase (Bande 2) wurde signifikant häufiger von DCM-Seren markiert als von Seren herzgesunder

Kontrolltiere (alle,  $p \leq 0,001$ ). In den Wolfshunde- und Dobermann-Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

#### 4.12.2 Massenspektrometrische Identifikation der markierten Banden

<b>Banden Nr.<sup>a</sup></b>	<b>Protein Name<sup>b</sup></b>	<b>Species<sup>c</sup></b>	<b>Accession number<sup>d</sup></b>	<b>MW (Da)<sup>e</sup></b>	<b>pI<sup>f</sup></b>	<b>Protein score<sup>g</sup></b>
1	Aconitate hydratase, mitochondrial precursor	<i>Sus scrofa</i>	ACON_PIG	85707	8,24	504
2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Sus scrofa</i>	G3P_PIG	35682	8,52	279
a	Serum albumin precursor	<i>Mus musculus</i>	ALBU_MOUSE	68648	5,75	66
b	Serum albumin precursor	<i>Sus scrofa</i>	ALBU_PIG	69647	6,08	470

**Tab. 4.12.4** Massenspektrometrisch identifizierte Proteine aus der gereinigten Aconitase-Präparation.

Die hochgestellten Buchstaben sind in der Legende von Tab. 4.4.1 erläutert.

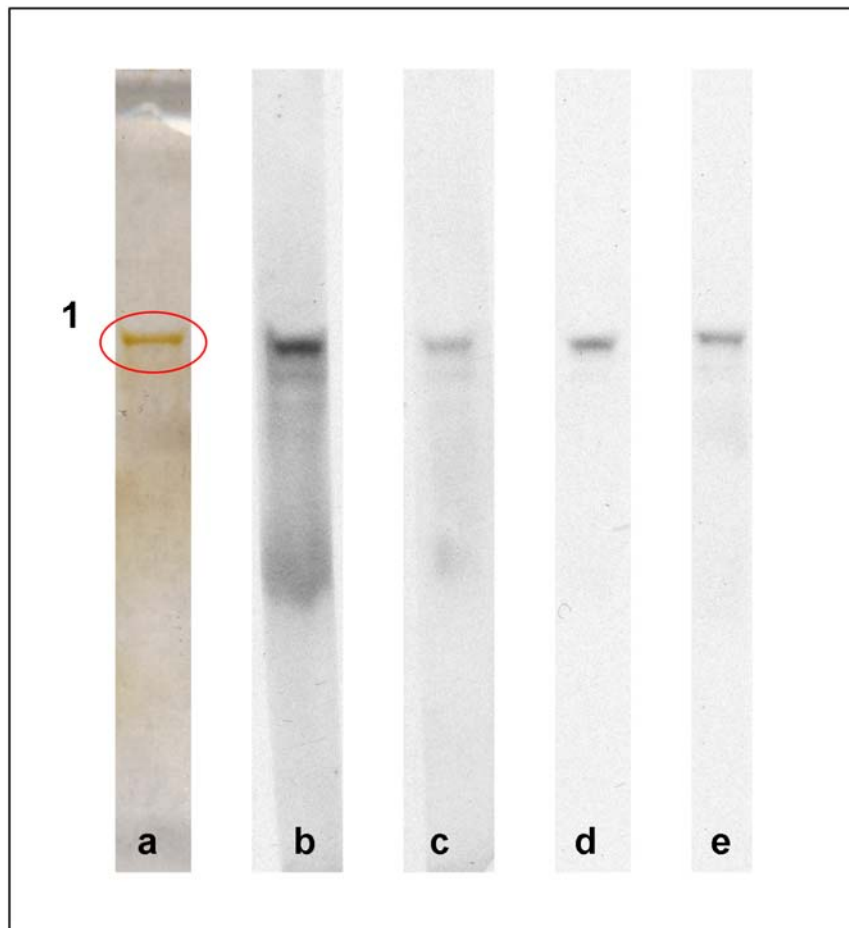
Alle aus dem Silbergel (Abb. 4.12.1, a) ausgeschnittenen Banden konnten massenspektrometrisch eindeutig identifiziert werden. Bande 1 wurde als mitochondriale Aconitase identifiziert.

Bande 2 dagegen wurde als Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) identifiziert. Die Ergebnisse aus den mit gereinigter GAPDH durchgeführten Immunblots korrelieren mit denen der Bande 2 aus diesem Immunblot (siehe Abb. 4.4.1).

Die in Abbildung 4.12.1 blau markierten Banden a und b wurden zusätzlich als erhebliche Kontamination der Präparation mit Serum-Albumin identifiziert.

## 4.13 Desmin

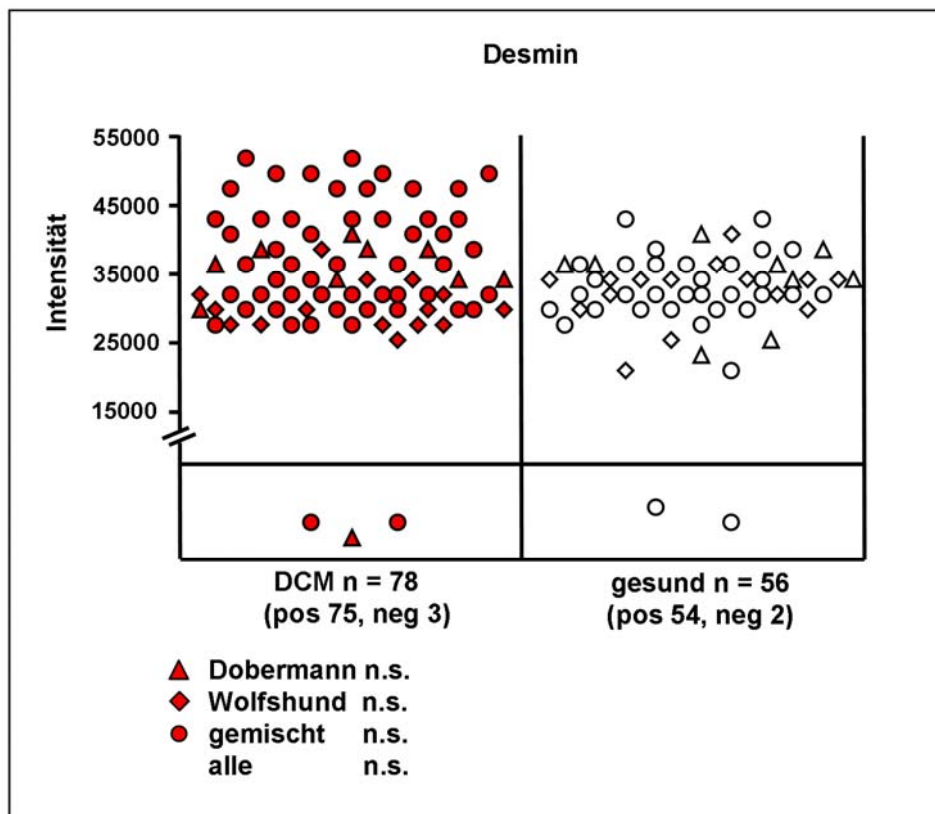
### 4.13.1 Eindimensionale Western Blots auf gereinigtem Desmin



**Abb. 4.13.1** a) Gereinigtes Desmin, aufgetrennt in 4-20% SDS Gel, Silberfärbung, eine Bande sichtbar. Bindung von Desmin sowohl durch Seren von DCM-Tieren (b und c), Patienten Nr. 8 und 10 als auch durch Seren von herzgesunden Tieren (d und e), Kontrollhunde „Amy“ und „Bertha“.

78 DCM-Seren und 56 Seren von herzgesunden Kontrollhunden wurden in 1D Western Blots auf ihre Reaktivitäten auf gereinigtes Desmin überprüft. In der parallel angefertigten Silberfärbung des im 4-20% SDS-Gel aufgetrennten Desmins war eine angefärbte Bande zu erkennen (Abb. 4.13.1 a). Die Bande wurde, bis auf wenige Ausnahmen, von allen Seren der kranken und gesunden Hunde markiert (Abb. 4.13.1 b-e).





**Abb. 4.13.2** Screening von 78 DCM- und 56 Kontrollseren auf gereinigtem Desmin (Bande 1, Abb.4.13.1), links DCM-Tiere, rechts gesunde Tiere. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier, positive Tiere liegen oberhalb der Linie. ● : an DCM erkrankter Hund der gemischten Gruppe, ◆ : an DCM erkrankter Wolfshund, ▲ : an DCM erkrankter Dobermann, ○ : gesunder Hund der gemischten Gruppe, ◇ : gesunder Wolfshund, △ : gesunder Dobermann. Auf der y-Achse wird die Intensität der Bande angezeigt. Weder in der gemischten DCM-Gruppe, noch in der Wolfshunde-Gruppe, noch in der Dobermann-Gruppe konnte ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der Autoantikörperbindung festgestellt werden (n.s.).

Fast alle Hundeseren, sowohl von erkrankten Hunden als auch von gesunden Kontrollhunden, markierten die Desmin-Bande. Exemplarisch wurden in Abbildung 4.13.1 die Immunblots der DCM Patienten Nr. 8 und Nr. 10 und der herzgesunden Kontrollhunde „Amy“ und „Bertha“ gezeigt. Mit Verwendung des Chi-Quadrat-Tests konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Autoantikörperbindung der jeweiligen Gruppen festgestellt werden (n.s.).

#### 4.13.2 Massenspektrometrische Identifikation der markierten Bande

<b>Banden Nr.<sup>a</sup></b>	<b>Protein Name<sup>b</sup></b>	<b>Species<sup>c</sup></b>	<b>Accession number<sup>d</sup></b>	<b>MW (Da)<sup>e</sup></b>	<b>pI<sup>f</sup></b>	<b>Protein score<sup>g</sup></b>
1	Desmin	Homo sapiens	DESM_HUMAN	53372	5,21	840

**Tab. 4.13.3** Massenspektrometrisch identifiziertes Protein aus der gereinigten Desmin Präparation.

Die hochgestellten Buchstaben sind in der Legende von Tab.4.4.1 erläutert.

Die Evaluierung der aus dem Silbergel (Abb. 4.13.1, a) ausgeschnittenen Bande ergab eindeutig, dass es sich bei dem Protein um Desmin handelt.

#### 4.14 Häufigkeit der autoantikörperpositiven Tiere

Autoantigen		DCM-Hunde				Gesunde Kontrollhunde			
		Gemischt	Wolfs hunde	Dober männer	Alle	Gemischt	Wolfs hunde	Dober männer	Alle
Herz-myosin	Bande 1	26,4%	6,7%	20%	21,8%	28,1%	6,7%	0%	6,6%
	Bande 2	<b>67,9%</b>	46,7%	10%	<b>56,4%</b>	<b>40,6%</b>	33,3%	42,9%	<b>39,3%</b>
GAPDH		<b>81,1%</b>	33,3%	30%	<b>65,4%</b>	<b>31,3%</b>	53,3%	30,8%	<b>36,7%</b>
GPBB		<b>91,7%</b>	33,3%	38,5%	<b>65,7%</b>	<b>35,3%</b>	15,8%	18,2%	<b>23,4%</b>
cardiac Actin	Bande 1	<b>58,5%</b>	<b>73,3%</b>	20%	<b>56,4%</b>	<b>25%</b>	<b>26,7%</b>	0%	<b>19,4%</b>
	Bande2	<b>30,2%</b>	6,7%	20%	<b>24,4%</b>	<b>0%</b>	0%	0%	<b>0%</b>
	Bande 3	<b>79,2%</b>	86,7%	60%	<b>78,2%</b>	<b>28,1%</b>	80%	40%	<b>43,5%</b>
Aconitase		<b>71,7%</b>	46,7%	60%	<b>66,7%</b>	<b>25%</b>	80%	42,9%	<b>43,3%</b>
Desmin		96,2%	100%	90%	96,2%	93,8%	100%	100%	96,4%

**Tab. 4.14.1** Zusammenfassung der Häufigkeit autoantikörperpositiver Tiere der jeweiligen Gruppe auf die untersuchten Autoantigene. Die in der Autoantikörperbindung signifikant unterschiedlichen Gruppen sind fett markiert.

In Tabelle 4.14.1 wurden die Häufigkeiten der positiven Reaktionen auf die verschiedenen Autoantigene in Prozentzahlen festgehalten.

Bei Herzmyosin konnte bei der zweiten Bande ein signifikanter Unterschied in der Autoantikörperbindung zwischen den beiden gemischten Gruppen (67,9% positive Reaktionen bei den DCM-Hunden zu 40,6% positive Reaktionen bei den gesunden Kontrollhunden) ermittelt werden. Auch bei der Zusammenfassung aller Gruppen war

der Unterschied signifikant (56,4% DCM-Hunde zu 39,3% herzgesunde Kontrollhunde).

In der Bindung der GAPDH waren in den gleichen Gruppen signifikante Unterschiede zu erkennen, wobei 65,4% aller DCM-Hunde im Vergleich zu 36,7% aller Kontrollhunde GAPDH-Autoantikörper-positiv war (gemischt 81,1% DCM-Tiere, 31,3% gesunde Kontrollen).

GPBB wurde von 100% der DCM-Hunde aus der gemischten Gruppe und von 91,7% aller DCM-Hunde gebunden. Nur 46,2% der Seren der gemischten Kontrollhunde und 45,8% der Seren aller Kontrollhunde markierten GPBB. Damit treten anti-GPBB-Autoantikörper signifikant häufiger bei erkrankten als bei gesunden Tieren auf.

Bei cardiac Actin konnte bei allen drei Banden ein signifikanter Unterschied zwischen den gemischten Gruppen und der Zusammenfassung aller Gruppen festgestellt werden (Bande 1: 58,5% (alle) bzw. 56,4% (gemischt) zu 25% (alle) bzw. 19,4% (gemischt), Bande 2: 30,2% bzw. 24,4% zu jeweils 0%, Bande 3: 79,2% bzw. 78,2% zu 28,1% bzw. 43,5%). Auch zwischen der DCM-Wolfshunde-Gruppe und der Kontroll-Wolfshunde-Gruppe war ein signifikanter Unterschied in der Autoantikörperbindung festzustellen (Bande 1). Bei 73,3% der DCM-Seren fand eine positive Reaktion statt. Nur 26,7% der gesunden Wolfshunde markierten die erste Bande des cardiac Actins.

Außerdem war bei den gemischten Gruppen und der Zusammenziehung aller Gruppen ein signifikanter Unterschied in der Bindung der Aconitase augenfällig. 71,7% der gemischten DCM-Gruppe und 66,7% aller DCM-Hunde zu 25% der gemischten Kontrollhunde und 43,3% aller Kontrollhunde markierten die Aconitase.

Die Validierung für das Myosin light polypeptide 4 steht noch aus, weil dieses Protein kloniert, exprimiert und gereinigt werden muss. Bisher konnte somit für fünf (Herzmyosin, GAPDH, GPBB, cardiac Actin, Aconitase) der sechs Kandidatenproteine ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der Autoantikörper zwischen Tieren mit dilatativer Kardiomyopathie und gesunden Kontrolltieren bestätigt werden.

## 5 Diskussion

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM), die durch Dilatation und beeinträchtigte Kontraktilität des linken oder beider Ventrikel charakterisiert ist, ist beim Hund, wie beim Menschen auch, eine häufige Ursache für ein Herzversagen, das schnell zum Tod führen kann. Nur 37,5% der erkrankten Hunde überleben nach der Diagnosestellung ein Jahr (Monnet et al. 1995). Betroffen sind vor allem große Rassen, wie zum Beispiel Doggen, Bernhardiner, Irische Wolfshunde und Dobermänner. In vielen Fällen ist die Ätiologie der Erkrankung nicht geklärt. Eine Hypothese ist, dass es sich bei einem Teil der Erkrankungen um ein autoimmunes Geschehen handelt. Dies wurde bei der caninen DCM bisher nur in zwei Studien untersucht (Cobb et al. 1994; Day 1996). Dabei gab es nur bei einer Studie Hinweise auf Autoreaktivität bei der caninen DCM. Hierbei konnte bei 30% der an DCM erkrankten Hunde eine Autoreaktivität auf mitochondriale Antigene festgestellt werden (Day 1996). Die genaue Spezifität dieser Autoantikörper wurden jedoch weder identifiziert noch weiter charakterisiert oder ihre Relevanz funktionell geprüft. Eine weitere Forschergruppe untersuchte das Vorhandensein von anti-myokardialen IgG- und IgM-Autoantikörpern in Seren von an DCM erkrankten Hunden und gesunden Kontrollhunden mittels indirekter Immunfluoreszenz und Western Blotting. Dabei wurden viele Reaktivitäten festgestellt, jedoch keine Unterschiede in der Autoantikörperbindungshäufigkeit zwischen DCM-Hunden und gesunden Kontrollhunden gefunden (Cobb et al. 1994). Es ist aber möglich, dass dies methodisch bedingt ist, da die Hundeseren im Western Blot in einer sehr niedrigen Verdünnung (1:200) auf Gesamtherzextrakt getestet wurden, so dass es denkbar ist, dass es sich um viele falsch-positive Reaktionen handeln könnte. Eine andere Möglichkeit ist, dass die verwendete Methode nicht sensitiv genug war. So können sich in der eindimensionalen Proteinauftrennung mehrere Proteine hinter einer Bande verbergen, so dass man von einer mangelhaften Sensitivität ausgehen kann. Pompetzki konnte mit Vergleichen von ein- und zweidimensionalen Proteinauftrennungen zeigen, dass es mittels eindimensionaler Auftrennung des Proteoms nicht möglich ist, eine Bande einem bestimmten Protein zuzuordnen (Pompetzki 2003). In der zweidimensionalen Auftrennung des Proteoms konnte festgestellt werden, dass sich mehrere Proteine mit gleichem Molekulargewicht in der

Präparation befanden, die sich in der eindimensionalen Auftrennung als eine Bande zeigten (Pompetzki 2003).

Die Suche nach Autoantigenen mittels zweidimensionalen Western Blots ist nachgewiesenermaßen eine geeignete Methode, um unbekannte Autoantigene zu identifizieren (Pohlner et al. 1997; Portig et al. 1997; Deeg et al. 2006). Das Proteom wird durch zweidimensionale Gelelektrophorese hochauflösend getrennt und stellt so mehrere tausend Proteine des Gewebes als Autoantigenquelle zur Verfügung (Gorg et al. 2004).

In dieser Studie wurde Vorhofgewebe und Hauptkammerngewebe des Herzens zweidimensional aufgetrennt und separat mit Patientenseren und Seren von gesunden Kontrollhunden inkubiert, um mögliche Autoantigene zu finden. Es konnten im Vorhofgewebe fünf und in der Hauptkammer zwei Kandidaten-Proteine detektiert werden, die signifikant häufiger von DCM-Seren als von Kontrollseren gebunden wurden.

Dabei konnten mehrere Autoantigene detektiert werden, die bisher nicht im Zusammenhang mit der DCM beschrieben wurden. Drei der gefundenen Autoantigene waren weder in der caninen, noch in der humanen DCM bekannt (Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, die Gehirnform der Glycogen-Phosphorylase und Aconitase). Außerdem wurden Herzmyosin und cardiac Actin detektiert, was die Relevanz der Methode unterstreicht, da diese beiden Autoantigene bereits in der humanen DCM identifiziert werden konnten (Caforio et al. 1990; Latif et al. 1993; Goldman et al. 1995).

In dieser Studie wurden drei verschiedene genetische Gruppen gebildet (Dobermänner, Irische Wolfshunde, gemischte Gruppe), da der klinische Verlauf und die Symptomatik zwischen den verschiedenen Rassen zum Teil stark variieren. Dobermänner leiden meist an einer besonders schweren Form der DCM. Der Zustand der Hunde verschlechtert sich sehr rasch (Dukes-McEwan 2000). Außerdem können bei dieser Rasse, im Gegensatz zu Irischen Wolfshunden, im Elektrokardiogramm vor allem ventrikuläre Arrhythmien festgestellt werden. Überdies unterscheidet sich das pathohistologische Bild von Myokardproben von DCM-Dobermännern von dem anderer Rassen (Tidholm und Jonsson 2005). Die Form der DCM, die bei Dobermännern und Boxern beschrieben wird, ist gekennzeichnet durch Muskelfaserdegeneration und -atrophie. Degenerative Veränderungen in Form von Myozytolyse und Myofibrillennekrose führen zu einer weitgehenden Atrophie mit

großen Bereichen myokardialer Fibrose und fettiger Infiltration (Calvert et al. 1982; Harpster 1991; Everett et al. 1999). Bei anderen großen und mittelgroßen Hunderassen, wie z.B. Irischen Wolfshunden, kommt eine andere Form der DCM vor, die durch dünne, separierte, wellenförmige Myokardfibrillen in einer vermehrten Intrazellulärsubstanz gekennzeichnet ist („attenuated wavy fibres“) (Tidholm et al. 1998; Tidholm und Jonsson 2005). Bei der humanen DCM liegen hypertrophierte und atrophische Zellen in Arealen mit interstitieller Fibrose und erscheinen isoliert vom restlichen Myokard, der Zellverbund ist durch die Vermehrung der extrazellulären Matrix aufgelöst (Schaper 1993). Die Veränderungen, die bei Menschen mit DCM festgestellt wurden, ähneln denen, die beim Irischen Wolfshund beobachtet werden konnten, so dass diese Hunderasse als Modelltier für die humane DCM dienen könnte.

Irische Wolfshunde können im Vergleich zu Dobermännern noch eine längere Zeit nach der Diagnosestellung überleben. Die bei dieser Rasse am häufigsten auftretende Veränderung im EKG ist das Vorhofflimmern, das in 97% der Fälle festgestellt werden kann (Vollmar 2000). Wegen dieser Besonderheiten und dem rassetypischen genetischen Hintergrund wurden die Ergebnisse zusätzlich gesondert für Dobermänner und Irische Wolfshunde berechnet.

In einer dritten genetischen Gruppe wurden Hunde verschiedener Rassen zusammengefasst, so dass dieser Gruppe ein ausgezüchteter genetischer Hintergrund zugrunde liegt (gemischte Gruppe). In dieser Studie konnten bei den an DCM erkrankten Tieren unabhängig vom genetischen Hintergrund signifikant häufiger Autoimmunreaktionen gegen das Herzproteom beobachtet werden als bei gesunden Kontrollhunden. Die Ergebnisse wurden zum einen getrennt für die jeweiligen genetischen Gruppen ausgewertet, zum anderen für alle gemeinsam bewertet (Gruppe „alle“). In der gemischten Gruppe konnten zwischen den DCM-kranken und herzgesunden Hunden signifikante Unterschiede in der Autoantikörperbindungshäufigkeit zu Herzmyosin, GAPDH, GPBB, cardiac Actin und Aconitase festgestellt werden. In der Gruppe der Irischen Wolfshunde bestand ein deutlicher Unterschied in der Häufigkeit der Autoantikörperbindung zu cardiac Actin. Zwischen den kranken und den gesunden Dobermännern konnten keine signifikanten Unterschiede in der Autoantikörperbindung festgestellt werden. Wertet man jedoch alle Gruppen gemeinsam aus („alle“), bleibt der signifikante Unterschied

in der Autoantikörperbindungshäufigkeit zu Herzmyosin, GAPDH, GPBB, cardiac Actin und Aconitase bestehen.

Eines der potenziellen Autoantigene konnte als schwere Kette des Herzmyosins identifiziert und mittels 1D-Blots validiert werden. Hierzu wurden die Hundeseren auf ihre Reaktivität auf das gereinigte Herzmyosin getestet. Herzmyosin wurde signifikant häufiger von DCM-Patienten gebunden als von gesunden Kontrollhunden (siehe Abb. 4.8.2). In der gemischten Gruppe waren 67,9% der an DCM erkrankten Hunde und nur 40,6% der gesunden Kontrollhunde Autoantikörper-positiv. Unter den Irischen Wolfshunden und den Dobermännern konnten keine Unterschiede in der Autoantikörperbindung festgestellt werden. Wenn man alle Gruppen gemeinsam bewertete („alle“), war ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den an DCM erkrankten Hunden und den gesunden Kontrollhunden festzustellen. Von allen hier getesteten an DCM erkrankten Hunden waren 56,4% im Gegensatz zu 39,3% aller herzgesunder Kontrollhunde Autoantikörper-positiv. Dies ist die erste Beschreibung von Herzmyosin als Autoantigen in der caninen DCM. Beim Menschen hingegen ist die schwere Kette des Herzmyosins eines der am besten untersuchten Autoantigene in der DCM. In mehreren Studien konnten Autoantikörper gegen die alpha- und beta-Isoformen der schweren Kette des Myosins in DCM-Patientenseren nachgewiesen werden (Caforio et al. 1990; Goldman et al. 1995). Während die beta-Isoform im Ventrikel und im Skelettmuskel exprimiert wird, kommt die alpha-Isoform nur im Atrium vor. Eine Immunisierung mit der alpha-Isoform der schweren Kette des Herzmyosins führte bei genetisch prädisponierten Mäusen zu einem Phänotyp, der dem der DCM stark ähnelte (Warraich et al. 2006). Eine Immunisierung mit Skelettmuskelmyosin löste dagegen keine Erkrankung aus (Neu et al. 1987). Hiermit wurde eine kardiopathische Wirkung der Autoantikörper gegen die alpha-Isoform der schweren Kette des Herzmyosins nachgewiesen.

Somit sind die Witebsky'schen Postulate für dieses Autoantigen sowohl für die humane als auch für die canine DCM erfüllt.

Um ein Protein als Autoantigen definieren zu können, müssen nach den, nach Rose modifizierten, Witebsky'schen Postulaten folgende drei Forderungen erfüllt werden (Rose 1993) :

- 1.: Das Antigen muss bekannt sein.
- 2.: Es müssen Antikörper und/oder zelluläre Immunreaktionen gegen das körpereigene Antigen vorhanden sein.

3.: Die Erkrankung muss durch Transfer von pathogenen Autoantikörpern oder T-Zellen ausgelöst werden, was als direkter Beweis gilt.

Eine andere Möglichkeit ist, dass eine ähnliche Erkrankung durch Immunisierung eines Versuchstieres mit dem Antigen auslösbar ist, was als indirekter Beweis gilt.

Die Verwendung klinischer Anzeichen gilt als „umständlicher“ Beweis.

In dieser Studie wurden bei an DCM erkrankten Hunden signifikant häufiger Autoantikörper gegen die schwere Kette des Herzmyosins nachgewiesen. Außerdem ist dieses Autoantigen im Versuchstier kardiopathisch (Warraich et al. 2006). Deshalb ist es als Autoantigen in der caninen DCM charakterisiert.

Ein weiteres, mittels zweidimensionalen Western Blots identifiziertes, potenzielles Autoantigen ist eine regulatorische leichte Kette des Myosins (MYL4). Diese Kette des Myosins wird spezifisch in embryonalen Muskelzellen, aber auch in Muskelzellen des Vorhofes exprimiert. Dies ist sehr interessant, weil einige Veränderungen des Herzens auf den Vorhof beschränkt sind (Levy 2002). So könnte eine gegen MYL4 gerichtete Immunreaktion bei supraventrikulären Arrhythmien eine Rolle spielen. Außerdem ist es möglich, dass bei der DCM die Dilatation eines oder beider Vorhöfe durch eine Immunreaktion gegen das in den Vorhöfen exprimierte MYL4 bedingt sein könnte. MYL4 ist in der DCM als Autoantigen bisher vollkommen unbekannt. Da hier das gereinigte Protein noch nicht vorlag, war es bisher noch nicht möglich, eine Validierung mittels eindimensionalen Western Blots durchzuführen. Diese Untersuchungen werden nach Klonierung, Expression und Reinigung von MYL4 in näherer Zukunft erfolgen.

Sowohl die leichte als auch die schwere Kette des Myosins sind elementare Proteine von Muskelfasern und für Muskelkontraktionen zuständig. Ein Myosin-Molekül besteht aus zwei schweren Ketten, zwei alkalischen leichten Ketten und zwei regulatorischen leichten Ketten. Die schwere Kette besteht aus einer Kopfregion, an die das ATP bindet, einer Nackenregion, die eine unterschiedliche Anzahl von Bindungsdomänen für die leichten Ketten enthalten kann und einer Schwanzregion, die mit der Schwanzregion des zweiten Myosins verdrillt ist (Silbernagl 2003). Es existieren verschiedene leichte Ketten, deren Funktion einerseits rein strukturell ist (essentielle leichte Kette), zum anderen die Aktivität der Motordomäne reguliert (regulatorische leichte Kette).



Ein weiteres potenzielles Autoantigen, das in dieser Studie identifiziert wurde, ist die ubiquitär vorkommende Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die GAPDH ist ein Enzym der Glycolyse, die die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat katalysiert (Harris und Perham 1968). Auch hier konnte in der gemischten Gruppe zwischen DCM-Hunden und gesunden Hunden ein signifikanter Unterschied in der Autoantikörperbindungshäufigkeit festgestellt werden, nicht aber in den Wolfshunde- und Dobermann-Gruppen (siehe Abb. 4.9.2). In der gemischten Gruppe erkrankter Hunde waren 81,1% der Tiere Autoantikörper-positiv und nur 31,3% der gesunden Kontrollhunde. Berechnet man das Ergebnis unter Einbeziehung aller genetischen Hintergründe, bleibt der Unterschied trotzdem hoch signifikant ( $p < 0,001$ ; „alle“). Es erscheint erstaunlich, bei einer organspezifischen Autoimmunerkrankung ein ubiquitär vorkommendes Autoantigen zu identifizieren, jedoch konnten schon von anderen Gruppen in der humanen DCM-Forschung mehrere ubiquitär vorkommende mitochondriale Autoantigene identifiziert werden (Okazaki und Honjo 2005). Eine Immunisierung von Meerschweinchen mit dem ebenfalls ubiquitär exprimierten ADP-ATP-Carrier führte zu DCM-ähnlichen Veränderungen der Herzen (Schulze et al. 1990). In den Mitochondrien der Herzen konnte eine signifikante Hemmung des Nukleotidtransportes festgestellt werden. Dies wurde auf eine Hemmung der Carrierfunktion durch die Bindung der Autoantikörper zurückgeführt. Der Nukleotidtransport in Mitochondrien der Nieren und der Leber war jedoch nicht verändert (Schulze et al. 1990). Eine mögliche Erklärung für die organspezifische Manifestation einer solchen Autoimmunreaktion ist die charakteristische Gestaltung des Herzens mit gap-junctions, die eine Penetration der Autoantikörper durch die Plasmamembran ermöglichen könnte (Schulze et al. 1990).

Eine andere Möglichkeit ist, dass die Autoantikörper durch Endozytose ins Zytoplasma der Zellen gelangen (Schulze et al. 1990).

Die GAPDH ist bisher in der humanen DCM nicht als Autoantigen bekannt. Auch in der caninen DCM war die GAPDH als Autoantigen bisher noch unbekannt. Untersuchungen über die Pathogenität dieses Autoantigens stehen noch aus und müssen erfolgen, um GAPDH als DCM-Autoantigen abschließend bewerten zu können.

Interessanterweise konnte eine Gruppe kürzlich GAPDH als potenzielles neues Autoantigen des Lupus erythematodes identifizieren. In dieser Studie waren 47% der

Seren der an Lupus erythematodes erkrankten Patienten GAPDH-Autoantikörperpositiv (Takasaki et al. 2004). Diese Gruppe konnte eine Interaktion zwischen GAPDH und dem Kern-Antigen proliferierender Zellen (PCNA) feststellen. PCNA ist ein bereits bekanntes Autoantigen bei Patienten, die an systemischem Lupus erythematodes leiden. Aus diesen Ergebnissen schließen Takasaki et al., dass die GAPDH nicht nur in den Mitochondrien, sondern auch im Zellkern vorkommen muss (Takasaki et al. 2004). Sie vermuten, dass GAPDH gemeinsam mit PCNA an der DNA-Replikation beteiligt ist. Außerdem wird vermutet, dass es sich beim systemischen Lupus erythematodes um eine durch eine bakterielle Infektion ausgelöste Autoimmunerkrankung handelt. Da GAPDH zwischen den einzelnen Spezies hoch konserviert vorliegt, vermuten die Autoren, dass die bei Lupus-Patienten gefundenen Autoantikörper initial gegen bakterielle GAPDH gerichtet waren (Takasaki et al. 2004).

Bis zum heutigen Zeitpunkt werden virale Infektionen als Auslöser der DCM vermutet, dennoch konnte bislang kein wirklicher Beweis dieser Theorie erbracht werden. Hinweise ergaben sich daraus, dass aus endomyokardialen Biopaten replikationsfähige mRNA von sich vermehrenden Enteroviren (Coxsackievirus B3) isoliert werden konnte. Es wird vermutet, dass diese Viren eine akute Myokarditis auslösen, die dann in eine DCM übergeht (Kandolf und Hofschneider 1989; Fujioka et al. 2004). Andere cardiotrope Viren konnten nicht nachgewiesen werden (Fujioka et al. 2004). Bei Hunden mit DCM konnte kein Hinweis auf Coxsackievireninfektionen gefunden werden (Maxson et al. 2001).

Eine Theorie für die Entstehung einer Autoimmunerkrankung ist die molekulare Mimikry. Aus diesem Grund wird immer ein Erreger gesucht, der die jeweilige Erkrankung initiiert hat. Möglicherweise steht am Anfang einer DCM eine Infektion mit Enteroviren durch die eine Schädigung des Herzmuskels entsteht, die dann durch eine molekulare Mimikry aufrecht erhalten wird. Als molekulare Mimikry wird der Umstand bezeichnet, dass Moleküle auf der Oberfläche von Krankheitserregern körpereigenen Molekülen ähneln oder mit ihnen identisch sind. Zunächst richtet sich die Reaktion gegen Moleküle auf der Oberfläche der Erreger, später kann sich die Immunreaktion nicht nur gegen den Erreger, sondern auch gegen körpereigenes Gewebe richten. Trotz fortlaufender Forschungen auf diesem Gebiet konnte die Auslösung einer DCM durch molekulare Mimikry nicht bewiesen werden.

Kürzlich konnten bei der Multiplen Sklerose in der Cerebrospinalflüssigkeit von MS-Patienten Autoantikörper gegen GAPDH gefunden werden. Bei 60% der untersuchten MS-Patienten konnte ein erhöhter Titer von GAPDH-Autoantikörpern festgestellt werden (Kolln et al. 2006). Bei Patienten mit anderen, nichtentzündlichen neurologischen Erkrankungen konnten nur in 8% der Fälle Autoantikörper gegen die GAPDH festgestellt werden. Bei Untersuchungen von GAPDH-Autoantikörpern in Seren von MS-Patienten im Vergleich zu Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen konnten bei der Mehrheit der Patienten aller Gruppen erhöhte anti-GAPDH Ig Titer festgestellt werden. Kolln et al. schlossen aus der spezifischen Erhöhung und der größeren Häufigkeit der Autoantikörper in der Cerebrospinalflüssigkeit von MS-Patienten im Vergleich zu Patienten mit anderen nichtentzündlichen neurologischen Erkrankungen, dass bei MS-Patienten eine intrathekale Synthese GAPDH-spezifischer Autoantikörper stattfinden müsse (Kolln et al. 2006).

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass GAPDH ein Kandidaten-Autoantigen bei MS-Patienten sein könnte, das eine Immunantwort gegen Neurone und Axone induziert (Kolln et al. 2006).

Ein weiteres potenzielles DCM-Autoantigen ist die Gehirn-Isoform der Glycogen-Phosphorylase (GPBB). Die GPBB ist ein wichtiges Enzym der Glycolyse. Sie katalysiert im ersten Schritt der Glycolyse die Reaktion, in der Glycogen zu Glucose-1-Phosphat umgewandelt wird (Newgard et al. 1988). Das Enzym kommt vor allem im Gehirn und im Herzmuskel vor und dient in der Humanmedizin als früher Marker von Myokardinfarkten (Mair 1998; Peetz et al. 2005). Tritt ein Zelluntergang der Myozyten ein, so kann man GPBB sehr schnell im Serum des Patienten nachweisen. Eine Stunde nach Beginn der Brustschmerzen sind bei 90,5% der Patienten erhöhte GPBB-Werte im Serum nachweisbar (Mair 1998). Nach vier bis fünf Stunden sind bei 100% der Patienten erhöhte GPBB-Werte im Serum feststellbar. Die Sensitivität liegt bei 81% und die Spezifität bei 93% (Mair 1998). Da GPBB auch im Gehirn exprimiert ist, besteht keine absolute Spezifität für die Diagnose eines myokardialen Schadens. Andererseits kann man eine hohe Spezifität erwarten, wenn man von einer intakten Blut-Hirn-Schranke ausgeht und eine Gehirnschädigung ausschließen kann (Peetz et al. 2005). Auch bei diesem potenziellen Autoantigen konnte in der gemischten Gruppe zwischen DCM-Hunden und gesunden Hunden ein signifikanter Unterschied

in der Autoantikörperbindung festgestellt werden, nicht aber in den Wolfshunde- und Dobermann-Gruppen (siehe Abb. 4.10.2). So waren 91,7% der DCM-Hunde aus der gemischten Gruppe und 35,3% der gesunden Kontrollhunde aus der gemischten Gruppe Autoantikörper-positiv. Auch wenn man alle Gruppen zusammenfasst („alle“), bleibt der signifikante Unterschied zwischen den kranken und den gesunden Hunden in der Autoantikörperbindungshäufigkeit bestehen. Interessanterweise besitzt die GPBB ein ähnliches Expressionsmuster wie die 65 kDa Glutamat-Decarboxylase (GAD65), ein bedeutendes Autoantigen im Typ-1-Diabetes mellitus. GAD65 ist vor allem im Gehirn und in Zellen des Pankreas exprimiert, aber ebenso auch in anderen Geweben (Faulkner-Jones et al. 1993) und ist trotz dieses Expressionsmusters ein bedeutendes Autoantigene im Typ 1 Diabetes mellitus. Die GPBB war bislang weder in der caninen, noch in der humanen DCM als Autoantigen bekannt. Untersuchungen über die Pathogenität des Autoantigens stehen ebenfalls noch aus.

Außerdem konnten in dieser Studie Reaktionen gegen drei verschiedene Banden des cardiac Actins festgestellt werden. Actin bildet die sogenannten Actinfilamente, die zentraler Bestandteil des Kontraktionsapparates der Muskeln sind. Im Sarkomer der Muskelfasern bildet Actin gemeinsam mit Myosin, Troponin und Tropomyosin die kontraktile Einheit des Muskels (Holmes et al. 1990). Alpha cardiac Actin kommt nur im Herzmuskel vor (Vandekerckhove und Weber 1978).

Drei als cardiac Actin identifizierte Banden (siehe Tab. 4.11.15) wurden signifikant häufiger von an DCM erkrankten Hunden als von herzgesunden Kontrollhunden markiert (Gruppen „gemischt“ und „alle“). Die erste Bande des cardiac Actins wurde auch von den an DCM erkrankten Wolfshunden signifikant häufiger als von herzgesunden Wolfshunden gebunden, nicht aber von den Dobermännern (siehe Abb. 4.11.2). Unter den erkrankten und gesunden Irischen Wolfshunden und den Dobermännern konnten keine Unterschiede in der Autoantikörperbindung der zweiten und dritten Bande festgestellt werden (siehe Abb. 4.11.3 und 4.11.4). Da drei verschiedene Banden mittels Massenspektrometrie als cardiac Actin identifiziert wurden, muss es sich bei zwei der Banden um Bruchstücke oder Dimere handeln. Die mittlere Bande (Bande 2) hat ein Molekulargewicht von ca. 42 KDa, was dem Molekulargewicht von cardiac Actin entspricht. Die untere Bande (Bande 3) hat ein Molekulargewicht von ca. 30 KDa, so dass es sich hier wahrscheinlich um ein Bruchstück handelt. Die obere Bande (Bande 1) hat ein Molekulargewicht von

ungefähr 80 KDa, so dass es sich hier um ein Dimer handeln könnte. Möglicherweise wurde von den Wolfshunden nur das Dimer gebunden, da dies eher der ursprünglichen Tertiärstruktur des Proteins entspricht. Durch die Präparation der Proteine geht diese meist verloren, da verschiedene Brückenbindungen zerstört werden.

Herz-spezifisches Actin ist bei der humanen DCM bereits als Autoantigen bekannt (Latif et al. 1993). Eine Forschergruppe konnte durch zweidimensionale Immunblots ein erhöhtes Auftreten von Autoantikörpern in Seren von an DCM erkrankten Patienten nachweisen (Latif et al. 1993). In dieser Studie konnten bei 71% der Patienten Autoantikörper gegen cardiac Actin festgestellt werden. Als Kontrollgruppe dienten in dieser Studie keine herzgesunden Probanden, sondern an ischämischen Herzerkrankungen leidende Patienten. Siebzehn Prozent der Menschen dieser Kontrollgruppe wiesen ebenfalls Autoantikörper gegen cardiac Actin auf. Eine Pathogenität dieses potenziellen Autoantigens wurde im Tierversuch bisher noch nicht nachgewiesen, so dass eine Bestätigung des dritten Witebsky'schen Postulates noch aussteht, um cardiac Actin abschließend als Autoantigen sowohl bei der DCM des Hundes als auch des Menschen zu charakterisieren.

Ein anderes potenzielles, durch diese Studie identifiziertes DCM-Autoantigen ist die Aconitase. Die Aconitase ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym des Zitratzyklus. Sie katalysiert die reversible Umlagerung des Zitrats über das intermediär enzymgebundene *cis*-Aconitat zum Isozitat (Robbins und Stout 1989; Lauble und Stout 1995). Auch hier fällt auf, dass es sich bei einer organspezifischen Autoimmunerkrankung um ein ubiquitär vorkommendes potenzielles Autoantigen handelt, wie schon bei dem potenziellen Autoantigen GAPDH. Von den DCM-kranken Hunden aller Gruppen waren 60% Autoantikörper-positiv und 43,3% der gesunden Hunde aller Gruppen waren Autoantikörper-positiv (siehe Abb. 4.12.2). Bande 2 der Aconitase-Präparation wurde bei der Überprüfung mittels Massenspektrometrie als GAPDH identifiziert (siehe Tab. 4.12.4). Da in dieser Präparation neben GAPDH auch mehrfach Albumin identifiziert wurde, ist von einer erheblichen Verunreinigung dieser gereinigten Aconitasepräparation auszugehen. Bande 2, also GAPDH, wurde signifikant häufiger von DCM-Hunden der gemischten Gruppe als von herzgesunden Kontrollhunden markiert (siehe Abb. 4.12.3.). Die Autoantikörper-Bindungshäufigkeit der DCM-kranken und der herzgesunden Hunde

korrelierte mit den vorhergegangenen Untersuchungen mit gereinigter GAPDH (siehe Abb. 4.9.2) und bestätigte damit die dort ermittelten Daten. Da Aconitase als Autoantigen bisher weder bei der caninen DCM noch bei der humanen DCM bekannt war, ist auch noch nichts über die Pathogenität dieses Proteins bekannt, so dass diesbezüglich weitere Untersuchungen notwendig sind.

Eine Forschergruppe konnte bei Patienten mit rheumatischer Herzerkrankung unter anderem Autoantikörper gegen Aconitase nachweisen. In zweidimensionalen Western Blots konnte bei Patientenseren eine signifikant häufigere Autoantikörperbindung auf Aconitase (36% der Patienten) als bei gesunden Kontrollseren festgestellt werden ( $p < 0,05$ ) (Tontsch et al. 2000). Die Autoren vermuten, dass die Autoantikörperbildung gegen Aconitase durch Kreuzreaktionen mit Proteinen von *Streptococcus pyogenes* hervorgerufen wurde (Tontsch et al. 2000). Man vermutet, dass *S. pyogenes* möglicherweise bei der Initiation von rheumatischen Herzerkrankungen eine Rolle spielt, da diese häufig nach durch *S. pyogenes* hervorgerufenen Infektionen des oberen Respirationstraktes auftreten. (Tontsch et al. 2000). Eine weitere Charakterisierung dieses potenziellen Autoantigens im Themenkreis der rheumatischen Erkrankungen steht allerdings noch aus.

In den in dieser Studie durchgeführten zweidimensionalen Western Blots fiel auch eine Bindung eines später als Desmin identifizierten Spots auf. Desmin ist ein Intermediärfilament und bildet so einen Bestandteil des Zytoskeletts. Es kommt nur in der Muskulatur vor. Im Zytoplasma der Muskelfasern der quergestreiften Muskulatur verbindet es die Myofibrillen zu Bündeln und die sogenannten Z-Scheiben der Muskelfasern (Galou et al. 1997).

Nachdem Desmin bei der Identifikation zunächst als Kandidat auffiel, konnten Unterschiede in der Autoantikörperhäufigkeit bei der Validierung mittels eindimensionalen Western Blots nicht bestätigt werden. Es bestand bei allen Gruppen eine sehr hohe Bindungshäufigkeit des Desmins. Fast alle untersuchten Hundeseren, sowohl der erkrankten als auch der gesunden Tiere, waren Desmin-Autoantikörper-positiv. Von allen an DCM erkrankten Hunden waren 96,2% und von allen gesunden Kontrollhunden waren 96,4% Desmin-Autoantikörper-positiv.

Für die eindimensionale Validierung des Desmins wurden die gleichen Serumverdünnungen gewählt wie bei den anderen potenziellen Kandidaten (1:5000).

In Vorversuchen konnte bei dieser Verdünnung schon bei fast allen Seren eine Reaktion beobachtet werden, so dass auch höhere Serumverdünnungen (1:10.000, 1:20000) getestet wurden. Bei höheren Serumverdünnungen konnte dann allerdings bei keinem der Seren eine Reaktion beobachtet werden. Je nach Titration der Seren waren also entweder fast alle positiv oder einheitlich negativ, so dass sich keine signifikanten Unterschiede in der Bindungshäufigkeit ergaben. Deshalb konnte Desmin nicht als potenzielles canines DCM-Autoantigen bestätigt werden.

Bisher wurden in der Humanmedizin nur Mutationen des Desmin-Gens mit einer der DCM ähnlichen Erkrankung in Verbindung gebracht (Li et al. 1999). Als Autoantigen ist es weder in der humanen, noch in der caninen DCM bekannt. Möglicherweise gehören Antikörper gegen Desmin zum natürlichen Autoantikörperrepertoire des Hundes. Dies könnte die hohe Bindungshäufigkeit in allen Gruppen erklären.

Beim Menschen sind mehrere Autoantikörper bekannt, die physiologisch vorhanden sind. Dies sind zum Beispiel Antikörper gegen Albumin, Transferrin, Kollagen und Myoglobin (Guilbert et al. 1982). Bei den in dieser Studie durchgeführten zweidimensionalen Western Blots konnte ebenfalls eine sehr hohe Antikörperbindungshäufigkeit an Albumin und Transferrin sowohl bei DCM-kranken Hunden als auch bei gesunden Kontrollhunden festgestellt werden (siehe Abb.4.5.1). Dies spricht dafür, dass diese beiden Antigene auch beim Hund zum natürlichen Autoantikörperrepertoire gehören. Zusätzlich konnten zwei weitere Proteine gefunden werden, die ebenfalls sehr häufig sowohl mit Seren von gesunden Hunden als auch mit Seren von an DCM erkrankten Hunden reagierten (siehe Abb. 4.5.1). Diese Proteine wurden identifiziert als zytoplasmatische Malat-Dehydrogenase und Kreatinkinase (siehe Tab. 4.6.1), M-Typ. Autoantikörper gegen zytoplasmatische Malat-Dehydrogenase und Kreatinkinase M-Typ gehören deshalb offensichtlich auch zum natürlichen Autoantikörperrepertoire von Hunden.

Die in dieser Studie genutzte Methode, neue Autoantigene in der caninen DCM mittels zweidimensionalen Western Blots zu identifizieren, war für die Fragestellung gut geeignet. Es wurden sechs potenzielle Autoantigene identifiziert. Da die zweidimensionale Auftrennung den Nachteil hat, dass Membranproteine nicht aufgetrennt werden (Rabilloud 2002), wurden zusätzlich eindimensionale Western Blots zur Identifikation von Kandidaten durchgeführt (siehe Abb. 4.3.1)). Hier konnte

aber nur Desmin detektiert werden, das schon in den zweidimensionalen Western Blots auffällig war (siehe Tab. 4.4.1).

Einige der an DCM erkrankten Hunde wiesen keine Autoantikörper auf (1,4% aller DCM-Hunde). Dies kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen ist es möglich, dass bei diesen Hunden keine autoimmune Ätiologie vorliegt. Hier könnten andere Einflüsse, zum Beispiel Gendefekte, ursächlich beteiligt sein. Eine andere Möglichkeit ist es, dass zwar Autoantikörper in den Seren dieser Hunde vorhanden sind, diese Antigene aber nicht mit dieser Methode detektiert wurden. Dies kann verschiedene Gründe haben. Zum einen könnte die Reaktion gegen Membranproteine gerichtet sein, die in der zweidimensionalen Auftrennung des Proteoms verloren gehen (Rabilloud 2002). Um dies zu berücksichtigen, wurden aber in dieser Studie zusätzlich die Reaktivitäten gegen die eindimensional aufgetrennten Proteome getestet, die die Membranproteine beinhalten. Dabei konnten keine neuen Autoantigene gefunden werden, was wiederum zwei Gründe haben kann. Zum einen ist es möglich, dass bei der caninen DCM Membranproteine nicht als Autoantigen dienen. Zum anderen kann es sein, dass die eindimensionale Auftrennung nicht auflösend genug ist, da sich hinter einer Bande mehrere Proteine verbergen können. Eine weitere Ursache kann die Verwendung von equinem Herzmuskel als Autoantigenquelle sein. Möglicherweise sind einige Antigene zwischen den Spezies Pferd und Hund nicht homolog genug, so dass einige Autoantikörper nicht binden konnten. Da pathogene Autoantikörper aber meist an die hoch konservierten Sequenzen der betroffenen Proteine binden (Peter 1996), ist es eher unwahrscheinlich, dass durch die Verwendung von equinem Herzmuskel Autoantikörper übersehen wurden. Außerdem wurden die meisten Proteine, die mittels Massenspektrometrie identifiziert wurden, über Sequenzhomologien identifiziert. Das heißt, dass die meisten Proteine durch Sequenzhomologien zu anderen Spezies identifiziert wurden (siehe Tab. 4.4.1). Die Sequenzen können sich deshalb nicht gravierend voneinander unterscheiden, da sonst die Identifikation nicht gelungen wäre. Wenn es sich bei nicht erkannten Autoantikörpern um niedrig affine Autoantikörper handelt, ist es schwer, diese zu detektieren. Wenn es sich bei einem Teil der DCM-Fälle um T-Zell-medierte Erkrankungen handelt, ist es möglich, dass trotz autoimmuner Pathogenese keine Autoantikörper vorhanden sind. Überdies wird die Tertiärstruktur der zu testenden Antigene durch die Präparation zerstört, was



dazu führen kann, dass das Protein durch den dazugehörigen Antikörper nicht mehr erkannt wird.

Außerdem ist es möglich, dass in späten Phasen der Erkrankung keine Autoantikörper mehr nachweisbar sind. Caforio et al. konnten dieses Phänomen in der humanen DCM beobachten (Caforio et al. 1997). So konnten bei 24% der Patienten bei der Diagnosestellung positive anti-alpha Myosin Autoantikörper-Titer festgestellt werden. Im weiteren Verlauf konnte nur noch bei 14% der an DCM erkrankten Patienten ein positiver anti-alpha Myosin Autoantikörper-Titer festgestellt werden (Caforio et al. 1997). Auch bei anderen autoimmunen Erkrankungen konnten diese Beobachtungen gemacht werden. So konnte beim Typ-1-Diabetes mellitus mit Fortschreiten der Erkrankung weniger Autoantikörper nachgewiesen werden als in früheren Stadien (Bottazzo et al. 1980). Auch bei Hunden mit Hypothyreose konnte im Verlauf der Erkrankung ein Absinken der Autoantikörper gegen Thyreoglobulin festgestellt werden (Deeg et al. 1997). Möglicherweise können bei Patienten in Spätstadien keine Autoantikörper mehr nachgewiesen werden, weil inzwischen sämtliche Autoantigene zerstört wurden. Dies ist für die Hypothyreose bekannt, bei der DCM ist diese Theorie jedoch nicht vorstellbar, da hier auch in Spätstadien noch Autoantigene wie Myosin, cardiac Actin etc. vorhanden sein müssen, um überhaupt eine Herzfunktion zu gewährleisten. Eine Möglichkeit für das Verschwinden von Autoantikörpern in späten Stadien von Autoimmunerkrankungen kann das sogenannte „Epitop Spreading“ sein (Tuohy et al. 1998; Tuohy und Kinkel 2000). Dabei verlagert sich die Immunantwort vom zuerst erkannten, dominanten Epitop auf andere, subdominante Epitope. Epitop Spreading wurde schon bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen, wie der Multiplen Sklerose (Tuohy et al. 1998), Typ-1-Diabetes mellitus (Naserke et al. 1998) und systemischem Lupus erythematoses beschrieben (McCluskey et al. 1998). In letzter Zeit wird Epitop Spreading auch in der DCM vermutet (Jane-wit und Tuohy 2006; Matsumoto et al. 2007). Da sehr viele von herzspezifischen Proteinen stammende Epitope identifiziert werden konnten, halten die Autoren es für sehr wahrscheinlich, dass während des Verlaufes der DCM entweder Epitop Spreading innerhalb eines einzelnen Herz-Proteins oder zwischen mehreren Proteinen auftritt (Jane-wit und Tuohy 2006). Kürzlich erhielt eine japanische Forschergruppe durch ihre DCM-Studie deutliche Hinweise auf B-Zell Epitop Spreading (Matsumoto et al. 2007). Sie immunisierten Lewis-Ratten mit aus Herzen stammendem C-Protein Bruchstück 2 (CC2), woraufhin die Ratten eine DCM

entwickelten. In weiteren Untersuchungen stellten sie fest, dass der wichtigste cardiopathische Teil das Peptid 12 des CC2 (CC2P12) ist. Daraufhin immunisierten sie Lewis-Ratten mit CC2P12. Die Ratten entwickelten nur eine moderate experimentelle autoimmune Myokarditis (EAC), die nicht zu einer dilatativen Kardiomyopathie führte. Daraus schlossen sie, dass die mit CC2 immunisierten Ratten durch Epitop Spreading eine DCM entwickelten, die direkt mit CC2P12 immunisierten Ratten jedoch nicht (Matsumoto et al. 2007). Diese Studie lässt vermuten, dass Epitop Spreading eine essenzielle Rolle in dem Fortschreiten einer Myokarditis zur DCM spielt. Diese Theorie könnte auch erklären, warum in unserer Studie mehrere Autoantigene identifiziert werden konnten.

In unseren Untersuchungen konnten erstmals Hinweise auf organspezifische Autoreaktivitäten bei Hunden mit DCM gefunden werden. Da beim Dobermann keine signifikanten Unterschiede in der Autoantikörperbindung vorlagen, ist es möglich, dass bei dieser Rasse genetische oder andere Veränderungen in der Ätiologie der DCM im Vordergrund stehen.

Als Nächstes muss kritisch geprüft werden, ob es sich bei den hier identifizierten Autoantikörpern um Epiphänomene aufgrund von untergehenden Zellen handelt, ob die Autoantikörper eine T-Zell-abhängige Autoimmunreaktion anzeigen oder direkt zur Pathogenese beitragen. Außerdem bleibt in jedem Fall der prädiktive Wert der Autoantikörper abzuklären, der unabhängig von der pathogenetischen Bedeutung vorhanden sein kann.

Für die weitere Charakterisierung der hier neu identifizierten Antigene GAPDH, GPBB, cardiac Actin, MYL4 und Aconitase muss nun der Beweis erbracht werden, dass sie kardiopathisch sind, um die Witebsky'schen Postulate zu erfüllen (Rose 1993). Hierzu kann man zum einen versuchen, eine DCM im Tierversuch zu induzieren, indem man die Versuchstiere mit dem entsprechenden Autoantigen immunisiert. Während diese Methode das autoantigene Potenzial der Antigene selbst generell testet, unabhängig davon, ob die induzierte Erkrankung T-Zell-mediiert ist oder durch Autoantikörper verursacht, könnte man die Autoantikörper von an DCM erkrankten Hunden isolieren, reinigen und in Versuchstiere transferieren. Mit dieser Methode kann man direkt feststellen, ob die jeweiligen Autoantikörper allein kardiopathisch sind.

Wenn die Pathogenität der Autoantikörper nachgewiesen ist, könnte man gezielt kausale Therapieversuche unternehmen. Eine sehr teure und aufwändige

Behandlung ist in diesem Fall eine Immunadsorption. Hier werden über Affinitätschromatographie neben anderen auch die kardiopathischen Autoantikörper der IgG-Klasse aus dem Plasma entfernt. Diese Methode hat bereits in der humanen DCM bei allen Autoantikörper-positiven Patienten zu guten Erfolgen geführt (Wallukat et al. 1996; Felix et al. 2002; Mobini et al. 2003). Eine andere, die bereits bei anderen autoimmun bedingten Erkrankungen wie z.B. der immunmedierten hämolytischen Anämie genutzt wird, ist die intravenöse Infusion von humanen Immunglobulinen (Link 2001). Von den behandelten Hunden überlebten 80% einen Zeitraum von 1000 Tagen. Der vermutete Wirkmechanismus liegt in einer Blockade der Fc-Rezeptoren auf Makrophagen durch die infundierten Gammaglobuline. Allerdings ist auch diese Therapie für mittelgroße bis große Hunde relativ kostenintensiv (Link 2001). Möglicherweise könnte diese Therapie auch für an DCM erkrankte Hunde, die einen positiven Autoantikörpertiter aufweisen, von Nutzen sein.

Der hohe Prozentsatz Autoantikörper-positiver, jedoch klinisch herzgesunder Kontrollhunde ist im Hinblick auf einen potenziellen prädiktiven Wert dieser Autoantikörper interessant. In mehreren Untersuchungen anderer autoimmuner Erkrankungen konnte ein Zusammenhang zwischen präklinisch auftretenden Autoantikörpern und späterer Erkrankung festgestellt werden (Aho et al. 1992; Notkins und Lernmark 2001; Nielen et al. 2004). So konnten bei Patienten mit rheumatoider Arthritis bereits bis zu fünf Jahre vor Einsetzen der ersten Symptome Autoantikörper festgestellt werden (Nielen et al. 2004). Eine andere in der Diabetes-Forschung tätige Gruppe untersuchte das Vorkommen von Autoantikörpern gegen Pankreas-Inselzellen, Insulin, GAD65 und IA2/ICA512 bei 4500 Schulkindern (LaGasse et al. 2002). Nach acht Jahren konnten 67% der untersuchten Personen erneut kontaktiert werden. Sechs dieser Personen hatten in der Zwischenzeit einen Typ-1-Diabetes mellitus entwickelt. Interessanterweise waren alle erkrankten Personen acht Jahre zuvor auf mehrere der getesteten Autoantikörper positiv, so dass eine 100 prozentige Sensitivität in der Vorhersage der Erkrankung bestand. Von den auf mehrere Autoantigene reagierenden Personen erkrankten 50% nach acht Jahren an einem Typ-1-Diabetes mellitus. Von den Personen, die zu Beginn der Untersuchungen Autoantikörper-negativ waren, erkrankte niemand an einem Typ-1-Diabetes mellitus, so dass der Nachweis von mehreren der hier untersuchten Autoantikörpern bei gesunden Kindern eine wertvolle prädiktive Aussage machte (LaGasse et al. 2002). Kürzlich konnte eine Forschergruppe in der humanen DCM

mittels indirekter Immunfluoreszenz krankheitsvorhersagende anti-Herz-Protein-Autoantikörper feststellen (Caforio et al. 2007). 311 Verwandte von an DCM erkrankten Patienten wurden untersucht. 69% der Verwandten, die später eine DCM entwickelten (n=26), waren bei der fünf Jahre zurückliegenden Untersuchung anti-Herz-Protein-Autoantikörper positiv (Caforio et al. 2007).

Der prädiktive Wert der in dieser Studie gefundenen Autoantikörper für die canine DCM kann erst in einigen Jahren abgeschätzt werden, wenn absehbar ist, ob Autoantikörper-positive Tiere nach einigen Jahren tatsächlich an einer DCM erkranken oder nicht. Deshalb sollte der klinische Verlauf der Autoantikörper-positiven Kontrollhunde verfolgt werden.

Außerdem sollte getestet werden, um welche IgG-Isotypen es sich bei den Autoantikörpern der DCM-Hunde und der gesunden Kontrollhunde handelt und welche Funktion diese einzelnen Isotypen beim Hund haben. Bei Hunden sind bis jetzt vier IgG-Isotypen bekannt (IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4) (Pastoret 1998).

Kürzlich untersuchte eine Forschergruppe bei Patienten mit DCM und bei Patienten mit ischämischen Herzerkrankungen die Eigenschaften der Autoantikörper (Warraich et al. 2006). Beide Gruppen wiesen ähnlich hohe IgG-Titer auf, bei einer weiteren Charakterisierung fiel jedoch auf, dass DCM-Patienten einen höheren Anteil an IgG3-Isotypen (21%) aufwiesen als Patienten mit ischämischen Herzerkrankungen (5%). Beim Menschen gehört IgG3 zu den Hauptaktivatoren des Komplementsystems. Die von DCM-Patienten und Patienten mit ischämischen Herzerkrankungen stammenden aufgereinigten Autoantikörper unterschieden sich außerdem in ihrer Fähigkeit, die Kontraktilität isolierter Myozyten zu verändern. Die von DCM-Patienten stammenden Autoantikörper, die einen höheren Anteil an IgG3-Isotypen aufwiesen, waren in der Lage, die Kontraktilität der Myozyten zu vermindern, indem sie die  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen beeinflussten (Warraich et al. 2006). Möglicherweise werden von DCM-Hunden auch Autoantikörper anderer IgG-Isotypen gebildet als von den Autoantikörper-positiven gesunden Kontrollhunden. Weitere Studien zur Identifikation der entsprechenden Isotypen sind indiziert. Allerdings sind bislang nur Reagenzien gegen zwei der vier IgG-Isotypen (gegen IgG1 und IgG2), die beim Hund bekannt sind, käuflich zu erwerben.

Bisher gibt es nur wenige gute experimentelle Modelle für die DCM. Eine Forschergruppe immunisierte genetisch prädisponierte Mäuselinien mit Herzmyosin,

woraufhin diese einen Phänotyp ähnlich der DCM entwickelten, was Herzmyosin als Autoantigen für die DCM identifizierte (Neu et al. 1987).

Im Jahr 2003 konnte eine Forschergruppe bei Mäusen, die eine Defizienz des programmed-cell-death immunoinhibitory coreceptors (PD-1) tragen und spontan eine DCM entwickelten, einen erhöhten Autoantikörpertiter gegen eine Untereinheit des Troponins (cTnI) ermitteln (Okazaki et al. 2003). Einer Wildtyp-Mäusepopulation wurden dann monoklonale Antikörper mit Spezifität gegen cTnI gespritzt, was zu einer Dilatation und Dysfunktion der Herzen führte (Okazaki et al. 2003). In einem anderen Experiment wurden zehn Kaninchen mit einem synthetisch hergestellten Peptid, das der Sequenz der zweiten extrazellulär gelegenen Schleife des  $\beta_1$ -Adrenorezeptors entsprach, immunisiert (Matsui et al. 1997). Die immunisierten Kaninchen entwickelten morphologische Veränderungen des Herzens, die einer dilatativen Kardiomyopathie ähnelten. Kaninchen, die mit einem M2-muskarinergen Rezeptor immunisiert wurden, entwickelten ebenfalls morphologische Veränderungen des Herzens, hier aber vor allem des rechten Ventrikels (Matsui et al. 1997). Die Schwäche vieler dieser Tiermodelle ist, dass Tiere verwendet werden, die stark ingezogen oder genetisch verändert sind. Außerdem stimmt das klinische Bild der ausgelösten Erkrankung nicht vollkommen mit dem der DCM überein. Der Hund als spontan erkranktes Tier ist deshalb umso interessanter für die Forschung an der humanen DCM.

Aus diesem Grund werden Immunreaktionen von DCM Patienten gegen die in der humanen DCM bisher unbekannt und in dieser Studie identifizierten Autoantigene GAPDH, GPBB Aconitase und MYL4 (nach erfolgreicher Validierung) in Kooperation mit Dr. Stephen Wildhirt vom Deutschen Herzzentrum München getestet werden.

Durch die durchgeführten zweidimensionalen Western Blots konnten bei Hunden mit DCM fünf Autoantigene gefunden werden. Zwei dieser Autoantigene (Herzmyosin, cardiac Actin) waren bereits in der humanen DCM bekannt, vier Autoantigene (GAPDH, GPBB, Aconitase, MYL4) waren bislang als DCM Autoantigene völlig unbekannt. Die zweidimensionalen Western Blots und die Identifikation durch Massenspektrometrie erwiesen sich bei der Untersuchung der humoralen Immunantwort der caninen DCM-Patienten als hervorragende Methoden zum Nachweis von Autoantikörpern und zur nachfolgenden Identifikation potenzieller Autoantigene. Mit der Identifikation dieser Autoantigene wurde eine Grundlage für

weitere Untersuchungen der Immunreaktion bei der dilatativen Kardiomyopathie geschaffen.

## 6 Zusammenfassung

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist charakterisiert durch die Dilatation und beeinträchtigte Kontraktilität des linken oder beider Ventrikel. Sie ist eine der häufigsten Ursachen für ein schweres Herzversagen beim Hund. Häufig von der Erkrankung betroffene Rassen sind Dobermänner, Doggen, Bernhardiner und Irische Wolfshunde. Nur 37% der erkrankten Hunde überleben ein Jahr nach der Diagnosestellung. In vielen Fällen ist die Ätiologie der Erkrankung nicht geklärt. Bei einem Teil der DCM-Fälle scheint es sich um Autoimmunerkrankungen zu handeln.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die humorale Immunantwort von caninen DCM-Patienten mit Hilfe von zweidimensionalen Western Blots auf potenzielle Autoantigene zu untersuchen und diese mittels Massenspektrometrie zu identifizieren. Mit zweidimensionaler Gelelektrophorese ist es möglich, ein Gewebe in mehrere tausend Proteine aufzutrennen und somit Reaktivitäten einzelnen Antigenen zuordnen zu können. Die humorale Immunreaktion von 78 DCM-Patienten und 62 herzgesunden Kontrolltieren wurde im Western Blot getestet und miteinander verglichen.

Die Ergebnisse der zweidimensionalen Western Blots wurden dem Proteinmuster der eingesetzten Herzpräparationen (linkes und rechtes Atrium, linker und rechter Ventrikel) zugeordnet und die Reaktivitäten der DCM erkrankten Tiere mit herzgesunden Kontrolltieren wurden miteinander verglichen. Mit dieser Methode konnten sieben potenzielle DCM-Autoantigene ermittelt werden, die im Anschluß mittels Massenspektrometrie eindeutig identifiziert werden konnten. Dabei handelte es sich um die schwere Kette des Herzmyosins, eine regulatorische leichte Kette des Herzmyosins (MYL4), Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), die Gehirnform der Glycogen Phosphorylase (GPBB), cardiac Actin, Aconitase und Desmin. Die Reaktion gegen sechs dieser Proteine wurde anschließend in eindimensionalen Western Blots mit den gereinigten Proteinen validiert. Nur für MYL4 stehen diese Untersuchungen noch aus. Bei der schweren Kette des Herzmyosins, GAPDH, GPBB, cardiac Actin und Aconitase wiesen die DCM-Hunde signifikant häufiger Autoantikörper auf als die Kontrolltiere. Bei einem großen Teil der DCM-Hunde ergaben sich damit Hinweise auf Autoimmunreaktionen.

In dieser Studie konnten erstmals sechs potenzielle Autoantigene für die canine DCM identifiziert werden. Vier dieser Autoantigene sind auch potenzielle neue Autoantigene für die DCM des Menschen.



## 7 Summary

### **Identification of six potential autoantigens in canine dilated cardiomyopathy**

Dilated cardiomyopathy (DCM) is characterized by dilation and impaired contractility of left or both ventricles. It is one of the most common causes of a heart failure in dogs. Most frequently affected dog breeds are Doberman pinschers, Great Danes, Saint Bernards and Irish Wolfhounds. Only 37% of the diseased dogs survive one year after confirmation of diagnosis. In many cases the diseases' etiology is unknown. Some DCM cases seem to have an autoimmune mediated etiology.

Because of this, the aim of this work was to analyse the humoral immune response of canine DCM patients to identify potential autoantigens using two-dimensional Western Blots and mass-spectrometry. The two-dimensional electrophoresis enables separation of thousands of proteins of a tissue and herewith assigning reactivities to particular antigens.

The humoral immune response of 78 DCM patients and 62 healthy control animals was tested with Western Blots and compared to each other.

The findings of the two-dimensional Western Blots were aligned to the protein pattern of the respective heart preparation which was used (left and right atrium, left and right ventricle) and reactivities of DCM animals and healthy control animals were compared. With this method we were able to identify seven potential DCM autoantigens which we were subsequently able to identify definitely with mass-spectrometry. Potential autoantigens were heart myosin heavy chain, a regulatory light chain of heart myosin (MYL4), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, the brain form of glycogen phosphorylase (GPBB), cardiac actin, aconitase and desmin. Afterwards reactions against six of these proteins were validated with pure proteins in one-dimensional Western Blots. For MYL4 this survey still lacks but will be carried out soon after cloning, expressing and purifying MYL4.

DCM dogs showed significantly more frequent autoantibodies against the heavy chain of heart myosin, GAPDH, GPBB, cardiac actin and aconitase than healthy animals. In the majority of DCM dogs there was evidence for autoimmune reactions.

In this study, for the first time, we were able to identify six potential autoantigens for canine DCM. Four of these autoantigens are also novel potential autoantigens for human DCM.

## 8 Literaturverzeichnis

- Aho, K., P. Koskela, R. Makitalo, M. Heliovaara und T. Palosuo (1992). "Antinuclear antibodies heralding the onset of systemic lupus erythematosus." *J Rheumatol* 19: 1377-1379.
- Bienvenut, W. V., C. Deon, C. Pasquarello, J. M. Campbell, J. C. Sanchez, M. L. Vestal und D. F. Hochstrasser (2002). "Matrix-assisted laser desorption/ionization-tandem mass spectrometry with high resolution and sensitivity for identification and characterization of proteins." *Proteomics* 2: 868-876.
- Bottazzo, G. F., B. M. Dean, A. N. Gorsuch, A. G. Cudworth und D. Doniach (1980). "Complement-fixing islet-cell antibodies in type-I diabetes: possible monitors of active beta-cell damage." *Lancet* 1: 668-672.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Broschk, C. und O. Distl (2005). "[Dilated cardiomyopathy (DCM) in dogs--pathological, clinical, diagnosis and genetic aspects]." *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 112: 380-385.
- Caforio, A. L., E. Bonifacio, J. T. Stewart, D. Neglia, O. Parodi, G. F. Bottazzo und W. J. McKenna (1990). "Novel organ-specific circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy." *J Am Coll Cardiol* 15: 1527-1534.
- Caforio, A. L., J. H. Goldman, M. K. Baig, A. J. Haven, L. Dalla Libera, P. J. Keeling und W. J. McKenna (1997). "Cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy become undetectable with disease progression." *Heart* 77: 62-67.
- Caforio, A. L., N. G. Mahon, M. K. Baig, F. Tona, R. T. Murphy, P. M. Elliott und W. J. McKenna (2007). "Prospective familial assessment in dilated cardiomyopathy: cardiac autoantibodies predict disease development in asymptomatic relatives." *Circulation* 115: 76-83.
- Calvert, C. A., W. L. Chapman, Jr. und R. L. Toal (1982). "Congestive cardiomyopathy in Doberman pinscher dogs." *J Am Vet Med Assoc* 181: 598-602.
- Chang, A. N. und J. D. Potter (2005). "Sarcomeric protein mutations in dilated cardiomyopathy." *Heart Fail Rev* 10: 225-235.
- Cobb, M. A., R. Odedra, N. Latif und M. J. Dunn (1994). "Use of indirect immunofluorescence and western blotting to assess the role of circulating antimyocardial antibodies in dogs with dilated cardiomyopathy." *Res Vet Sci* 56: 245-251.
- Codd, M. B., D. D. Sugrue, B. J. Gersh und L. J. Melton, 3rd (1989). "Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984." *Circulation* 80: 564-572.
- Daehmlow, S., J. Erdmann, T. Knueppel, C. Gille, C. Froemmel, M. Hummel, R. Hetzer und V. Regitz-Zagrosek (2002). "Novel mutations in sarcomeric protein genes in dilated cardiomyopathy." *Biochem Biophys Res Commun* 298: 116-120.
- Dambach, D. M., A. Lannon, M. M. Sleeper und J. Buchanan (1999). "Familial dilated cardiomyopathy of young Portuguese water dogs." *J Vet Intern Med* 13: 65-71.
- Day, M. J. (1996). "Inheritance of serum autoantibody, reduced serum IgA and autoimmune disease in a canine breeding colony." *Vet Immunol Immunopathol* 53: 207-219.
- Deeg, C., A. Kaspers, K. Hartmann, 2nd, W. Kraft und B. Kaspers (1997). "[Canine hypothyroidism: detection of anti-thyroglobulin autoantibodies]." *Tierarztl Prax* 25: 170-173.
- Deeg, C. A., D. Pompetzki, A. J. Raith, S. M. Hauck, B. Amann, S. Suppmann, T. W. Goebel, U. Olazabal, H. Gerhards, S. Reese, M. Stangassinger, B. Kaspers und M. Ueffing

- (2006). "Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis." *Mol Cell Proteomics* 5: 1462-1470.
- Dorffel, W. V., G. Wallukat, G. Baumann und S. B. Felix (2000). "Immunoabsorption in dilated cardiomyopathy." *Ther Apher* 4: 235-238.
- Dukes-McEwan, J. (2000). "Canine dilated cardiomyopathy 1. Breed manifestations and diagnosis." *In Practice* 22: 520-530.
- Eichbaum, F. W. (1975). "'Wavy' myocardial fibers in spontaneous and experimental adrenergic cardiopathies." *Cardiology* 60: 358-365.
- Elliott, P. (2000). "Cardiomyopathy. Diagnosis and management of dilated cardiomyopathy." *Heart* 84: 106-112.
- Everett, R. M., J. McGann, H. C. Wimberly und J. Althoff (1999). "Dilated cardiomyopathy of Doberman pinschers: retrospective histomorphologic evaluation of heart from 32 cases." *Vet Pathol* 36: 221-227.
- Faulkner-Jones, B. E., D. S. Cram, J. Kun und L. C. Harrison (1993). "Localization and quantitation of expression of two glutamate decarboxylase genes in pancreatic beta-cells and other peripheral tissues of mouse and rat." *Endocrinology* 133: 2962-2972.
- Felix, S. B., A. Staudt, W. V. Dorffel, V. Stangl, K. Merkel, M. Pohl, W. D. Docke, S. Morgera, H. H. Neumayer, K. D. Wernecke, G. Wallukat, K. Stangl und G. Baumann (2000). "Hemodynamic effects of immunoabsorption and subsequent immunoglobulin substitution in dilated cardiomyopathy: three-month results from a randomized study." *J Am Coll Cardiol* 35: 1590-1598.
- Felix, S. B., A. Staudt, M. Landsberger, Y. Grosse, V. Stangl, T. Spielhagen, G. Wallukat, K. D. Wernecke, G. Baumann und K. Stangl (2002). "Removal of cardiodepressant antibodies in dilated cardiomyopathy by immunoabsorption." *J Am Coll Cardiol* 39: 646-652.
- Felker, G. M., R. E. Thompson, J. M. Hare, R. H. Hruban, D. E. Clemetson, D. L. Howard, K. L. Baughman und E. K. Kasper (2000). "Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy." *N Engl J Med* 342: 1077-1084.
- Ferrans, V. J. (1989). "Pathologic anatomy of the dilated cardiomyopathies." *Am J Cardiol* 64: C9-C11.
- Freeman, L. M., K. E. Michel, D. J. Brown, P. M. Kaplan, M. E. Stamoulis, S. L. Rosenthal, B. W. Keene und J. E. Rush (1996). "Idiopathic dilated cardiomyopathy in Dalmatians: nine cases (1990-1995)." *J Am Vet Med Assoc* 209: 1592-1596.
- Fu, M. und S. Matsui (2002). "Is cardiomyopathy an autoimmune disease?" *Keio J Med* 51: 208-212.
- Fujioka, S., Y. Kitaura, H. Deguchi, A. Shimizu, T. Isomura, H. Suma und H. N. Sabbah (2004). "Evidence of viral infection in the myocardium of American and Japanese patients with idiopathic dilated cardiomyopathy." *Am J Cardiol* 94: 602-605.
- Galou, M., J. Gao, J. Humbert, M. Mericskay, Z. Li, D. Paulin und P. Vicart (1997). "The importance of intermediate filaments in the adaptation of tissues to mechanical stress: evidence from gene knockout studies." *Biol Cell* 89: 85-97.
- Goldman, J. H., P. J. Keeling, R. S. Warraich, M. K. Baig, S. R. Redwood, L. Dalla Libera, J. E. Sanderson, A. L. Caforio und W. J. McKenna (1995). "Autoimmunity to alpha myosin in a subset of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy." *Br Heart J* 74: 598-603.
- Gorg, A., W. Weiss und M. J. Dunn (2004). "Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics." *Proteomics* 4: 3665-3685.
- Gorza, L., J. J. Mercadier, K. Schwartz, L. E. Thornell, S. Sartore und S. Schiaffino (1984). "Myosin types in the human heart. An immunofluorescence study of normal and hypertrophied atrial and ventricular myocardium." *Circ Res* 54: 694-702.

- Guilbert, B., G. Dighiero und S. Avrameas (1982). "Naturally occurring antibodies against nine common antigens in human sera. I. Detection, isolation and characterization." *J Immunol* 128: 2779-2787.
- Harpster, N. K. (1991). "Boxer cardiomyopathy. A review of the long-term benefits of antiarrhythmic therapy." *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 21: 989-1004.
- Harris, J. I. und R. N. Perham (1968). "Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from pig muscle." *Nature* 219: 1025-1028.
- Holmes, K. C., D. Popp, W. Gebhard und W. Kabsch (1990). "Atomic model of the actin filament." *Nature* 347: 44-49.
- Hyun, C. und L. J. Filippich (2006). "Molecular genetics of sudden cardiac death in small animals - a review." *Vet J* 171: 39-50.
- Itoh-Satoh, M., T. Hayashi, H. Nishi, Y. Koga, T. Arimura, T. Koyanagi, M. Takahashi, S. Hohda, K. Ueda, T. Nouchi, M. Hiroe, F. Marumo, T. Imaizumi, M. Yasunami und A. Kimura (2002). "Titin mutations as the molecular basis for dilated cardiomyopathy." *Biochem Biophys Res Commun* 291: 385-393.
- Jane-wit, D. und V. K. Tuohy (2006). "Autoimmune cardiac-specific T cell responses in dilated cardiomyopathy." *Int J Cardiol* 112: 2-6.
- Kamisago, M., S. D. Sharma, S. R. DePalma, S. Solomon, P. Sharma, B. McDonough, L. Smoot, M. P. Mullen, P. K. Woolf, E. D. Wigle, J. G. Seidman und C. E. Seidman (2000). "Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy." *N Engl J Med* 343: 1688-1696.
- Kandolf, R. und P. H. Hofschneider (1989). "Viral heart disease." *Springer Semin Immunopathol* 11: 1-13.
- Kaplan, J. C. und B. Fontaine (2001). "Neuromuscular disorders: gene location." *Neuromuscul Disord* 11: 764-773.
- Karas, M. und F. Hillenkamp (1988). "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons." *Anal Chem* 60: 2299-2301.
- Kittleson, M. D., B. Keene, P. D. Pion und C. G. Loyer (1997). "Results of the multicenter spaniel trial (MUST): taurine- and carnitine-responsive dilated cardiomyopathy in American cocker spaniels with decreased plasma taurine concentration." *J Vet Intern Med* 11: 204-211.
- Kittleson, M. D., Kienle, R.D. (1998). Primary Myocardial Disease Leading to Chronic Myocardial Failure (Dilated Cardiomyopathy and Related Diseases). In: *Small animal cardiovascular medicine*. St. Louis, Elsevier Mosby: 319-346.
- Klappacher, G., M. Mehrabi, K. Plesch, G. Mundigler, M. Pec, G. Kramer, R. Pacher, R. Ullrich, W. Kukutschki, M. Imhof und et al. (1993). "Serum-soluble CD4 as clinical and immunological marker in patients with dilated cardiomyopathy." *Immunol Lett* 38: 103-109.
- Kolln, J., H. M. Ren, R. R. Da, Y. Zhang, E. Spillner, M. Olek, N. Hermanowicz, L. G. Hilgenberg, M. A. Smith, S. van den Noort und Y. Qin (2006). "Triosephosphate isomerase- and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-reactive autoantibodies in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis." *J Immunol* 177: 5652-5658.
- Kuhl, U., M. Noutsias, B. Seeberg und H. P. Schultheiss (1996). "Immunohistological evidence for a chronic intramyocardial inflammatory process in dilated cardiomyopathy." *Heart* 75: 295-300.
- Kuhl, U., M. Pauschinger, P. L. Schwimmbeck, B. Seeberg, C. Lober, M. Noutsias, W. Poller und H. P. Schultheiss (2003). "Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction." *Circulation* 107: 2793-2798.

- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227: 680-685.
- LaGasse, J. M., M. S. Brantley, N. J. Leech, R. E. Rowe, S. Monks, J. P. Palmer, G. T. Nepom, D. K. McCulloch und W. A. Hagopian (2002). "Successful prospective prediction of type 1 diabetes in schoolchildren through multiple defined autoantibodies: an 8-year follow-up of the Washington State Diabetes Prediction Study." *Diabetes Care* 25: 505-511.
- Latif, N., C. S. Baker, M. J. Dunn, M. L. Rose, P. Brady und M. H. Yacoub (1993). "Frequency and specificity of antiheart antibodies in patients with dilated cardiomyopathy detected using SDS-PAGE and western blotting." *J Am Coll Cardiol* 22: 1378-1384.
- Lauble, H. und C. D. Stout (1995). "Steric and conformational features of the aconitase mechanism." *Proteins* 22: 1-11.
- Levy, S. (2002). "Atrial fibrillation, the arrhythmia of the elderly, causes and associated conditions." *Anadolu Kardiyol Derg* 2: 55-60.
- Li, D., G. Z. Czernuszewicz, O. Gonzalez, T. Tapscott, A. Karibe, J. B. Durand, R. Brugada, R. Hill, J. M. Gregoritch, J. L. Anderson, M. Quinones, L. L. Bachinski und R. Roberts (2001). "Novel cardiac troponin T mutation as a cause of familial dilated cardiomyopathy." *Circulation* 104: 2188-2193.
- Li, D., T. Tapscott, O. Gonzalez, P. E. Burch, M. A. Quinones, W. A. Zoghbi, R. Hill, L. L. Bachinski, D. L. Mann und R. Roberts (1999). "Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy." *Circulation* 100: 461-464.
- Link, M., Dorsch, R. (2001). "Die Behandlung immunmediiertes hämolytischer Anämien des Hundes mit humanen Gammaglobulinen." *Tierarztl Prax* 29 (K): 229-233.
- Mair, J. (1998). "Glycogen phosphorylase isoenzyme BB to diagnose ischaemic myocardial damage." *Clin Chim Acta* 272: 79-86.
- Malkiel, S., S. Factor und B. Diamond (1999). "Autoimmune myocarditis does not require B cells for antigen presentation." *J Immunol* 163: 5265-5268.
- Matsui, S., M. L. Fu, S. Katsuda, M. Hayase, N. Yamaguchi, K. Teraoka, T. Kurihara, N. Takekoshi, E. Murakami, J. Hoebeke und A. Hjalmarson (1997). "Peptides derived from cardiovascular G-protein-coupled receptors induce morphological cardiomyopathic changes in immunized rabbits." *J Mol Cell Cardiol* 29: 641-655.
- Matsumori, A. und C. Kawai (1982). "An experimental model for congestive heart failure after encephalomyocarditis virus myocarditis in mice." *Circulation* 65: 1230-1235.
- Matsumoto, Y., I. K. Park und K. Kohyama (2007). "B-cell epitope spreading is a critical step for the switch from C-protein-induced myocarditis to dilated cardiomyopathy." *Am J Pathol* 170: 43-51.
- Maxson, T. R., K. M. Meurs, L. B. Lehmkuhl, A. L. Magnon, S. E. Weisbrode und C. E. Atkins (2001). "Polymerase chain reaction analysis for viruses in paraffin-embedded myocardium from dogs with dilated cardiomyopathy or myocarditis." *Am J Vet Res* 62: 130-135.
- McCarthy, P. M., S. Nakatani, R. Vargo, K. Kottke-Marchant, H. Harasaki, K. B. James, R. M. Savage und J. D. Thomas (1995). "Structural and left ventricular histologic changes after implantable LVAD insertion." *Ann Thorac Surg* 59: 609-613.
- McCluskey, J., A. D. Farris, C. L. Keech, A. W. Purcell, M. Rischmueller, G. Kinoshita, P. Reynolds und T. P. Gordon (1998). "Determinant spreading: lessons from animal models and human disease." *Immunol Rev* 164: 209-229.
- Medzihradzky, K. F., J. M. Campbell, M. A. Baldwin, A. M. Falick, P. Juhasz, M. L. Vestal und A. L. Burlingame (2000). "The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer." *Anal Chem* 72: 552-558.

- Meurs, K. M., A. L. Magnon, A. W. Spier, M. W. Miller, L. B. Lehmkuhl und J. A. Towbin (2001). "Evaluation of the cardiac actin gene in Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy." *Am J Vet Res* 62: 33-36.
- Meurs, K. M., M. W. Miller und N. A. Wright (2001). "Clinical features of dilated cardiomyopathy in Great Danes and results of a pedigree analysis: 17 cases (1990-2000)." *J Am Vet Med Assoc* 218: 729-732.
- Meurs, K. M., A. W. Spier, M. W. Miller, L. Lehmkuhl und J. A. Towbin (1999). "Familial ventricular arrhythmias in boxers." *J Vet Intern Med* 13: 437-439.
- Michels, V. V., P. P. Moll, F. A. Miller, A. J. Tajik, J. S. Chu, D. J. Driscoll, J. C. Burnett, R. J. Rodeheffer, J. H. Chesebro und H. D. Tazelaar (1992). "The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy." *N Engl J Med* 326: 77-82.
- Mobini, R., A. Staudt, S. B. Felix, G. Baumann, G. Wallukat, J. Deinum, H. Svensson, A. Hjalmarsen und M. Fu (2003). "Hemodynamic improvement and removal of autoantibodies against beta1-adrenergic receptor by immunoadsorption therapy in dilated cardiomyopathy." *J Autoimmun* 20: 345-350.
- Moeremans, M., G. Daneels und J. De Mey (1985). "Sensitive colloidal metal (gold or silver) staining of protein blots on nitrocellulose membranes." *Anal Biochem* 145: 315-321.
- Mogensen, J., R. T. Murphy, T. Shaw, A. Bahl, C. Redwood, H. Watkins, M. Burke, P. M. Elliott und W. J. McKenna (2004). "Severe disease expression of cardiac troponin C and T mutations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy." *J Am Coll Cardiol* 44: 2033-2040.
- Monnet, E., E. C. Orton, M. Salman und J. Boon (1995). "Idiopathic dilated cardiomyopathy in dogs: survival and prognostic indicators." *J Vet Intern Med* 9: 12-17.
- Muller, J., G. Wallukat, M. Dandel, H. Bieda, K. Brandes, S. Spiegelsberger, E. Nissen, R. Kunze und R. Hetzer (2000). "Immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy." *Circulation* 101: 385-391.
- Murphy, R. T., J. Mogensen, A. Shaw, T. Kubo, S. Hughes und W. J. McKenna (2004). "Novel mutation in cardiac troponin I in recessive idiopathic dilated cardiomyopathy." *Lancet* 363: 371-372.
- Nanni, L., M. Pieroni, C. Chimenti, B. Simionati, R. Zimbello, A. Maseri, A. Frustaci und G. Lanfranchi (2003). "Hypertrophic cardiomyopathy: two homozygous cases with "typical" hypertrophic cardiomyopathy and three new mutations in cases with progression to dilated cardiomyopathy." *Biochem Biophys Res Commun* 309: 391-398.
- Naserke, H. E., A. G. Ziegler, V. Lampasona und E. Bonifacio (1998). "Early development and spreading of autoantibodies to epitopes of IA-2 and their association with progression to type 1 diabetes." *J Immunol* 161: 6963-6969.
- Nelson, R. W., Couto, C.G. (2006). Dilatative Kardiomyopathie. In: *Innere Medizin der Kleintiere*, München, Elsevier: 110-120.
- Neu, N., N. R. Rose, K. W. Beisel, A. Herskowitz, G. Gurri-Glass und S. W. Craig (1987). "Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice." *J Immunol* 139: 3630-3636.
- Neumann, D. A., C. L. Burek, K. L. Baughman, N. R. Rose und A. Herskowitz (1990). "Circulating heart-reactive antibodies in patients with myocarditis or cardiomyopathy." *J Am Coll Cardiol* 16: 839-846.
- Newgard, C. B., D. R. Littman, C. van Genderen, M. Smith und R. J. Fletterick (1988). "Human brain glycogen phosphorylase. Cloning, sequence analysis, chromosomal mapping, tissue expression, and comparison with the human liver and muscle isozymes." *J Biol Chem* 263: 3850-3857.

- Nielen, M. M., D. van Schaardenburg, H. W. Reesink, J. W. Twisk, R. J. van de Stadt, I. E. van der Horst-Bruinsma, T. de Gast, M. R. Habibuw, J. P. Vandenbroucke und B. A. Dijkmans (2004). "Increased levels of C-reactive protein in serum from blood donors before the onset of rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 50: 2423-2427.
- Notkins, A. L. und A. Lernmark (2001). "Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues." *J Clin Invest* 108: 1247-1252.
- O'Farrell, P. H. (1975). "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins." *J Biol Chem* 250: 4007-4021.
- O'Grady, M. R. (2004). "Dilated cardiomyopathy: an update." *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 34: 1187-1207.
- Okazaki, T. und T. Honjo (2005). "Pathogenic roles of cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy." *Trends Mol Med* 11: 322-326.
- Okazaki, T., Y. Tanaka, R. Nishio, T. Mitsuiye, A. Mizoguchi, J. Wang, M. Ishida, H. Hiai, A. Matsumori, N. Minato und T. Honjo (2003). "Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice." *Nat Med* 9: 1477-1483.
- Olson, T. M., S. Illenberger, N. Y. Kishimoto, S. Huttelmaier, M. T. Keating und B. M. Jockusch (2002). "Metavinculin mutations alter actin interaction in dilated cardiomyopathy." *Circulation* 105: 431-437.
- Olson, T. M., N. Y. Kishimoto, F. G. Whitby und V. V. Michels (2001). "Mutations that alter the surface charge of alpha-tropomyosin are associated with dilated cardiomyopathy." *J Mol Cell Cardiol* 33: 723-732.
- Olson, T. M., V. V. Michels, S. N. Thibodeau, Y. S. Tai und M. T. Keating (1998). "Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure." *Science* 280: 750-752.
- Pastoret, P.-P., Griebel, P., Bazin, H. (1998). *Handbook of vertebrate immunology*. New York, Academic Press: 261-288.
- Peetz, D., F. Post, H. Schinzel, R. Schweigert, C. Schollmayer, K. Steinbach, F. Dati, F. Noll und K. J. Lackner (2005). "Glycogen phosphorylase BB in acute coronary syndromes." *Clin Chem Lab Med* 43: 1351-1358.
- Penninger, J. M., N. Neu, E. Timms, V. A. Wallace, D. R. Koh, K. Kishihara, C. Pummerer und T. W. Mak (1993). "The induction of experimental autoimmune myocarditis in mice lacking CD4 or CD8 molecules [corrected]." *J Exp Med* 178: 1837-1842.
- Peter, J. B., Shoenfeld, Y. (1996). *Recombinant Autoantibodies*. In: *Autoantibodies*, Amsterdam, Elsevier Science: 668.
- Pohlner, K., I. Portig, S. Pankuweit, F. Lottspeich und B. Maisch (1997). "Identification of mitochondrial antigens recognized by antibodies in sera of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy by two-dimensional gel electrophoresis and protein sequencing." *Am J Cardiol* 80: 1040-1045.
- Pompetzki, D. (2003). *Untersuchung der humoralen Immunantwort von Pferden mit equiner rezidivierender Uveitis auf die Erkennung retinaler Autoantigene*. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
- Portig, I., S. Pankuweit und B. Maisch (1997). "Antibodies against stress proteins in sera of patients with dilated cardiomyopathy." *J Mol Cell Cardiol* 29: 2245-2251.
- Prochorec-Sobieszek, M., Z. T. Bilinska, J. Grzybowski, L. Mazurkiewicz, M. Skwarek, E. Walczak, E. Michalak, K. Cedro, Z. Chmielak, A. Debski, M. Demkow, A. Witkowski, T. Wagner und W. Ruzyllo (2006). "Assessment of the inflammatory process by endomyocardial biopsy in patients with dilated cardiomyopathy based on pathological and immunohistochemical methods." *Kardiol Pol* 64: 479-488.

- Rabilloud, T. (2002). "Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains." *Proteomics* 2: 3-10.
- Regitz-Zagrosek, V., J. Erdmann, E. Wellnhofer, J. Raible und E. Fleck (2000). "Novel mutation in the alpha-tropomyosin gene and transition from hypertrophic to hypocontractile dilated cardiomyopathy." *Circulation* 102: E112-116.
- Rehm, H. (2002). Gele. In: *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*, Spektrum Akademischer Verlag: 7-10.
- Richardson, P., W. McKenna, M. Bristow, B. Maisch, B. Mautner, J. O'Connell, E. Olsen, G. Thiene, J. Goodwin, I. Gyarfás, I. Martin und P. Nordet (1996). "Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies." *Circulation* 93: 841-842.
- Robbins, A. H. und C. D. Stout (1989). "The structure of aconitase." *Proteins* 5: 289-312.
- Rose, N. R., Bona, C (1993). "Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited)." *Immunol Today* 14: 426-430.
- Salinovich, O. und R. C. Montelaro (1986). "Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." *Anal Biochem* 156: 341-347.
- Schaper, J. (1993). "The structural correlate of reduced cardiac function in dilated cardiomyopathy." *Heart Failure* 9: 95-111.
- Schoppet, M. und B. Maisch (2001). "Alcohol and the heart." *Herz* 26: 345-352.
- Schulze, K., B. F. Becker, R. Schauer und H. P. Schultheiss (1990). "Antibodies to ADP-ATP carrier--an autoantigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy--impair cardiac function." *Circulation* 81: 959-969.
- Schwimbeck, P. L., C. Badorff, G. Rohn, K. Schulze und H. P. Schultheiss (1996). "The role of sensitized T-cells in myocarditis and dilated cardiomyopathy." *Int J Cardiol* 54: 117-125.
- Shmilovich, H., A. Danon, O. Binah, A. Roth, G. Chen, D. Wexler, G. Keren und J. George (2006). "Autoantibodies to cardiac troponin I in patients with idiopathic dilated and ischemic cardiomyopathy." *Int J Cardiol*: Epub ahead of print.
- Silbernagl, S., Klinke, R. (2003). *Muskulatur*. In: *Lehrbuch der Physiologie*, Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag: 85.
- Sisson, D., O'Grady, M.R., Calvert, C.A. (1999). Myocardial diseases of dogs. In: *Textbook of canine and feline cardiology: principles and clinical practice* Philadelphia, W.B. Saunders: 581-619.
- Smith, S. C. und P. M. Allen (1991). "Myosin-induced acute myocarditis is a T cell-mediated disease." *J Immunol* 147: 2141-2147.
- Spier, A. W., K. M. Meurs, D. D. Covert, L. B. Lehmkuhl, M. R. O'Grady, L. M. Freeman, A. H. Burghes und J. A. Towbin (2001). "Use of western immunoblot for evaluation of myocardial dystrophin, alpha-sarcoglycan, and beta-dystroglycan in dogs with idiopathic dilated cardiomyopathy." *Am J Vet Res* 62: 67-71.
- Stabej, P., S. Imholz, S. A. Versteeg, C. Zijlstra, A. A. Stokhof, A. Domanjko-Petric, P. A. Leegwater und B. A. van Oost (2004). "Characterization of the canine desmin (DES) gene and evaluation as a candidate gene for dilated cardiomyopathy in the Dobermann." *Gene* 340: 241-249.
- Staudt, A., A. Hummel, J. Ruppert, M. Dorr, C. Trimpert, K. Birkenmeier, T. Krieg, Y. Staudt und S. B. Felix (2006). "Immunoabsorption in dilated cardiomyopathy: 6-month results from a randomized study." *Am Heart J* 152: 711-716.
- Staudt, A., R. Mobini, M. Fu, Y. Grosse, V. Stangl, K. Stangl, A. Thiele, G. Baumann und S. B. Felix (2001). "beta(1)-Adrenoceptor antibodies induce positive inotropic response in isolated cardiomyocytes." *Eur J Pharmacol* 423: 115-119.



- Staudt, Y., R. Mobini, M. Fu, S. B. Felix, J. P. Kuhn und A. Staudt (2003). "Beta1-adrenoceptor antibodies induce apoptosis in adult isolated cardiomyocytes." *Eur J Pharmacol* 466: 1-6.
- Stefanelli, C. B., A. Rosenthal, A. B. Borisov, G. J. Ensing und M. W. Russell (2004). "Novel troponin T mutation in familial dilated cardiomyopathy with gender-dependant severity." *Mol Genet Metab* 83: 188-196.
- Switzer, R. C., 3rd, C. R. Merrill und S. Shifrin (1979). "A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels." *Anal Biochem* 98: 231-237.
- Takasaki, Y., K. Kaneda, M. Matsushita, H. Yamada, M. Nawata, R. Matsudaira, M. Asano, R. Mineki, N. Shindo und H. Hashimoto (2004). "Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is a novel autoantigen leading autoimmune responses to proliferating cell nuclear antigen multiprotein complexes in lupus patients." *Int Immunol* 16: 1295-1304.
- Taylor, D. O., L. B. Edwards, M. M. Boucek, E. P. Trulock, D. A. Waltz, B. M. Keck und M. I. Hertz (2006). "Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-third official adult heart transplantation report--2006." *J Heart Lung Transplant* 25: 869-879.
- Tidholm, A., J. Haggstrom, M. Borgarelli und A. Tarducci (2001). "Canine idiopathic dilated cardiomyopathy. Part I: Aetiology, clinical characteristics, epidemiology and pathology." *Vet J* 162: 92-107.
- Tidholm, A., J. Haggstrom und L. Jonsson (1998). "Prevalence of attenuated wavy fibers in myocardium of dogs with dilated cardiomyopathy." *J Am Vet Med Assoc* 212: 1732-1734.
- Tidholm, A., J. Haggstrom und L. Jonsson (2000). "Detection of attenuated wavy fibers in the myocardium of Newfoundlands without clinical or echocardiographic evidence of heart disease." *Am J Vet Res* 61: 238-241.
- Tidholm, A. und L. Jonsson (1997). "A retrospective study of canine dilated cardiomyopathy (189 cases)." *J Am Anim Hosp Assoc* 33: 544-550.
- Tidholm, A. und L. Jonsson (2005). "Histologic characterization of canine dilated cardiomyopathy." *Vet Pathol* 42: 1-8.
- Tidholm, A., H. Svensson und C. Sylven (1997). "Survival and prognostic factors in 189 dogs with dilated cardiomyopathy." *J Am Anim Hosp Assoc* 33: 364-368.
- Tontsch, D., S. Pankuweit und B. Maisch (2000). "Autoantibodies in the sera of patients with rheumatic heart disease: characterization of myocardial antigens by two-dimensional immunoblotting and N-terminal sequence analysis." *Clin Exp Immunol* 121: 270-274.
- Towbin, H., T. Staehelin und J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4354.
- Tsubata, S., K. R. Bowles, M. Vatta, C. Zintz, J. Titus, L. Muhonen, N. E. Bowles und J. A. Towbin (2000). "Mutations in the human delta-sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy." *J Clin Invest* 106: 655-662.
- Tuohy, V. K. und R. P. Kinkel (2000). "Epitope spreading: a mechanism for progression of autoimmune disease." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 48: 347-351.
- Tuohy, V. K., M. Yu, L. Yin, J. A. Kawczak, J. M. Johnson, P. M. Mathisen, B. Weinstock-Guttman und R. P. Kinkel (1998). "The epitope spreading cascade during progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis." *Immunol Rev* 164: 93-100.
- Vandekerckhove, J. und K. Weber (1978). "At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide." *J Mol Biol* 126: 783-802.

- Villard, E., L. Duboscq-Bidot, P. Charron, A. Benaiche, V. Conraads, N. Sylvius und M. Komajda (2005). "Mutation screening in dilated cardiomyopathy: prominent role of the beta myosin heavy chain gene." *Eur Heart J* 26: 794-803.
- Vollmar, A. C. (2000). "The prevalence of cardiomyopathy in the Irish wolfhound: a clinical study of 500 dogs." *J Am Anim Hosp Assoc* 36: 125-132.
- Vollmar, A. C. (2002). "Dilated cardiomyopathy in the dog." *Praktischer Tierarzt* 83: 680-685.
- Wallace, K. B. (2003). "Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy." *Pharmacol Toxicol* 93: 105-115.
- Wallukat, G., P. Reinke, W. V. Dorffel, H. P. Luther, K. Bestvater, S. B. Felix und G. Baumann (1996). "Removal of autoantibodies in dilated cardiomyopathy by immunoabsorption." *Int J Cardiol* 54: 191-195.
- Warrach, R. S., E. Griffiths, A. Falconar, V. Pabbathi, C. Bell, G. Angelini, M. S. Suleiman und M. H. Yacoub (2006). "Human cardiac myosin autoantibodies impair myocyte contractility: a cause-and-effect relationship." *Faseb J* 20: 651-660.
- Wittmann-Liebold, B., H. R. Graack und T. Pohl (2006). "Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry." *Proteomics* 6: 4688-4703.
- Wynne, J., Braunwald, E., (2001). The cardiomyopathies and myocarditides. In: heart disease. A textbook of cardiovascular medicine Philadelphia, W.B. Saunders: 1751-1806.
- Zwaka, T. P., D. Manolov, C. Ozdemir, N. Marx, Z. Kaya, M. Kochs, M. Hoher, V. Hombach und J. Torzewski (2002). "Complement and dilated cardiomyopathy: a role of sublytic terminal complement complex-induced tumor necrosis factor-alpha synthesis in cardiac myocytes." *Am J Pathol* 161: 449-457.

## 9 Danksagung

Allen voran danke ich Herrn Prof. Dr. M Stangassinger für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz und die guten Arbeitsbedingungen.

Frau Prof. Dr. C. Deeg möchte ich besonders herzlich für die außerplanmäßige Überlassung des Themas, die jederzeit gewährte Unterstützung und exzellente Betreuung bedanken. Ihre Unterstützung war in jeder Hinsicht großartig.

Ein besonderer Dank gilt Frau Barbara Amann, die bei technischen Problemen immer einen Ratschlag parat hatte, auch wenn sie eigentlich keine Tipps mehr geben wollte.

Für die Durchführung der Massenspektrometrie danke ich Frau S. Schöffmann und Frau Dr. S. Hauck, die zusätzlich freundlicherweise Korrektur gelesen hat.

Außerdem danke ich Frau Prof. C. Poulsen-Nautrup und Herrn Dr. J.-G. Kresken für die echokardiographischen Untersuchungen und das Sammeln der Serumproben von an DCM erkrankten Irischen Wolfshunden und Dobermännern.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. M. Deinert dafür, dass er mir Serumproben von an DCM erkrankten Hunden überlassen hat. Weiterhin möchte ich Frau Prof. U. Matis danken, die mir freundlicherweise Seren von herzgesunden Dobermännern zukommen ließ.

Ein weiterer Dank gilt den Züchtern von Irischen Wolfshunden, insbesondere Frau Sabine Hohenberger, bei denen ich Serumproben, die ich noch für die Gruppe herzgesunder Hunde benötigte, nehmen durfte. Außerdem danke ich allen anderen Hunden, die mehr oder weniger freiwillig Serum spendeten.

Für das gute Arbeitsklima und die nette Unterstützung durch Korrekturlesen und Schokolade möchte ich bei meinen Kollegen Frank Altmann, Dr. Albert Raith und Johanna Zipplies ganz herzlich bedanken.

Für das Binden meiner Arbeit bedanke ich mich recht herzlich bei Herrn Peter Menzel.

Danken möchte ich auch Herrn Rolf Meinen für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Tiermedizinstudium und die Durchführung meiner Doktorarbeit ermöglichten.

Ein großer Dank gilt auch meinem Freund John, der mich immer geduldig unterstützt hat.