

**Idiopathische dilatative Kardiomyopathie: Untersuchungen zur Rolle der
ventrikulären leichten Myosinkette Typ 2**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

- doctor rerum naturalium -

angefertigt an der
Klinik für Innere Medizin I, Abteilung Kardiologie des Klinikums
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Biol. Daniela Haase,
geb. am 18.03.1973 in Karl-Marx-Stadt

Zusammenfassung

Kardiomyopathien gehören zu den häufigsten Ursachen von Herzversagen. Unter ihnen nimmt die dilatative Kardiomyopathie als eine der zahlreichsten zur Herztransplantation führenden Erkrankung eine entscheidende Rolle ein. Sind Ätiologie und Pathogenese des Krankheitsbildes unklar, liegt eine idiopathische dilatative Kardiomyopathie (IDCM) vor. Im Verlauf der IDCM kommt es zu einem massiven Myozytenverlust und einer wachsenden Einschränkung der kardialen Pumpfunktion. Daher besteht ein großes Interesse, die pathogenetischen Prozesse, welche zum Bild einer IDCM führen, zu verstehen bzw. neue Ansatzpunkte für weiterführende, therapeutisch wirksame Behandlungsmöglichkeiten zu finden. In diesem Zusammenhang sollte das Kandidatengen Ventrikuläre Leichte Myosinkette Typ 2 (MLC2V) in Bezug auf eine vermutete Rolle in der Pathogenese der IDCM näher charakterisiert werden. Die MLC2V bindet paarweise an die schwere Myosinkette und ist in die Regulation und Modulation der myofibrillären Kontraktion involviert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Grad der Expression der MLC2V an gesundem und krankem Myokardgewebe sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene ermittelt werden. Zudem sollte die Abgrenzung des Expressionsgrades von anderen terminalen Herzinsuffizienzformen untersucht werden. Da bisherige Studien gezeigt haben, daß Mutationen in kardialen Proteinen für genetisch bedingte Formen einer DCM verantwortlich sein können, sollte im weiteren Verlauf eine Suche nach Mutationen im Gen für die MLC2V durchgeführt werden. Das Vorkommen von Autoimmunphänomenen bei der DCM führte zudem zu der Frage, ob die Anwesenheit von Autoantikörpern gegen das MLC2V-Protein zum Fortschreiten der IDCM beitragen kann. Für die Untersuchungen auf RNA-Ebene fanden Myokardgewebeproben von IDCM-Patienten, Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) sowie Kontrollproben Verwendung. Für die Untersuchungen auf Proteinebene wurde zudem rekombinantes humanes MLC2V hergestellt.

Mit den vorhandenen Gewebeproben konnte im Rahmen dieser Arbeit eine gegenüber gesunden Kontrollen und Patienten mit KHK um den Faktor fünf erhöhte MLC2V-Transkriptionsrate in den IDCM-Proben gezeigt werden. Die erhöhte Transkription ließ sich von anderen Herzerkrankungen abgrenzen und kann damit als selektives Bild der IDCM betrachtet werden. Neben RT-PCR und Northernblot trug die Anwendung der cDNA-Microarray-Technologie zur Bestätigung dieses Befundes bei. Die Sequenzierung der Exons der MLC2V erbrachte neben wenigen Polymorphismen keine relevanten Mutationen. Die mit der MLC2V assoziierte leichte Myosinkette Typ 1 (MLC1V) sowie der Bindungsbereich der

schweren Myosinkette wurden ebenfalls sequenziert. Hier fand sich in der MLC1V im kodierenden Bereich eine Mutation, welche einen Aminosäureaustausch nach sich zieht (Leu164 Met). Durch Familienanamnese konnte hier eine neue, sporadisch auftretende Form einer familiären DCM ermittelt werden.

Im Gegensatz zur mRNA-Ebene konnte eine Erhöhung des MLC2V-Spiegels auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden. Vermutet wird deshalb, daß der hier gezeigte erhöhte mRNA-Spiegel Ausdruck eines kompensatorischen Mechanismus ist. Unter Nutzung des rekombinanten Proteins wurden Seren von IDCM-, KHK- und Kontrollproben auf spezifische Antikörper gegen die MLC2V untersucht und es wurden bei 4 % der IDCM-Proben Antikörper-positive Signale detektiert. Mittels 2D-Elektrophorese wurde zusätzlich nach Anzeichen für Modifizierungen des MLC2V-Proteins im IDCM-Herzen gegenüber dem gesunden Herzen gesucht. Dabei fand sich bei den IDCM-Proben eine Verschiebung des Molekulargewichts in den höhermolekularen Bereich. Eine massenspektrometrische Analyse deutet zudem eine in den IDCM-Proben erhöhte Phosphorylierungsrate pro MLC2V-Molekül an.

Insgesamt läßt sich die vermutete Rolle der MLC2V in der Pathophysiologie der IDCM zeigen. Ein einheitliches pathogenetisches Bild scheint es nicht zu geben, jedoch deuten die Ergebnisse in dieser Arbeit darauf hin, daß die Vererbung von Mutationen in der MLC1V wie auch das Vorhandensein von Antikörpern gegen die MLC2V eine IDCM auslösen bzw. die Pathogenese negativ beeinflussen können. Es wurden im Hinblick auf die MLC2V neue Ansatzpunkte gefunden, welche durch weiterführende Untersuchungen eine Rolle in der Diagnostik der IDCM einnehmen könnten. Ob die erhöhte MLC2V-Transkription ein Ausdruck für den Bedarf der Myozyten ist, sich an eine erhöhte Pumpleistung des Herzens anzupassen, einen initiierenden Einfluß auf den Untergang der Myozyten ausübt oder nur ein Epiphänomen anderer metabolischer Veränderungen darstellt, ist dabei noch unklar.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Bau und Funktion des kontraktiles Apparates von Herzmuskelzellen	1
1.2. Das Myosinmolekül	5
1.3. Expression und Funktion der leichten Myosinketten im humanen Herz	7
1.3.1. Expression der leichten Myosinketten.....	7
1.3.2. Funktion der leichten Myosinketten.....	8
1.3.3. Phosphorylierung der regulatorischen leichten Myosinkette.....	9
1.4. Herzinsuffizienz und Kardiomyopathien	10
1.5. Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie	11
1.5.1. Familiär-genetische Formen.....	12
1.5.2. Virale Formen.....	15
1.5.3. Autoimmune Formen.....	17
1.5.4. Idiopathische Formen.....	18
1.6. Zielstellung der Arbeit	20
2. Material und Methoden	22
2.1. Materialien	22
2.1.1. Geräte.....	22
2.1.2. Verbrauchsmaterialien / Kits.....	22
2.1.3. Puffer / Lösungen.....	23
2.1.4. Chemikalien.....	25
2.1.5. Enzyme / Proteine.....	25
2.1.6. Kulturmedien / Komponenten.....	25
2.1.7. Zellen / Vektoren.....	26
2.1.8. Antikörper.....	26
2.1.9. DNA- und Proteinstandards.....	26
2.1.10. Oligonukleotide.....	26
2.1.11. Software.....	27
2.1.12. Datenbankanalysen / Internetressourcen.....	27
2.1.13. Klinische Proben.....	27
2.2. Methoden	29
2.2.1. Allgemeine Arbeitstechniken.....	29
2.2.2. Qualitative und quantitative Untersuchungen auf mRNA-Ebene.....	30

2.2.2.1. Qualitativer Nachweis von MLC1V- und MLC2V-mRNA in verschiedenen Zelllinien.....	30
2.2.2.2. Equilibrierung der cDNA-Proben aus Myokardgewebe.....	31
2.2.2.3. Semiquantitative RT-PCR.....	32
2.2.2.4. Echtzeit-PCR (real time PCR).....	32
2.2.2.5. MLC1V/MLC2V-Duplex-RT-PCR.....	33
2.2.2.6. Northernblot.....	34
2.2.2.7. DNA Microarray Analyse.....	35
2.2.3. Suche nach Mutationen in den Genen der leichten Myosinketten.....	35
2.2.3.1. Didesoxy-Fingerprinting (ddf).....	35
2.2.3.2. Sequenzierung.....	37
2.2.3.3. Sequenzanalyse und Restriktionsenzymverdau.....	37
2.2.4. Quantitative und qualitative Untersuchungen auf Proteinebene.....	38
2.2.4.1. Quantitativer Immunblot.....	38
2.2.4.2. Herstellung von rekombinantem MLC2V.....	39
2.2.4.3. Autoantikörper-Screening.....	43
2.2.4.4. Immunhistochemie.....	44
2.2.4.5. 2D-Elektrophorese.....	44
3. Ergebnisse	46
3.1. Qualitative und quantitative Untersuchungen auf mRNA-Ebene	46
3.1.1. Qualitativer Nachweis der MLC1V- und MLC2V-Transkription.....	46
3.1.2. Equilibrierung der cDNA-Proben aus Myokardgewebe.....	47
3.1.3. Quantifizierung der cDNA-Proben mittels semiquantitativer RT-PCR.....	48
3.1.4. Quantifizierung der cDNA-Proben mittels Echtzeit-PCR (real time PCR).....	50
3.1.5. Quantifizierung der cDNA-Proben mittels MLC2V/MLC1V-Duplex-RT-PCR...53	
3.1.6. Verifizierung der erhöhten Transkription des MLC2V-Gens im Myokard.....	55
3.1.6.1. Quantifizierung von RNA-Proben mittels Northernblot.....	55
3.1.6.2. Quantifizierung von mRNA-Proben mittels Microarray Analyse.....	56
3.1.7. Quantifizierung von RNA-Proben aus dem Rattenmyokard mittels Northernblot.....	57
3.1.8. Zusammenfassung der quantitativen Untersuchungen auf mRNA-Ebene.....	59
3.2. Suche nach Mutationen in den Genen der leichten Myosinketten	60
3.2.1. Suche nach Veränderungen in der DNA-Sequenz mittels Didesoxy-Fingerprinting.....	60
3.2.2. Suche nach Veränderungen in der DNA-Sequenz mittels Sequenzierung.....	61

3.2.3. Untersuchung des T132C-Polymorphismus mittels Restriktionsenzymverdau.....	63
3.2.4. Untersuchung des C490A-Genotyps.....	65
3.3. <i>Quantitative und qualitative Untersuchungen auf Proteinebene</i>	66
3.3.1. Quantitativer Nachweis des MLC2V-Proteins mittels Immunblot.....	66
3.3.2. Herstellung von rekombinantem MLC2V-Protein	67
3.3.3. Suche nach Autoantikörpern im Serum von DCM-Patienten.....	70
3.3.3.1. Autoantikörper-Screening mittels Immunblot.....	70
3.3.3.2. Autoantikörper-Screening mittels direktem ELISA	71
3.3.4. Nachweis der MLC2V-Proteinexpression mittels Immunhistochemie	72
3.3.5. Untersuchungen zum MLC2V-Protein mittels 2D-Elektrophorese.....	73
4. Diskussion.....	78
4.1. <i>Untersuchungen zur MLC2V-Expression auf mRNA-Ebene</i>	78
4.2. <i>Suche nach Mutationen in den Genen der ventrikulären leichten Myosinketten</i>.....	85
4.3. <i>Untersuchungen zur MLC2V-Expression auf Proteinebene</i>	92
4.3.1. Quantitative Untersuchungen.....	92
4.3.2. Suche nach Autoantikörpern.....	95
4.3.3. Qualitative Untersuchungen mittels 2D-Elektrophorese	98
5. Anhang	102
5.1. Abkürzungsverzeichnis.....	102
5.2. Literaturverzeichnis	105
5.3. Oligonukleotide.....	119
5.4. Danksagung.....	121
5.5. Lebenslauf.....	122
5.6. Selbständigkeitserklärung.....	123
5.7. Erklärung zur Bewerbung.....	124

1. Einleitung

1.1. Bau und Funktion des kontraktilem Apparates von Herzmuskelzellen

Das Herz ist ein besonderer Hohlmuskel, welcher sowohl funktionell als auch strukturell unterteilt ist: Die linke Herzhälfte leitet das mit Sauerstoff angereicherte und von den Lungenvenen kommende Blut in die Aorta, von wo aus es in die Körperregionen transportiert wird. Die rechte Herzhälfte ist für die Weiterleitung des sauerstoffarmen Blutes verantwortlich, das von den Hohlvenen in die Lungenarterien und schließlich in die Lunge fließt. Jede Herzhälfte ist in zwei Kammern unterteilt (s. Abb. 1-1). Während die im oberen Abschnitt gelegene und als Vorhof (Atrium) bezeichnete Kammer das zufließende Blut sammelt, setzt die im unteren Abschnitt gelegene Kammer (Ventrikel) durch eine heftige Kontraktion das Blut in Bewegung. Da der arterielle Blutkreislauf viel größer als der Lungenkreislauf ist, verfügt die linke Herzkammer über deutlich mehr Muskelmasse als die rechte.

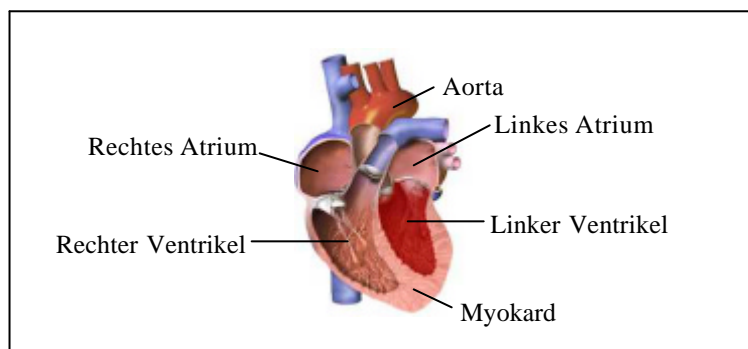


Abb. 1-1 Schematische Darstellung des Herzens

Beim Menschen werden drei Gruppen von Muskelgeweben unterschieden (1). Die *glatte* Muskulatur besteht aus spindelförmigen, einkernigen Einzelzellen, die keine Querstreifung haben. Glattes Muskelgewebe ist in den Eingeweiden zu finden, es bewegt sich langsam und ist unwillkürlich vom vegetativen Nervensystem gesteuert. Die *Skelettmuskulatur* dagegen besteht aus sehr großen, vielkernigen Zellen, den Skelettmuskelfasern. Diese weisen eine quergestreifte Struktur auf und werden willkürlich, vom somatischen Nervensystem innerviert. In der *Herzmuskulatur* vereinigen sich die typischen Merkmale sowohl der glatten als auch der gestreiften Muskulatur. Sie kommt nur in der Herzwand vor und besteht aus ein- bis mehrkernigen, quergestreiften Einzelzellen von ca. 0,1 mm Länge, die zu Herzmuskel-

fasern aneinandergelagert sind. Die Herzmuskulatur kontrahiert sich rasch und wird wie die glatte Muskulatur unwillkürlich gesteuert.

Die Muskelschicht des Herzens, das *Myokard*, gibt dem Organ die Fähigkeit, durch Kontraktion das Blut fortzubewegen (1; 2). In Aufbau und Funktion des kontraktiven Systems gleicht die Herzmuskulatur den Skelettmuskelzellen. Im Inneren eines Kardiomyozyten (Herzmuskelzelle) befinden sich die *Myofibrillen*, welche sich in Längsrichtung durch die Zelle ziehen und den Zellkern dabei umlaufen, so daß vor und hinter diesem ein fibrillenfreier Sarkoplasmakegel erscheint. Wo die Enden zweier Kardiomyozyten aneinanderstoßen, sind die stark gefalteten Zellmembranen großflächig miteinander verbunden, was im Lichtmikroskop als „Glanzstreifen“ zu erkennen ist. Über diese sind die Myofibrillen der Herzmuskelzellen zu *Herzmuskelfasern* verbunden (Abb. 1-2).

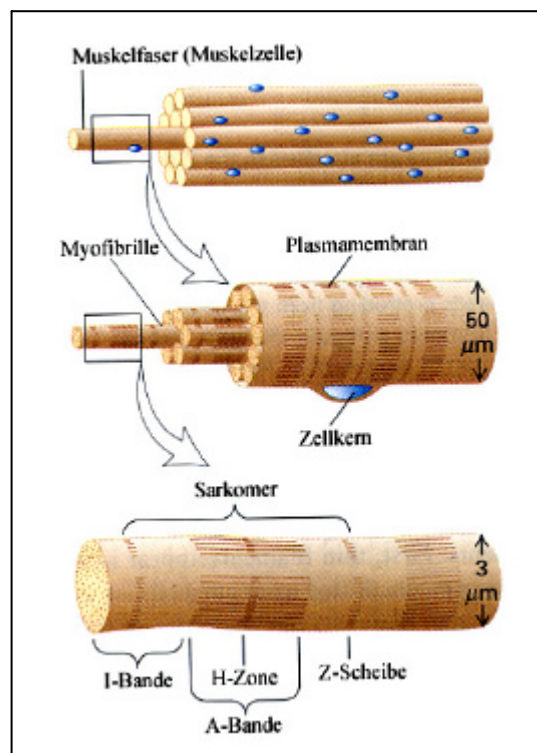


Abb. 1-2 Schematische Darstellung des Aufbaus eines quergestreiften Muskels (modifiziert nach Lodish H et al., 2000)

Quergestreiftes Muskelgewebe besteht aus Muskelfasern, welche aus zahlreichen Aktin- und Myosinfilamenten, organisiert in Myofibrillen, zusammengesetzt sind. Die Myofibrillen durchziehen die Zelle in Längsrichtung und geben ihr durch ihre funktionellen Einheiten, die Sarkomere, das typische gestreifte Aussehen.

In den Myofibrillen sind die *Aktin- und Myosinfilamente* organisiert. Sie liegen in Längsrichtung eng beieinander und bilden die funktionellen Einheiten in den Myofibrillen, die *Sarkomere*. Jedes Sarkomer wird von zwei *Z-Scheiben* begrenzt, in denen die Aktinfilamente mit ihren Plus-Enden verankert sind. In der Mitte des Sarkomers befindet sich die *M-Scheibe*, die wiederum die Mitte der bipolaren Myosinfilamente markiert. Je nach

Aktinmolekülen in den Filamenten erreicht. Die Gleitgeschwindigkeit ist dabei stark von der Art der Myosin-Isoformen abhängig. Die Kontraktion im Sarkomer wird durch Ca^{2+} reguliert. Die Ca^{2+} -Konzentration steigt auf einen Reiz hin durch Ca^{2+} -Ausstrom aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum an und die Ca^{2+} -Ionen werden von Troponin C gebunden. Dadurch entsteht eine Konformationsänderung im Troponin/Tropomyosinkomplex, die die hemmende Wirkung von Troponin-I aufhebt und das Tropomyosin tiefer in die Rille des Aktinfilaments gleiten läßt. Damit wird der notwendige Kontakt zwischen Myosinkopf und Aktinfilament geschaffen, und der Kontraktionszyklus kann beginnen. Durch den zunächst schwachen Kontakt zwischen Aktin und Myosin findet die Hydrolyse von ATP ($\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$) statt, welches am Kopf des Myosins im aktiven Zentrum gebunden ist. Die Dissoziation des Phosphats liefert die nötige Energie für die Bewegung des Myosinkopfes und dies führt zu einer starken Bindung zwischen Aktin und Myosin und zu einer Konformationsänderung im Myosinkopf (Abb. 1-4).

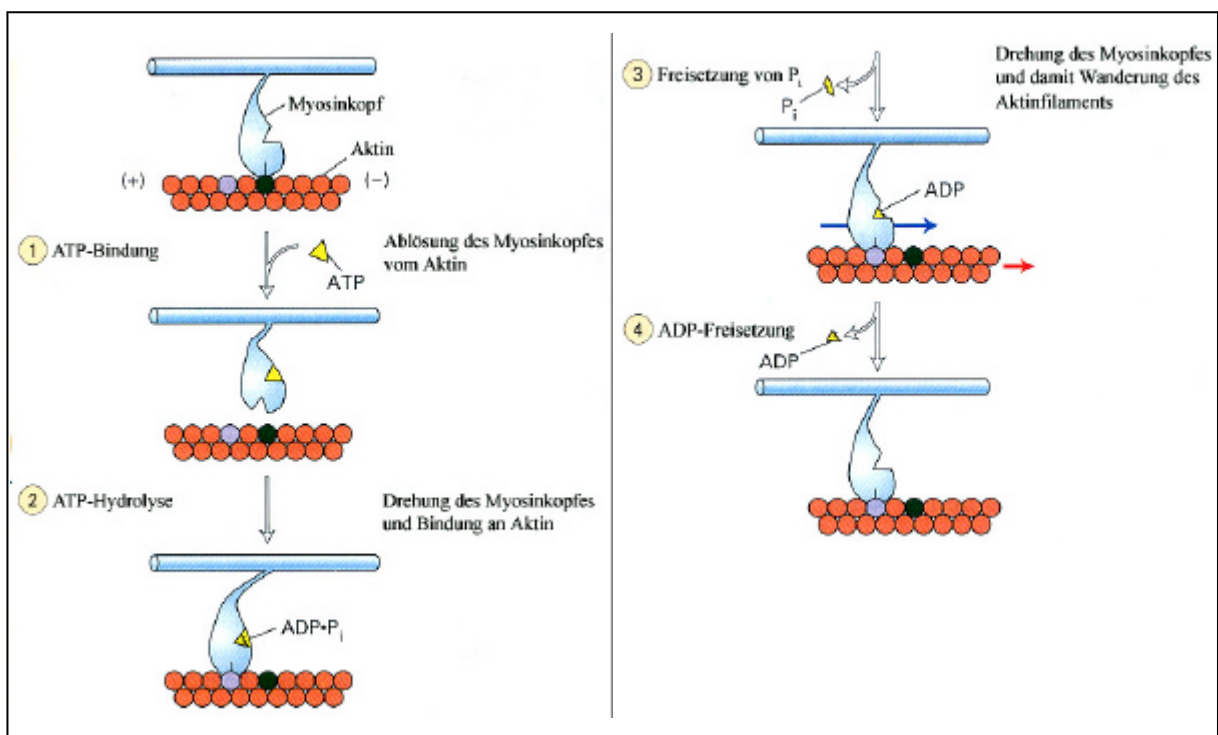


Abb. 1-4 Schematische Darstellung des Myosin-ATP-Hydrolyse-Zyklus während der Kontraktion (modifiziert nach Lodish H et al., 2000)

In Abwesenheit von ATP bindet der Myosinkopf fest an Aktin. Nach Bindung eines ATP-Moleküls (1) löst sich der Myosinkopf vom Aktin. ATP wird zu ADP und P_i gespalten (2), wobei die Hydrolyseprodukte am Myosin gebunden bleiben. Dadurch entsteht ein „energiereicher“ Myosinkopf, der sich so dreht, daß er senkrecht zum Aktinfilament steht. Unter Freisetzung von P_i (3) unterliegt der Myosinkopf einer zweiten Konformationsänderung und wird am Aktinfilament gebunden. Durch diese Bindung kann sich der Myosinkopf drehen und verschiebt das Aktinfilament relativ zum Myosin, woraus die Kontraktion des Sarkomers resultiert. Gleichzeitig wird ADP vom Myosinkopf abgelöst (4) und der Zyklus kann durch die erneute Bindung eines ATP-Moleküls von vorn beginnen.

In einer zyklischen Ruderbewegung greifen Myosinquerbrücken an den Aktinfilamenten an, knicken um, lassen los und greifen erneut an („Greif-Loslaß-Zyklus“). Der wiederholte Umknickvorgang zieht die Aktinfilamente in die Myosinzwischenräume und verkürzt auf diese Weise die kontraktile Elemente. Ein Sarkomer kann sich dadurch ungefähr um die Hälfte verkürzen. Erst das Zurücksinken des Ca^{2+} -Spiegels auf die Ausgangskonzentration durch aktives Zurückpumpen in die Speicher und die Bindung eines neuen ATP-Moleküls im aktiven Zentrum des Myosinkopfes bewirken die Wiederherstellung des Ausgangszustandes der kontraktile Filamente.

1.2. Das Myosinmolekül

Myosin ist in Muskel- und Nichtmuskelzellen sowie in Zellen höherer Pflanzen und eukaryotischer Mikroorganismen enthalten. Da es – in Gegenwart von Aktin – durch ATP-Hydrolyse in der Lage ist, chemische in mechanische Energie umzuwandeln, wird es als Motorprotein bezeichnet (3). Mit Hilfe der Genomanalyse wurden mittlerweile 13 Mitglieder der Myosin-Genfamilie identifiziert (4). Typ I Myosin und Typ II Myosin, die verbreitetsten und am besten untersuchten Formen, kommen in nahezu allen eukaryotischen Zellen vor. Eine weniger verbreitete Isoform, Typ V Myosin, wurde ebenfalls charakterisiert. Typ II Myosin steuert die Muskelkontraktion und Zytokinese, wohingegen Typ I und Typ V Myosin an Zytoskelett-Membran-Interaktionen wie dem Transport von Membranvesikeln beteiligt sind. Über die Funktion der restlichen Myosinformen gibt es bisher noch keine Daten.

Jedes Myosinmolekül besteht aus ein oder zwei schweren Ketten und mehreren leichten Ketten. Die schweren Ketten sind dabei in drei strukturell und funktionell verschiedene Domänen unterteilt. Sie bestehen aus einer N-terminalen globulären Kopfdomäne, welche ATPase-Aktivität besitzt und eine Bindungsstelle für Aktin aufweist. Darauf folgt die α -helikale Scharnierregion, an welche die leichten Ketten binden und damit eine stabilisierende Wirkung auf diese Region ausüben. Die C-terminale Schwanzdomäne ist für die spezifische Rolle des Myosintyps in einer Zelle wie Dimerisierung, Filamentbildung oder Membranbindung zuständig (Abb. 1-5).

Typ II und Typ V Myosin sind Dimere, in denen Sequenzen der Schwanzregion der schweren Ketten eine superspiralisierte, bis zu 130 nm lange Helix bilden. Typ I Myosin ist ein Monomer, dem das superspiralisierte Segment fehlt. Die nicht gewundenen Enden von Typ I und Typ V Myosin sind in der Lage, Zellmembranen bzw. Membranen von intrazellulären

Organellen zu binden und besitzen somit Membran-assoziierte Funktionen. Im Kontrast dazu legen sich die superspiralisierten, stabförmigen Schwänze des Typ II Myosins der Länge nach so zusammen, daß ein Aggregat entsteht, welches als dickes Filament bezeichnet wird. Dieses hat eine bipolare Organisation, d. h. die Köpfe sind an den beiden Enden lokalisiert, separiert durch eine zentrale Zone aus antiparallel angeordneten, sich überlappenden Myosinschwänzen. Durch die Fähigkeit zur Filamentbildung wird Typ II Myosin auch als konventionelles Myosin bezeichnet (5).

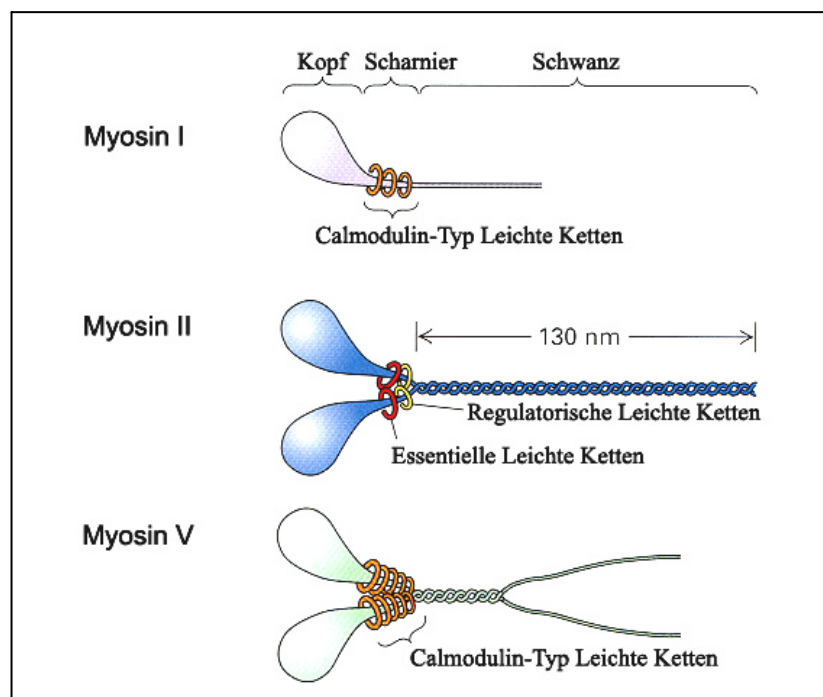


Abb. 1-5 Schematische Darstellung der Strukturen verschiedener Myosinmoleküle (modifiziert nach Lodish H et al., 2000)

Die drei Hauptvertreter der Myosinfamilie: Myosin I und V, welche vor allem am Zytoskelett wirken, und Myosin II, verantwortlich für die Muskelkontraktion in glatten und quergestreiften Muskelzellen.

Die drei Myosintypen unterscheiden sich aber vor allem in der Anzahl und im Typ ihrer leichten Ketten. Die leichten Ketten regulieren durch ihre Fähigkeit der Ca^{2+} -Bindung die Aktivität der Kopfdomäne der schweren Kette (6). Als leichte Kette des Typ I und Typ V Myosin fungiert Calmodulin, die Ca^{2+} -bindende regulatorische Untereinheit vieler intrazellulärer Enzyme. Typ II Myosin dagegen besteht aus zwei unterschiedlichen Paaren leichter Myosinketten, den *Essentiellen* Leichten Ketten und den *Regulatorischen* Leichten Ketten (s. Abb. 1-5). Beide Typen gehören der Superfamilie der EF-Hand Ca^{2+} -bindenden Proteine an (7), unterscheiden sich jedoch in ihrer Art der Ca^{2+} -Bindung von Calmodulin.

1.3. Expression und Funktion der leichten Myosinketten im humanen Herz

1.3.1. Expression der leichten Myosinketten

In den Herzmuskelzellen ist das Myosinprotein vom Typ II vertreten (3). Folglich binden an die Scharnierdomäne der schweren Ketten paarweise zwei Typen von leichten Myosinketten (MLC, von engl. *myosin light chain*), die essentielle und die regulatorische leichte Kette. Die schweren Ketten, welche die Gleitgeschwindigkeit der Filamente bestimmen, kommen im langsam kontrahierenden Ventrikel als β -MHC (von engl. *myosin heavy chain*) und im schnell kontrahierenden Atrium als α -MHC vor (8). Die essentielle leichte Kette wird auch als MLC-1 oder alkalische leichte Myosinkette bezeichnet, während die regulatorische Kette als MLC-2 oder phosphorylierbare leichte Myosinkette angegeben wird (9). Zwei verschiedene Gene kodieren im menschlichen Herzen für die beiden Isoformen der essentiellen leichten Myosinkette, die Ventrikel-spezifische (MLC1V) und die Atrium-spezifische (MLC1A) Isoform. MLC1V (s. Abb. 1-7) liegt auf Chromosom 3p21 (10) und kodiert für ein 194 Aminosäuren großes Protein, welches die gleiche Isoform wie die skelettale leichte Myosinkette (MLC1s) im Skelettmuskel des Menschen darstellt. Die MLC1A ist auf Chromosom 17q21 lokalisiert (11) und kodiert für ein 196 Aminosäuren großes Protein. Auch für die MLC-2 gibt es im Herzen zwei verschiedene Isoformen, wiederum eine Ventrikel-spezifische (MLC2V) und eine Atrium-spezifische (MLC2A) Isoform. Die MLC2V liegt auf Chromosom 12q23-q24.3 (12) und kodiert für ein 165 Aminosäuren großes Protein, während das MLC2A-Protein (auf Chromosom 3) aus 175 Aminosäuren besteht (13). Die MLC2V ist zudem in zwei Isoformen verfügbar, welche sich jedoch nicht im Molekulargewicht, sondern in ihrem isoelektrischen Punkt unterscheiden (MLC2V-a für die saurere Isoform und MLC2V-b für die basischere Isoform) (14). Dieser Unterschied resultiert aus der Substitution einer Aminosäure an Position 84 (s. Abb. 1-6). Da die leichten Ketten nur paarweise am Myosinmolekül binden, sind aufgrund der zwei Isoformen der MLC2V drei Myosinisomere möglich: ein MLC2V-a-Homodimer, ein MLC2V-a/MLC2V-b-Heterodimer und ein MLC2V-b-Homodimer. Im gesunden Herzen wird die Expression der MLC2V-b-Isoform in einem Verhältnis von 2,3:1 zur MLC2V-a-Isoform bevorzugt (15). Dabei bleibt die physiologische Funktion der verschiedenen ventrikulären MLC2-Isoformen bisher noch unklar und es ist nicht geklärt, ob die Lokalisierung auf Chromosom 12q23-q24.3 für beide Formen gilt. Die Promotorregionen für die MLC1V und die MLC2V wurden bisher nicht charakterisiert.

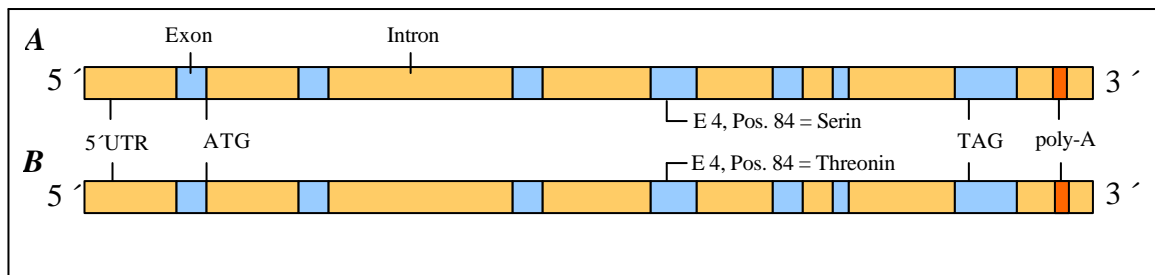


Abb. 1-6 Schematische Darstellung der Gene für die MLC2V-a und MLC2V-b

Das Gen für die MLC2V (NCBI Acc-Nr. Z15030) hat eine Länge von 11.997 bp und kodiert für sieben Exons (blau). Die beiden Isoformen der MLC2V unterscheiden sich durch ein Nukleotid in Position 280 in der mRNA-Sequenz bzw. in Position 84 der Aminosäuresequenz: U bzw. Serin für die MLC2V-a-Isoform (Bild A) und A bzw. Threonin für die MLC2V-b-Isoform (Bild B).

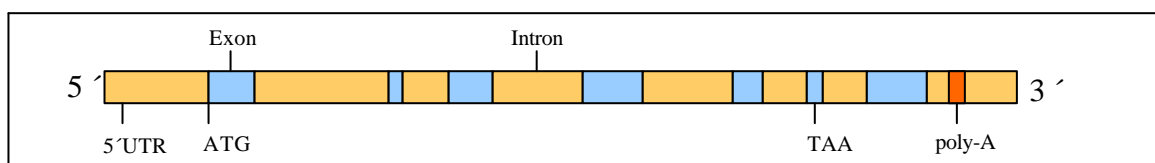


Abb. 1-7 Schematische Darstellung des Gens für die MLC1V

Das Gen für die MLC1V (NCBI Acc-Nr. NT_0005825) hat eine Länge von 8.565 bp und kodiert für sieben Exons.

1.3.2. Funktion der leichten Myosinketten

Die Funktion der leichten Myosinketten in der Herzmuskulatur ist bisher nicht vollständig verstanden. Bekannt ist, daß die MLC1 neben der schweren Myosinkette mit ihrem N-Terminus an den C-Terminus von Aktin bindet und somit eine Verbindung zwischen beiden Molekülen ausbildet (16). Dabei hat die atriale MLC1 eine geringere Affinität zu Aktin als die ventrikuläre MLC1, was auf die unterschiedliche N-terminale Aminosäuresequenz der Proteine zurückgeführt wird. Morano et al. demonstrierten, daß im Ventrikel ein molekularer Mechanismus existiert, welcher es den Kardiomyozyten erlaubt – durch die teilweise Substitution der MLC1V durch die MLC1A – sich einer verstärkten Belastung anzupassen (17). Somit wird eine erhöhte MLC1A-Expression im Ventrikel als Adaption betrachtet, um erhöhte Anforderungen bzw. eine beeinträchtigte Sarkomerfunktion zu kompensieren. Es wird vermutet, daß die schwächere Bindung der MLC1A an Aktin eine Leistungssteigerung des Sarkomers zur Folge hat (18). Die Rolle der MLC2 im humanen Herzen zeigt sich ähnlich kompliziert. Die experimentelle Extraktion der MLC2 von der Muskelfaser löst die hochgeordnete Myosinfilamentstruktur auf und die Ca^{2+} -Sensitivität der Zelle wird aufgehoben (19). Da das Sarkomer damit auch bei minimaler Ca^{2+} -Anwesenheit seine normale Leistung zeigt, wird vermutet, daß die MLC2 die Ca^{2+} -Abhängigkeit des kontraktiven

Apparates selektiv herabsetzt. Die MLC2, die zur Familie der Ca^{2+} -bindenden Proteine gehört, besitzt im Gegensatz zur kardialen MLC1 die Fähigkeit zur Bindung eines Ca^{2+} -Ions in ihrer N-terminalen Domäne (s. Abb. 1-8). Diese Bindungsstelle scheint für die Funktion des Sarkomers wichtig zu sein, da durch eine gerichtete Mutagenese in dieser Region gezeigt werden konnte, daß sich mit dem Verlust der Ca^{2+} -Bindungsfähigkeit die Muskelleistung stark reduzierte (20). Eine Substitution der ventrikulären MLC2 durch die skelettale Isoform in transgenen Mäusen führte zu einer verringerten Kontraktilität (21). Ein anderer Versuch, in welchem die MLC2A im Atrium von Mäusen durch die MLC2V substituiert wurde, führte zu einer Veränderung des atrialen Phänotyps hin zum ventrikulären Phänotyp (22).

1.3.3. Phosphorylierung der regulatorischen leichten Myosinkette

Ein interessanter Aspekt der MLC2V ist ihre Phosphorylierbarkeit. Gesteuert durch β -adrenerge Stimulation und eine ansteigende Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle, wird die MLC2V durch die kardiale MLC-Kinase mono- oder diphosphoryliert (Ser14, Ser18) und die MLC2A diphosphoryliert (Ser21, Ser22) (23; 24). Das Verhältnis von phosphorylierter MLC2 zur nicht phosphorylierten MLC2 im humanen Herzen ist nicht gleich. Im Atrium beträgt der Anteil an (mono- und di-) phosphorylierter MLC2A ca. 55 %, während der Anteil der phosphorylierten Isoformen der MLC2V im Ventrikel bei 39 % (MLC2V-b) bzw. 26 % (MLC2V-a) liegt (25). Diese Verhältnisse sind im gesunden Herzen aufeinander abgestimmt und ändern sich, auch zwischen Diastole und Systole, nicht (26). Die kardiale MLC-Kinase wird ebenfalls gewebespezifisch exprimiert und unterscheidet sich von der MLC-Kinase des Skelettmuskels (23). Es wird deshalb angenommen, daß die skelettale MLC2, im Gegensatz zur MLC2V, als Substrat für die kardiale MLC-Kinase ungeeignet ist. Untersuchungen zur funktionellen Rolle der Phosphorylierung der MLC2V ergaben, daß sie die ATPase-Aktivität des Myosinkopfes moduliert und eine regulierte Phosphorylierung für eine normale Herzfunktion wesentlich ist (24; 27; 28). Eine vermehrte Phosphorylierung erhöht die Bindungsrate zwischen Aktin- und Myosinmolekül und damit auch die Ca^{2+} -Sensitivität.

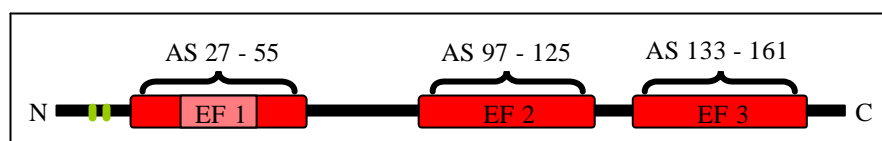


Abb. 1-8 Domänenstruktur der ventrikulären leichten Myosinkette Typ 2

EF 1 bis EF 3 sind EF-Hand Bindungsdomänen, wobei nur EF 1 (AS 36 – 48, rosa) zur Bindung eines einzelnen Ca^{2+} -Ions fähig ist. Die Phosphorylierung findet am Serin14 und Serin 18 statt (grün).

1.4. Herzinsuffizienz und Kardiomyopathien

Das Syndrom der Herzinsuffizienz stellt den häufigsten pathophysiologischen Endzustand kardiovaskulärer Erkrankungen dar. Dazu zählen Herzmuskelerkrankungen (Kardiomyopathien), Muskelentzündung (Myokarditis), die koronare Herzkrankheit (KHK), Bluthochdruck (Hypertonie), Diabetes mellitus sowie Klappen-bedingte und angeborene Herzerkrankungen. Unter physiologischen Gesichtspunkten wird Herzinsuffizienz als Unfähigkeit des Herzens, Blut bzw. Sauerstoff in einem Maße zu transportieren, welches den Bedürfnissen des Organismus gerecht wird, definiert (WHO, 1995). Die Ursachen der Herzinsuffizienz sind dementsprechend vor allem kardialer Natur, wobei die koronare Herzkrankheit (oder auch ischämische Kardiomyopathie) die häufigste Ursache ist. Seltener sind andere Kardiomyopathieformen sowie entzündliche (Myokarditis) oder toxische Schädigungen. Unter den nicht kardialen Ursachen steht die arterielle Hypertonie (hypertensive Herzkrankheit) an erster Stelle, welche zudem ein Risikofaktor für eine KHK sein kann (s. Abb. 1-9). Die Herzinsuffizienz ist eine häufige Erkrankung, welche in den letzten Jahren, auch wegen der verlängerten Lebenserwartung, deutlich im Zunehmen begriffen ist. Die Prognose wird als schlecht eingestuft, da trotz Behandlung in fortgeschrittenen Stadien die Letalitätsrate 20 – 30 % pro Jahr beträgt (29).

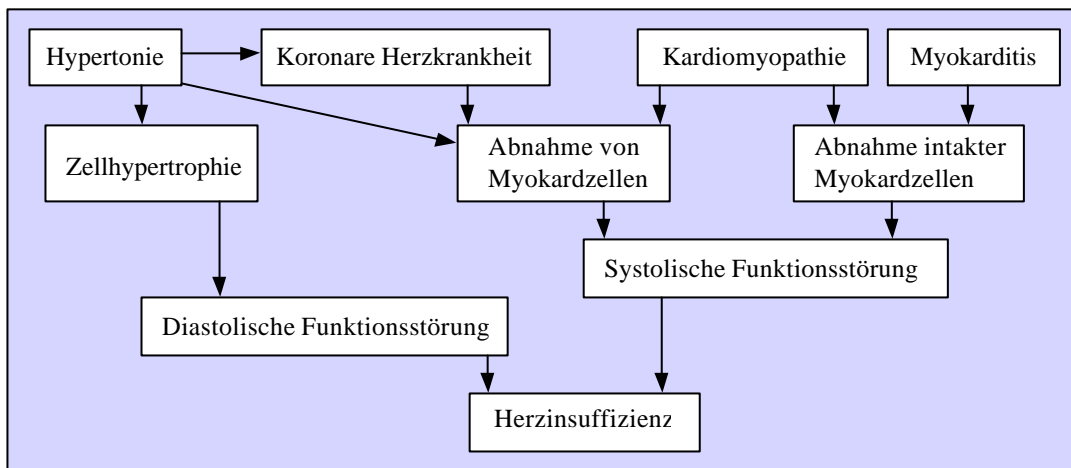


Abb. 1-9 Ursachen der Herzinsuffizienz (modifiziert nach E. Erdmann, 2003)

In etwa 25 bis 30 Prozent der Fälle liegt der Herzinsuffizienz eine Kardiomyopathie zugrunde (30). Als Kardiomyopathien werden alle Erkrankungen des Herzmuskels bezeichnet, die mit einer kardialen Funktionsstörung einhergehen. Folgende fünf Kardiomyopathieformen werden dabei unterschieden: die dilatative, die hypertrophische, die restriktive, die

arrhythmogene rechtsventrikuläre und die nicht klassifizierbaren Kardiomyopathien (s. Abb. 1-10). Diese Einteilung beruht auf der Pathophysiologie der einzelnen Kardiomyopathie-formen beziehungsweise, wenn möglich, auf deren ätiologischen und pathogenetischen Faktoren.

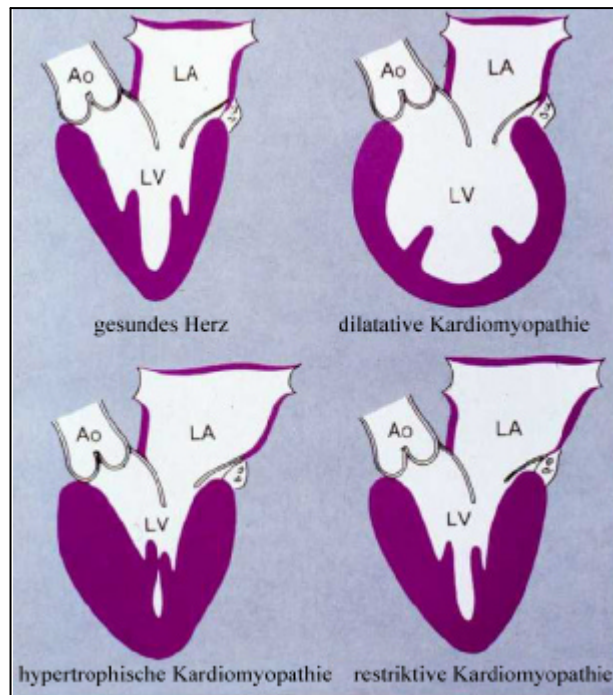


Abb. 1-10 Schematische Darstellung verschiedener Kardiomyopathien (Deutsches Herzzentrum Berlin)

LV = Linker Ventrikel; LA = Linkes Atrium, Ao = Aorta

1.5. Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist charakterisiert durch eine Erweiterung (Dilatation) und eingeschränkte Kontraktilität des linken oder beider Ventrikel (s. Vergleich in Abb. 1-10) (31). Sie stellt – gemessen an Erkrankungsalter, natürlichem Verlauf und stark eingeschränkten Therapiemöglichkeiten – eine der schwersten Herzerkrankungen dar. In ihrem Verlauf kommt es zu einem massiven Myozytenverlust, dessen Ursache kaum bekannt ist. Der Organismus versucht, den entstandenen Gewebeschaden zu reparieren und ersetzt die verlorenen Myozyten dabei durch Fibroblasten. Dies führt letztlich zur Fibrosierung des Myokards, einem weiteren wesentlichen Kennzeichen der DCM. Der Vorgang der Fibrosierung führt zu einer fortschreitenden Verminderung der Fähigkeit der Herzmuskelzellen, während des Herzschlages zu kontrahieren, und die Erweiterung des linken oder beider Ventrikel ohne gleichzeitige Dickenzunahme der Herzmuskulatur führt zu einer wachsenden Einschränkung der kardialen Pumpfunktion.

Das klinische Bild der DCM unterscheidet sich nicht wesentlich von dem jeder anderen sekundären Herzinsuffizienz. Leitsymptome sind eine belastungsabhängige Atemnot und körperliche Schwäche. Mit dem Fortschreiten der Erkrankung treten gehäuft Herzrhythmusstörungen auf, welche die Gefahr des plötzlichen Herztodes bergen. Im Endstadium ist die Herztransplantation die einzige Therapiemöglichkeit (31). Die DCM stellt damit eine der häufigsten zur Herztransplantation führenden Erkrankungen dar, und die Behandlung ist insgesamt mit erheblichen Kosten behaftet (32). Etwa zwanzig Prozent aller Patienten versterben innerhalb von fünf Jahren nach Diagnosestellung an der Erkrankung (33). Die DCM befällt bevorzugt Männer. Mit einer Inzidenz von 6 pro 100.000 Einwohner und einer Erkrankungsrate von 36 pro 100.000 Einwohner (weltweit) wird sie als eine häufige Herzmuskelerkrankung eingestuft (34; 35).

Bei etwa der Hälfte aller Fälle von dilatativer Kardiomyopathie kann heute eine spezifische ätiologische Ursache nachgewiesen werden. Dabei werden familiär-genetische, virale, autoimmune, toxische und Formen, die mit anderen kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert sind, unterschieden. Sind Ätiologie und Pathogenese einer DCM unklar, das heißt es kann keine Ursache identifiziert werden, so wird die Erkrankung als idiopathische dilatative Kardiomyopathie (IDCM) eingestuft.

1.5.1. Familiär-genetische Formen

Die Weitergabe von fehlerhaften Genen durch Vererbung stellt einen wichtigen Faktor in der Entstehung von Krankheiten dar. Ursachen für den Funktionsausfall betroffener Gene können dabei der Verlust von Chromosomen oder Teilen von Chromosomen sein, andererseits kann die Prozessierung der mRNA durch Mutationen, illegitime Rekombination oder Deletionen im entsprechenden Locus gestört oder die Expression des Gens durch Veränderungen in der Promotorregion gehemmt sein (36). Am häufigsten wird die genetische Information durch den Austausch (Substitution) eines einzelnen Nukleotids gegen ein anderes gestört. Diesen *Punktmutationen* wird in den letzten Jahren eine größere Bedeutung als Ursache der fehlerhaften Expression eines Proteins und damit der (Mit)Entstehung von Krankheiten zugemessen. Es gibt eine Reihe von Basenveränderungen, die Fehler in der Genexpression zur Folge haben. Neben *missense* und *nonsense* Mutationen kann es durch die Deletion oder Addition einzelner Nukleotide zu Leserasterverschiebungen (*frame shifts*) kommen. Daneben haben *stille* Mutationen keine Auswirkung auf die Translation, können aber durch Veränderungen der DNA/RNA-Sekundärstruktur die Transkription, die Weiterverarbeitung oder die Translation ungünstig beeinflussen.

In vielen Populationsstudien werden die Verteilung von Allelen und das Vorhandensein von Mutationen in Form von Polymorphismen einzelner Nukleotide (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) untersucht. Eine Population definiert sich dabei als eine örtlich begrenzte Gruppe von Individuen einer Art, ein Polymorphismus bezeichnet das Auftreten genetischer Unterschiede in einer Population (37). Ein verändertes Allel wird dann als polymorph bezeichnet, wenn es mit einer Häufigkeit von mehr als einem Prozent in einer Population auftritt (38). Jedes Gen ist in einem Individuum durch zwei Allele vertreten, welche identisch oder verschieden sein können. Sind beide Allele identisch, werden sie als homozygot bezeichnet, sind sie verschieden, als heterozygot. Liegt eine Heterozygotie vor, wird die phänotypische Ausprägung eines Merkmals dadurch bestimmt, ob ein Allel *dominant* oder *rezessiv* geprägt ist. Wird ein Allel autosomal-dominant vererbt, zeigt sich der erworbene Genotyp auch phänotypisch, rezessiv vererbte Allele dagegen sind phänotypisch nicht ausgeprägt – die Merkmale werden jedoch genotypisch weitergegeben und können in späteren Generationen (im Falle einer Homozygotie) auch phänotypisch auftreten. Eine Ausnahme bildet der X-chromosomal rezessive Erbgang, bei welchem das entsprechende zweite Allel auf dem Y-Chromosom fehlt und eine rezessive Mutation von der Mutter an alle männlichen Nachkommen (phänotypisch ausgeprägt) weitergegeben wird (39).

Der Anteil genetischer (familiärer) Formen an der Gesamtheit der dilatativen Kardiomyopathien wird auf 20 – 30 % geschätzt (40; 41; 42; 43). Meist liegt ein autosomal-dominanter Erbgang vor (43). In seltenen Fällen findet sich ein X-chromosomal rezessiver Erbgang, der durch Mutationen im Dystrophingen bedingt ist, wobei der Skelettmuskel nicht oder nur gering beteiligt ist (44; 45; 46). Die systematische Suche nach Mutationen im Bereich des Dystrophins bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie brachte nur geringe Ergebnisse, so daß Veränderungen im Dystrophin eher eine seltene Ursache einer dilatativen Kardiomyopathie ohne Skelettmuskelbeteiligung sind (47). Das Dystrophinprotein ist in den Muskelzellen für die Verankerung des Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix verantwortlich. Der Sarkoglykankomplex und Laminin stellen dabei die entsprechenden Verbindungen zwischen der Zellmembran und der extrazellulären Matrix her (48). Auch die Gensequenzen dieser Proteine wurden näher untersucht und so konnten eine Deletion im Bereich des δ -Sarkoglykangens als Grundlage der Kardiomyopathie des Syrischen Hamsters sowie Mutationen des humanen δ -Sarkoglykangens (Ser151Ala, Δ Lys238) als Ursache einer dilatativen Kardiomyopathie beim Menschen identifiziert werden (49). Es wurde außerdem über Punktmutationen des Lamin A/C-Gens berichtet, welche als Ursache von dilatativer Kardiomyopathie assoziiert mit Störungen des Reizleitungssystem gelten (50). Diese

Mutationen fanden sich in der „Stab“-Domäne des Lamin A/C-Gens, im Gegensatz zum Emery-Dreifuss-Syndrom, einer Muskeldystrophie mit kardialer Beteiligung, bei dem Mutationen des gleichen Gens in der Kopf- oder Schwanzregion der Proteine zu finden sind. Die Lamine A und C sind Komponenten der Zellkernhülle im Bereich der inneren Kernmembran, über deren Funktion es jedoch bislang keine gesicherten Daten gibt. Wie autosomal dominant vererbte Mutationen in den Laminen eine dilatative Kardiomyopathie auslösen, ist deshalb nicht bekannt (50). Eine missense Mutation (Ile451Met) des Desmings wurde ebenfalls als genetische Ursache für eine familiäre Form der dilatativen Kardiomyopathie identifiziert (51). Desmin gehört zu den extrasarkomerischen Filamenten, die eine Verbindung von benachbarten Myofibrillen zur Kernhülle herstellen (48). Daneben wurde eine gestörte Metavinculin-Expression mit dem Phänotyp einer dilatativen Kardiomyopathie assoziiert, welche auf einen Defekt des alternativen mRNA-Spleißens zurückgeführt wird (52). Metavinculin ist die kardiale Isoform von Vinculin und ist ebenfalls an der Verankerung des kontraktilen Apparates an der Zellmembran beteiligt. Die familiären/erblichen Formen stellen sich damit zunehmend als Erkrankungen der myozytären Kraftübertragung dar, während Veränderungen des Sarkomers bisher vorwiegend für hypertrophische Kardiomyopathien als verantwortlich gelten (48). Auch Mutationen des Aktgens in der Domäne, die für die Verankerung des Sarkomers in den Z-Scheiben verantwortlich ist, können eine vererbte Form einer dilatativen Kardiomyopathie auslösen, was die Spekulation einer gestörten Kraftübertragung weiter stützt (53) (s. Abb. 1-11).

Neben den aufgeführten Veränderungen von Proteinen des kardialen Zytoskeletts konnten aber auch Mutationen in kontraktilen Proteinen als genetische Basis für eine dilatative Kardiomyopathie identifiziert werden. Kamisago et al. fanden im Gen für die ventrikuläre schwere Myosinkette (β -MHC) sowie im Gen für kardiales Troponin T verschiedene Mutationen als Auslöser einer DCM (54). Zusätzlich wurden durch klinisch-genetische Untersuchungen, gefolgt von Kopplungsanalysen, eine Reihe weiterer genomischer Loci für erbliche Formen einer dilatativen Kardiomyopathie identifiziert. Dabei handelt es sich im einzelnen um folgende Loci: 1q11-21; 1q32; 2q11-22; 2q31; 3p22-25; 6q23; 9q13-22 und 10q21-23 (41). Ebenso wurde gezeigt, daß Mutationen im Bereich der Gene der β -Oxidation der Fettsäuren angeborene Kardiomyopathien auslösen können (55; 56), und auch Veränderungen der mitochondrialen DNA sind als Ursache für familiäre dilatative Kardiomyopathien in Betracht gezogen worden (57; 58).

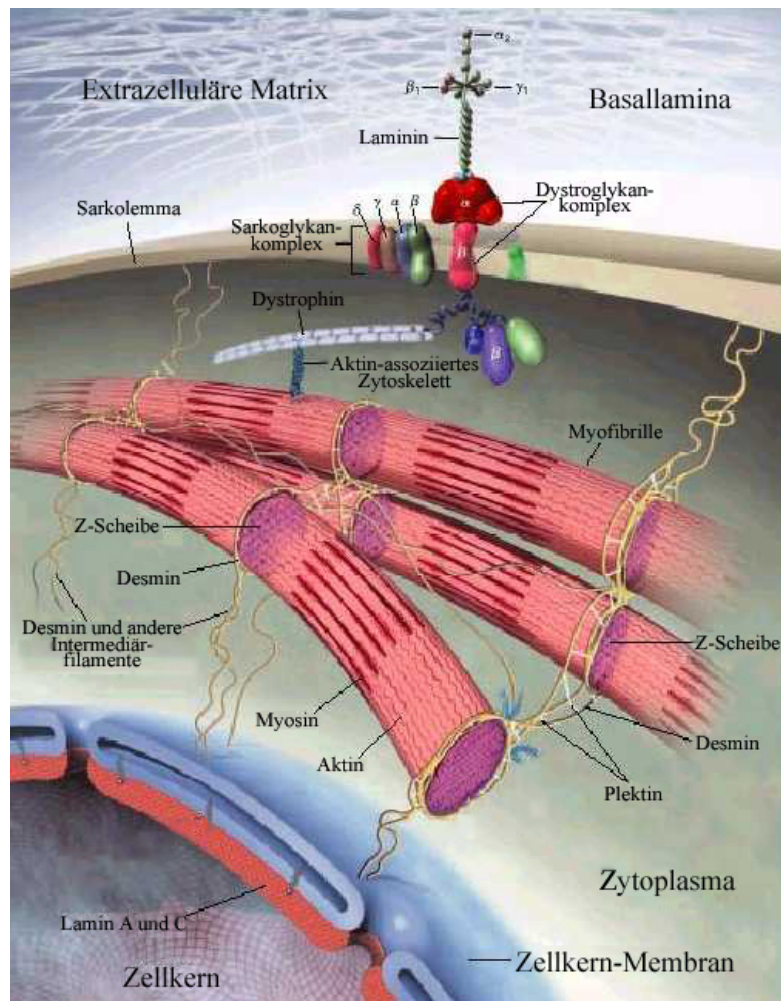


Abb. 1-11 Schematische Darstellung einer Herzmuskelzelle (modifiziert nach Fatkin et al., 1999)

Die Darstellung gibt eine Übersicht über die Lage von Proteinen, welche bisher für eine genetische DCM als verantwortlich identifiziert bzw. in Betracht gezogen werden.

1.5.2. Virale Formen

Neben der genetischen Ätiologie nehmen die Arbeiten zur infektiösen Ursache der dilatativen Kardiomyopathie, mit besonderem Augenmerk auf die Gruppe der Enteroviren und unter diesen auf die Gruppe der Coxsackieviren, einen breiten Raum ein. Die Übertragung von Enteroviren erfolgt auf fäkal-oralem Wege, aber auch durch Tröpfcheninfektion (59). Als Eintrittspforte dient der Nasen- und Rachenraum, wo die erste lokale Vermehrung (Replikation) stattfindet. Danach kommt es zur Generalisierung und sekundären Ansiedlung und Vermehrung in den Zielorganen, zu welchen auch Herz- und Skelettmuskulatur gehören können. Enteroviren gehören zur Gruppe der Viren mit einzelsträngigem RNA-Genom in Positivstrangordnung (+ssRNA). Der +RNA-Strang kann in der Wirtszelle sofort als mRNA fungieren und abgelesen werden. Nach Synthese der Virusproteine ist es den Viren möglich,

sich zu replizieren, indem sie durch Umschreibung des +RNA-Stranges in –RNA-Stränge diese wiederum als Matrizen für neue +RNA-Stränge nutzen. Der Nachweis des enteroviralen RNA „minus“-Stranges im Gewebe wird als Zeichen einer aktiven Virusreplikation gewertet, während der Nachweis von enteroviralem „plus“-Strang lediglich ein Zeichen für eine Persistenz von Enteroviren ist.

Enteroviren stellen das häufigste infektiöse Agens einer Myokarditis beim Menschen dar (60; 61; 62). Auch im Myokard von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie läßt sich Enterovirus-RNA, im besonderen Coxsackievirus Typ B, in etwa 20 % der Fälle nachweisen, was einen Zusammenhang von Virusinfektionen und Ausbildung einer linksventrikulären Dysfunktion vermuten läßt (63; 64; 65). Wessely et al. konnten unter Verwendung eines mutierten Coxsackievirus B3 (Mutation des VP0-Proteins) *in vitro* zeigen, daß schon eine niedrige Replikationsrate des Enterovirusgenoms (ohne Vermehrung des infektiösen Gesamtpartikels) einen pathologischen Effekt auf Kardiomyozyten auslösen kann (66). Hinzu kommt, daß der Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR), welcher im humanen Herzen exprimiert wird, im Herzen von Patienten mit DCM gegenüber dem gesunden Herzen als stark erhöht beschrieben wurde (67). Der Mechanismus, mit welchem eine Enterovirusinfektion eine dilatative Kardiomyopathie verursachen kann, ist bisher nicht klar, kürzlich konnte jedoch *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden, daß die Coxsackievirus-Protease 2A in der Lage ist, Dystrophin zu spalten, was die Zerstörung des Zytoskeletts infizierter Kardiomyozyten nach sich zieht (68). Über den klinischen Verlauf von Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion (DCM) bei nachgewiesenem Enterovirusgenom im Myokard liegen widersprüchliche Daten vor. Figulla und Mitarbeiter konnten anhand einer zweijährigen Studie mit 77 Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (davon 20 Patienten Enterovirus-positiv) zeigen, daß die Letalität in der Gruppe von Patienten mit positivem Enterovirusnachweis geringer ist als in der Gruppe, bei der kein Enterovirusgenom im Myokard nachgewiesen werden konnte (63). Dieser Befund wurde durch weiterführende Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe bestätigt (69). Im Gegensatz dazu fanden Why et al., daß der Nachweis von Enterovirusgenom im Myokard von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie mit einer signifikant höheren Letalität (25 % vs. 4 %) assoziiert ist (70). Insgesamt läßt sich trotz teilweise widersprüchlicher Ergebnisse eine wesentliche pathogenetische Bedeutung der Enteroviren/ Coxsackieviren bei der erworbenen dilatativen Kardiomyopathie vermuten.

Neben den Enteroviren wird über die Rolle weiterer Viren, insbesondere aus der Gruppe der einzelsträngigen (Parvovirus B19) und doppelsträngigen (Adenoviren und Cytomegalievirus)

DNA-Viren bei der Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie spekuliert (71; 72; 73; 74). Immunhistologische Techniken, welche zur Diagnostik einer DCM herangezogen werden, haben zudem gezeigt, daß die Detektion von Virusgenom im Myokard mit dem Nachweis einer Immunezellinfiltration assoziiert sein kann (75; 76; 77).

1.5.3. Autoimmune Formen

Autoimmunerkrankungen haben ihre Ursache in der Fehlsteuerung der Immunabwehr. Diese unterscheidet nicht mehr zwischen „selbst“ und „fremd“ und zerstört körpereigene Strukturen. Dabei können sich systemische oder organspezifische Autoimmunkrankheiten herausbilden. Prinzipiell kann jedes Organsystem betroffen sein. Was genau eine Autoimmunantwort auslöst, ist nicht bekannt, sowohl Umweltfaktoren als auch genetische Faktoren, speziell der MHC-Genotyp, sind aber möglicherweise von Bedeutung (78). Daneben können Fehler der Selbst-Fremd-Erkennung des Immunsystems aber auch durch Pathogene hervorgerufen werden, indem Antikörper gegen ein infektiöses Agens mit körpereigenen Strukturen kreuzreagieren. Zytotoxische T-Zellen und die Aktivierung von Makrophagen können dabei einen erheblichen Gewebeschaden verursachen, während T-Helferzellen die Bildung von unerwünschten Antikörpern gegen Selbstantigene auslösen.

Auch in der Diagnostik der DCM werden bei einem fehlendem Nachweis eines entzündlichen Agens aber entzündlicher Infiltration des Myokards Autoimmunmechanismen vermutet. In einer Studie über das Vorhandensein von Antikörpern gegen Streßproteine wurden im Serum von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie Antikörper gegen die Hitzeschockproteine 60 (HSP-60) und HSP-70 sowie gegen HSC-70 (Hitzeschock-verwandtes Protein) gemessen (79). Die Funktionen von Streßproteinen sind u. a. Proteintransport, Proteinreifung und Schutz der Zelle vor Streßsituationen. Autoantikörper gegen spezielle kardiale Proteine wurden bei der dilatativen Kardiomyopathie ebenfalls nachgewiesen. So identifizierten Latif et al. Antikörper gegen mehrere myokardiale Proteine (Leichte Myosinkette Typ 1, Tropomyosin, Aktin, HSP-60, Schwere Myosinkette) im Vergleich zu Seren von Patienten mit ischämischer Herzerkrankung (80). Sowohl die Atrium-spezifische Isoform der Schwere Myosinkette (α -MHC) als auch die Ventrikel-spezifische Isoform (β -MHC) wurden im Serum von DCM-Patienten als Autoantigene identifiziert (81). Weitere Studien belegen das Auftreten von Antikörpern im Serum von DCM-Patienten gegen Membranproteine wie den α -adrenergen (82) und den β -adrenergen Rezeptor (83; 84) sowie gegen den muscarinen Acetylcholinrezeptor (82).

1.5.4. Idiopathische Formen

Formen einer dilatativen Kardiomyopathie, welche ätiologisch/pathologisch (noch) nicht zugeordnet werden können, werden als idiopathisch (IDCM) bezeichnet. Es gibt jedoch eine Reihe pathogenetischer Prozesse, welche sich ganz allgemein aus der Herzinsuffizienzforschung ergeben und neue Anregungen und Konzepte für den Prototyp der systolischen Herzinsuffizienz – die DCM – bieten. In diesem Sinne wurde das neurohumorale Konzept entwickelt, welches sich mit der Auswirkung neurohumoraler Mediatoren (Neurohormone) auf das Fortschreiten der linksventrikulären Dysfunktion des beeinträchtigten Herzens beschäftigt. Neurohormone sind Substanzen, welche von spezialisierten Nervenzellen produziert werden (85). Sie werden über Nervenbahnen transportiert und aus diesen ins Blut freigesetzt. Zu den Mediatoren, welche im Rahmen der Herzinsuffizienz untersucht wurden, gehören unter anderem Noradrenalin (86), Angiotensin II (87), Endothelin (88) und Aldosteron (89). Die Hinweise, daß diese Substanzen eine Rolle in der Pathogenese der Herzinsuffizienz spielen, kommen aus zwei Richtungen. Einerseits existieren experimentelle Modelle, in denen gezeigt werden konnte, daß diese Mediatoren in pathophysiologisch relevanten Konzentrationen zumindest Teile des Syndroms Herzinsuffizienz bewirken (90). Andererseits belegen klinische Studien, daß Medikamente, welche die neurohumorale Regulation im Rahmen der Herzinsuffizienz beeinflussen, zu einer Prognoseverbesserung führen können (91; 92).

Neben diesen Neurohormonen konnten auch erhöhte Serumkonzentrationen von Zytokinen im Rahmen der Herzinsuffizienz gemessen werden (93). Zytokine sind Botenstoffe des Immunsystems, die entzündliche Reaktionen regulieren. Sie können als Wachstumsfaktoren wirken, Zellen aktivieren oder deaktivieren und dienen als Schutz vor Gewebeschädigungen. Neben TNF- α (94) sind vor allem die Interleukine 1- β (IL-1 β), IL-2, IL-6 und Interferon- γ in erhöhten Spiegeln bei Patienten mit Herzinsuffizienz erfaßt worden (95; 96). Obwohl diesen Zytokinen bei Herzinsuffizienz eine Rolle zugesprochen wird, existieren wenig Daten zur chemotaktischen Wirkung dieser Substanzen im Rahmen von Herzinsuffizienz und idiopathischer DCM. Im Myokard von Patienten mit IDCM finden sich unterschiedlich stark ausgeprägte lympho-/monozytäre Infiltrationen, was die Frage aufwirft, ob und wie diese zelluläre Infiltration reguliert wird und damit, ob chemotaktisch aktive Zytokine (Chemokine) eine Rolle in der Pathophysiologie spielen. So gibt es eine Reihe von Untersuchungen des erst kürzlich mit Herzinsuffizienz in Verbindung gebrachten Monozyten-chemoattrahierenden Proteins-1 (MCP1), welches die Chemotaxis und Aktivierung von Monozyten reguliert (97).

Die Transkription des MCP-1-Gens wurde in Endomyokardbiopsien von Patienten mit IDCM gezeigt (98) und die Schwere der Herzinsuffizienz im Hinblick auf quantitative Änderungen der mRNA untersucht (99). So konnte eine Korrelation zwischen erhöhter MCP-1-mRNA-Menge und erhöhter Infiltration des Myokards durch inflammatorische Zellen zum Grad der linksventrikulären Funktionseinschränkung bei IDCM nachgewiesen werden.

TNF- α ist ein proinflammatorisches Zytokin mit pleiotropen biologischen Effekten. Verschiedene *in vitro* Untersuchungen zeigten, daß die erhöhten Serumspiegel von TNF- α im Rahmen der Herzinsuffizienz die kardiale Kontraktilität negativ beeinflussen und viele der phänotypischen Veränderungen, wie die Erhöhung des G-Proteins G_{α} -Spiegels (100), eine Verzögerung des Kalziumeinstroms (95) und die Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase (101) verursachen können, welche im insuffizienten Herzen gefunden werden. In transgenen Mäusen mit gerichteter TNF- α -Überexpression wurde die Frage der pathogenetischen Wirkung bei der Entstehung der Herzinsuffizienz näher untersucht. In diesem Modell verursachte TNF- α einen Phänotyp der systolischen Herzinsuffizienz mit Infiltration von Entzündungszellen, welcher direkt mit dem Ausmaß der TNF- α -Expression korreliert war (102; 103). Eine gering ausgeprägte Infiltration des Myokards mit Entzündungszellen wird auch in einigen Fällen von Patienten mit IDCM gefunden. Bislang wurde jedoch nicht untersucht, ob die Zahl der Entzündungszellen bei der IDCM eine Assoziation zur TNF- α -Expression zeigt bzw. durch diese reguliert wird.

Neben diesen Ansätzen wird die Suche nach neuen Genen, denen eine Rolle im Krankheitsgeschehen zugesprochen werden kann, ständig fortgeführt. Dabei gibt es einerseits die „Target-Gen-Methode“, welche die Untersuchung von Genen in den Mittelpunkt stellt, von denen eine Assoziation zum pathophysiologischen Prozeß vermutet wird. Dieses Herangehen ist jedoch durch den vermuteten Zusammenhang zwischen einem bekannten (Ziel-, target-) Gen und der Herzinsuffizienz limitiert. Andererseits wurden molekularbiologische und proteanalytische Techniken entwickelt, mit denen differentiell exprimierte Gene bzw. Proteine erkannt werden können. Der Vergleich von „gesund“ und „krank“ ermöglicht eine weiterreichende Analyse von Unterschieden und damit vor allem auch die Erkennung von bislang noch nicht in Betracht gezogenen Genen/Proteinen. Mittels *Differential Display* mRNA-Analyse konnte eine Überexpression von extrazellulärer Kollagenase, welche die kardiovaskuläre Integrität negativ beeinflußt, nachgewiesen werden (104). Mit Hilfe der Suppressions-Subtraktions-Hybridisierung (SSH) ließen sich zudem weitere Gene (bAE3, mitochondriale ATPase 6 und Cytochrom C-Oxidase 3) identifizieren, deren Rolle in der Pathogenese der IDCM derzeit untersucht werden.

1.6. Zielstellung der Arbeit

Mit Hilfe der Subtraktiven Hybridisierung wurden in Vorarbeiten an der Klinik für Innere Medizin Jena, Kardiologie folgende Kandidatengene identifiziert:

- Homo sapiens mRNA für kardiales ventrikuläres Myosin, Leichte Kette Typ 2 (MLC2V)
- Homo sapiens mRNA für Skelettmuskel-Alpha-Aktin
- Homo sapiens mRNA für Acyl-CoA-Synthetase, lange Kette
- Homo sapiens mRNA für Protein KIAA0465

Da mit dem vorliegenden Projekt eine Fokussierung auf die pathogenetische Rolle relevanter differentiell exprimierter Gene im insuffizienten Herzen von Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie erfolgen sollte, wurde unter diesen Genen die ventrikuläre leichte Myosinkette Typ 2 (MLC2V) zur weiteren Charakterisierung ausgewählt. Die MLC2V ist in die Regulation und Modulation der myofibrillären Kontraktion involviert und wird in einer aufgestellten kardialen cDNA-Genbank bereits als Kandidat für die Beteiligung an kardialer Hypertrophie angeführt (105). Auch Mutationen im Bereich des MLC2V-Gens wurden bereits mit Erkrankungen des Herzens in Verbindung gebracht. So wurde gezeigt, daß Punktmutationen der MLC2V eine hypertrophische Kardiomyopathie beim Menschen auslösen können (106; 107).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Grad der Expression der ventrikulären leichten Myosinkette, Typ 2 an gesunden und kranken Myokardgewebeproben untersucht werden. Im einzelnen sollte zunächst der Befund der erhöhten Expression der MLC2V-mRNA im kranken Herzgewebe gegenüber dem gesunden bestätigt werden. Da damit bewiesen werden könnte, daß die Subtraktive Hybridisierung eine Methode zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene ist, mit welcher eine gute Auswahl an zu untersuchenden Genen erhalten werden kann, lag eine große Bedeutung in der Bestätigung der differentiellen mRNA-Expression der MLC2V. Zudem sollte die Frage geklärt werden, ob das MLC2V-Gen selektiv bei der IDCM überexprimiert wird, oder ob seine Überexpression einen generellen Mechanismus in Endstadien von Herzerkrankungen verschiedener Ursachen darstellt. Dafür wurden 14 IDCM-Proben, 9 KHK-Proben und 6 Kontrollproben mit gut dokumentierter Anamnese ausgewählt. Weitere Untersuchungen sollten, gestützt auf Hinweise aus der Literatur, zeigen, ob eine mögliche Ursache der veränderten Expression des MLC2V-Gens und damit eine mögliche Rolle des MLC2V-Proteins in der Pathogenese der IDCM gefunden werden kann. Da bisherige Studien Hinweise lieferten, daß Mutationen in kardialen Proteinen für genetisch bedingte Formen einer DCM verantwortlich sein können, sollte eine

systematische Suche nach Mutationen im Gen für die MLC2V durchgeführt werden. Die MLC2V steht in enger Wechselwirkung zur MLC1V und zur schweren Myosinkette. Da Mutationen der MLC-Bindungsdomänen an der schweren Myosinkette diese Interaktionen stören könnten, sollten auch die entsprechenden Abschnitte des Gens der β -MHC auf der Suche nach solchen Veränderungen sequenziert werden. Zeitgleich sollte eine Untersuchung des MLC1V-Gens hinsichtlich Mutationen erfolgen. Für diesen Teilbereich konnte auf eine gut ausgebaute Blut/DNA-Bank von Patienten mit und ohne Herzinsuffizienz (Klinik für Innere Medizin I, Jena) zurückgegriffen werden. Ein weiterer Teilaspekt dieser Arbeit war die Untersuchung der MLC2V auf Proteinebene. Dabei sollten sowohl quantitative und qualitative Veränderungen als auch das Proteinverteilungsmuster überprüft werden. Das Vorkommen von Autoimmunphänomenen bei der DCM sowie die verminderte Nachweisbarkeit des MLC2V-Proteins im Myokard von IDCM-Patienten führte zudem zu der Frage, ob der Abbau des MLC2V-Proteins durch Autoantikörper beschleunigt wird. Nach *in vitro* Expression des Proteins sollten dazu Seren von DCM-Patienten hinsichtlich des Vorliegens von Antikörpern gegen die MLC2V untersucht werden. Auch hierfür stand eine Serenbank (Klinik für Innere Medizin I, Jena) zur Verfügung. Ziel der Experimente war es insgesamt, einen Beitrag zu leisten, um einen Teilaspekt der Pathophysiologie der IDCM besser zu verstehen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

2D-Elektrophoreseanlage	IPGphor SE 660 Electrophoresis Unit	Amersham Amersham
Blot (Western)apparatur	Vacu Blot Trans-Blot Cell	Biometra Biorad
Elektrophoresekammern	Agagel Mini Agagel Midi DNA Seq Gel System DS 91 Mini Protean II (8 x 19 cm)	Biometra Biometra Biometra Biorad
ELISA-Reader	Lambda E	MWG-Biotech
Fluoreszenzimager	FLA 5000	Raytest
Gefriermikrotom	2800 Frigocut N	Leica
Geldokumentationsanlage	HEROLAB	Herolab GmbH
Hybridisierungssofen	ALT Systems	Biometra
Mikroskope	Fluoreszenzmikroskop Telaval 31	Zeiss Zeiss
Multiscreen-Apparatur	Mini-Protean II	Biorad
PCR-Geräte	Personal Cyclor UNO II Mastercycler gradient Light Cyclor	Biometra Biometra Eppendorf Roche
Photometer	Spectronic 1201 Biophotometer NanoDrop 2.5.4.	Milton Roy Eppendorf Kisker
Sequenzierer	ABI PRISM 310 Genetic Analyzer CEQ-2000	Applied Biosystems Beckman Coulter

2.1.2. Verbrauchsmaterialien / Kits

1 ml-Polypropylensäulen		Qiagen
15 ml-Röhrchen		Falcon
96-Lochplatten		Falcon
Filterpapier	Whatman 3MM	Schleicher & Schüll
Nitrozellulose	0,2 µm	Biorad
Nylonmembran	0,45 µm Poren	Boehringer Mannheim
Objektträger	Superfrost Plus	Fischer
PVDF-Membran	0,45 µm Poren	Amersham
Röntgenfilme	Kodak BioMax MR-1	Sigma
Zellkulturflaschen	25 cm ² ; 75 cm ²	Falcon

ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Advantage-HF PCR Kit	CLONTECH, Heidelberg, Deutschland
Alexa Fluor Protein Labeling Kit	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Alkaline Phosphatase Substrate Kit	BIO-RAD, München, Deutschland
AmpliCycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Bio-Rad Protein Assay	BIO-RAD, München, Deutschland
CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing Quick Start Kit	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Endo Free Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
GFX Micro Plasmid Prep	Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland
Immun-Blot Assay Kit	BIO-RAD, München, Deutschland
Light Cycler-FastStart DNA Master SYBR Green I Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Oligotex mRNA Midi Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Phototope-Star Detection Kit	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus, Deutschland
Plus One 2-D Clean-Up Kit	Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland
QIAamp Blood Mini Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Random Primed DNA Labeling Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Reverse Transcription System	Promega, Mannheim, Deutschland
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Vectastain Elite ABC-Kit	Serva, Heidelberg, Deutschland

2.1.3. Puffer / Lösungen

Tris-Puffer:

10 mM Tris-Cl (pH 8,5)

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl (pH 7,65)
0,1 M EDTA

PCR-Stopplösung:

95 % Formamid
20 mM EDTA
0,05 % Bromphenolblau
0,02 % Xylencyanol

10 X SSC:

1,5 M NaCl
0,15 M Na-Citrat
→ pH 7,0

MOPS-Puffer (20 X):

400 mM MOPS
100 mM Natriumacetat
20 mM EDTA
→ pH 7,0

RNA-Laufpuffer:

65 % Formamid (99,5 %)
22 % Formaldehyd (37 %)
13 % MOPS (5 X)

Hybridisierungslösung (Northern Blot):

50 % Formamid (99,5 %)
 1 % t-RNA (10 mg/ml)
 10 % SDS (10 %)
 25 % SSC (20X)
 2 % Denhardt-Reagenz (50 X)
 2 % 1 M Natriumpyrophosphat
 10 % Aqua dest.
 (inkl. Volumen $\alpha^{32}\text{P}$ -DNA)

(T)TBS:

20 mM Tris-HCl (pH 7,5)
 500 mM NaCl
 (0,05 % Tween)

Waschpuffer (Proteinexpression):

100 mM NaH_2PO_4
 10 mM Tris-Cl
 8 M Harnstoff
 20 mM Imidazol
 → pH 6,3

Waschpuffer (Proteinextraktion):

50 mM Tris-HCl (pH 7,1)
 100 mM KCl
 6 mM EDTA
 6 μM Benzamidin
 2 μM Leupeptin

2D-Lysispuffer (ohne Fluoreszenz):

9 M Harnstoff
 4 % CHAPS
 1 % DTT
 4 mM Pefabloc (Proteaseinhibitor)
 2 % v/v Pharmalyte 3-10 (0,8 % w/v)

2D-Rehydratisierungspuffer:

8 M Harnstoff
 0,5 % (v/v) IPG-Puffer (Amersham)
 2 % (w/v) CHAPS
 0,002 % Bromphenolblau
 0,3 % DTT
 200 mM TBP
 1,6 M 4-VP

TBE:

1,0 M Tris
 0,9 M Borsäure
 0,01 M EDTA

Lysispuffer (*E. coli*):

100 mM NaH_2PO_4
 10 mM Tris-Cl
 8 M Harnstoff
 1 mg/ml Lysozym
 → pH 8,0

Elutionspuffer (Proteinexpression):

100 mM NaH_2PO_4
 10 mM Tris-Cl
 8 M Harnstoff
 250 mM Imidazol
 → pH 6,3

Lysispuffer (Proteinextraktion aus Gewebe):

8 M Harnstoff
 25 mM Tris-HCl (pH 7,1)
 50 mM KCl
 3 mM EDTA
 3 mM Benzamidin
 50 mM PMSF
 5 μM Pepstatin A

2D-Lysispuffer (mit Fluoreszenz):

8 M Harnstoff
 4 % CHAPS
 25 mM Tris

2D-Equilibrierungspuffer (EP1/EP2):

6 M Harnstoff
 50 mM Tris
 30 % (v/v) Glycerin
 2 % (w/v) SDS
 0,01 % Bromphenolblau
 1 % DTT (für EP 1)
 2,5 % Jodazetamid (für EP 2)

Fixierer / Entfärber:
 10 % Methanol
 7 % Essigsäure

Coomassie-Färbelösung:
 50 % Methanol
 10 % Eisessig
 0,02 % Coomassie Brilliantblau
 G250

Protein-Probenpuffer (6 X):
 30 % β -Mercaptoethanol
 40 % Glycerin
 7 % SDS
 0,05 % Bromphenolblau

Protein-Transferpuffer (Blot-Puffer):
 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 0,2 M Glycin
 1 mM SDS
 20 % Methanol

2.1.4. Chemikalien

$\alpha^{32}\text{P}$ -dATP	9,25 MBq	Amersham Pharmacia
Acrylamidlösung (30:1)	Gel 30	Roth
Agarose	Agarose I	Amresco
DAB-Peroxidasesubstrat		Sigma
Ni-NTA-Agarose		Qiagen
Pefabloc SC		Roche

Alle nicht aufgeführten Standardchemikalien wurden von den Firmen Roth oder Sigma bezogen.

2.1.5. Enzyme / Proteine

Restriktionsenzyme	<i>TaqI</i>	New England Biolabs
	<i>EcoRI</i>	New England Biolabs
	<i>HindIII</i>	New England Biolabs
	<i>BamHI</i>	New England Biolabs
Ligase	T4 DNA-Ligase	Invitrogen
Polymerasen	DNA-Polymerase	Finnzymes
	HF Polymerase Mix	Clontech (BD Biosciences)
DNase	RQ1 RNase-freie DNase	Promega
MLC2V, human, rekomb.		Jena Bioscience

2.1.6. Kulturmedien / Komponenten

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium):
 10 g/l Trypton
 5 g/l Hefeextrakt
 10 g/l NaCl
 50 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin (für *E. coli* TOP 10)
 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin (für *E. coli* M15pRep4)
 25 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin (für *E. coli* M15pRep4)

LB-Agar:
 LB-Medium s.o. + 15 g/l Agar

VLE-RPMI 1640 Medium	Biochrom
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL
Trypsin/EDTA	Gibco BRL
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL

2.1.7. Zellen / Vektoren

<i>E. coli</i> TOP 10	Invitrogen
<i>E. coli</i> M15pRep4	QIAGEN
HUVEC	Promocell
U937	American Type Culture Collection
SBv5.9.03-Fibroblasten	Myokardbiopsie (Klinikum Jena)
pQE9	QIAGEN
pCR2.1-TOPO	Invitrogen

2.1.8. Antikörper

anti-human-MLC2V	Research Genetics, Inc.
anti-Kaninchen-IgG (H+L), AP-gekoppelt	BIO-RAD
anti-human-IgG (H+L), AP-gekoppelt	BIO-RAD
anti-Kaninchen-IgG (H+L), Biotin-gekoppelt	Linaris GmbH

Wenn nicht gesondert aufgeführt, wurden die Antikörper zur Inkubation in 1 X TBS (+ 1 % BSA + 0,05 % Tween) verdünnt.

2.1.9. DNA- und Proteinstandards

ϕ X174HaeIII / λ HindIII	Finnzymes
100 bp DNA-Leiter	Roche
0,24-9,5 Kb RNA-Leiter	Invitrogen
RNA-Leiter (low range)	MBI Fermentas
RNA-Leiter (high range)	MBI Fermentas
BenchMark Prestained Protein-Marker	Invitrogen

2.1.10. Oligonukleotide

Die Sequenzen der Oligonukleotidprimer wurden mit Hilfe der Oligo 6.0 Primer Analysis Software ermittelt. Die Herstellung der Primer erfolgte am Institut für Virologie, Universität Jena sowie durch die Firma MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland.

Alle für diese Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang unter Punkt 5.3. aufgelistet.

2.1.11. Software

E.A.S.Y. Win 32	Herolab GmbH
Phoretix 2D 6.0	Shimadzu Deutschland GmbH (Duisburg)
ScanPack II	Biometra
Lambda KC4 2.7	MWG-Biotech
Oligo 6.0	Molecular Biology Insights (Cascade, CO, USA)

2.1.12. Datenbankanalysen / Internetressourcen

Für den Datenbankabgleich aller sequenzierten PCR-Produkte wurden die blast-Programme (Altschul et al., 1990) auf der Internetseite des National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA eingesetzt.

- www.ncbi.nlm.nih.gov/
- www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/

Daneben wurde mit folgenden Internetressourcen gearbeitet:

- www.expasy.ch
- www.expasy.org/cgi-bin/peptidecutter
- <http://bimas.dcrf.nih.gov/molbio/proscan>
- www.rcsb.org/pdb
- <http://bighost.area.ba.cnr.it/BIG/UTRScan>
- www.cbs.dtu.dk/services/NetPicoRNA

2.1.13. Klinische Proben

Gewebe

Zur Probengewinnung dienten sowohl explantierte Herzen als auch Herzbiopsien. Die Untersuchungen erfolgten an linksventrikulärem Gewebe von Patienten unter 50 Jahren mit diagnostizierter IDCM und Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz im Rahmen einer koronaren Herzkrankheit (KHK). Bei Patienten mit KHK wurde nichtinfarziertes linksventrikuläres Gewebe verwendet. Als Kontrolle wurde linksventrikuläres Gewebe von Organspendern herangezogen, deren Herzen nicht zur Transplantation verwendet werden konnten. Für die geplanten Versuche lag ein positives Votum der Ethikkommission des Universitätsklinikums Jena zur Verwendung des humanen Materials vor.

Das Myokard wurde aus der freien linksventrikulären Wand gewonnen und nach Spülen in physiologischer NaCl-Lösung unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Eine IDCM wurde nach den Kriterien der WHO (30) unter Ausschluß folgender Erkrankungen diagnostiziert:

- koronare Herzerkrankung (Koronarangiographie)
- Vitium (2D- und Doppler-Echokardiographie, Ventrikulographie, Druckmessung in beiden Kreisläufen)
- Speicherkrankheit (histologisch, einschließlich Elektronenmikroskopie)
- floride Myokarditis (histologisch)
- Hypertonie (anamnestisch, echokardiographischer Ausschluß einer linksventrikulären Hypertrophie)
- Alkoholabusus

Die histologischen Diagnosen wurden am Städtischen Klinikum Darmstadt (Prof. Dr. Mall) im Rahmen der routinemäßigen Evaluierung ausgeführt. Eine Enterovirus-Assoziation wurde durch PCR-Untersuchungen mit Enterovirus-spezifischen Primern ausgeschlossen (Dr. Glück, Institut für Virologie, Klinikum Jena).

Kardiochirurgische Kooperationspartner waren einerseits das Herz- und Diabeteszentrum NRW, Klinik für Herzchirurgie (Prof. Dr. Körfer) sowie die Klinik für Kardiochirurgie am Klinikum der Universität Jena (Prof. Dr. T. Wahlers).

Blut- und Serumproben

Für die Gewinnung von Serum wurde von Patienten mit diagnostizierter DCM oder KHK sowie von Patienten mit nichtkardialen Erkrankungen Blut in unbeschichtete Röhren abgenommen und sofort eine halbe Stunde auf Eis gelagert. Nach einer Zentrifugation bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ über 30 min (5000 rpm) wurde das abgesetzte Serum aliquotiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Für die Isolation von genomischer DNA aus Vollblut wurde dieses nach Abnahme (in EDTA-beschichteten Röhren) bis zur Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ebenfalls auf Eis gestellt.

2.2. Methoden

2.2.1. Allgemeine Arbeitstechniken

Coomassie-Blau-Färbung

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden durch den Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G250 sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel ca. 30 min in der Färbelösung geschwenkt und anschließend in Entfärbelösung gewaschen.

Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung wurde nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) durchgeführt. Als Bradford-Reagenz diente eine Arbeitslösung von Biorad (Protein Assay), deren Absorptionsmaximum nach Bindung an die Aminosäuren mit einem Spektralphotometer (Milton Roy) bei 595 nm vermessen werden konnte. Proben und Eichlösung (BSA-Verdünnungsreihe von 1 µg/µl bis 10 µg/µl) wurden dabei 1:500 verdünnt. Aus der ermittelten Eichgerade konnte der Proteingehalt der Proben direkt ermittelt werden.

Konzentrationsbestimmung von RNA / DNA

Nukleinsäuren wurden mit einem Biophotometer von Eppendorf bei einer Wellenlänge von 260 nm (1:250 Verdünnung in Nuklease-freiem Wasser) unter Berücksichtigung des entsprechenden Methodenfaktors (RNA = 40; ds DNA = 50) direkt vermessen. Die Qualität der RNA wurde anhand des Absorptionsverhältnisses von 260 nm zu 280 nm bestimmt.

Kultivierung von Zellkulturen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden als adhärent wachsende Monolayer-Kulturen (Herzmuskelbiopsien) oder als Suspensionskulturen (HUVEC, U937) bei 37 °C und 5 % CO₂ in Plastik-Gewebekulturflaschen (25, 75 cm²) oder Plastik-Gewebekulturschalen (4 cm² Schalen) kultiviert. Die Kultivierung der Herzmuskelbiopsien resultierte im Absterben der Myozyten, während sich die Fibroblasten adhärent ausbreiteten. Alle drei bis vier Tage wurden ca. drei Viertel der Suspensionskulturen entfernt und durch frisches Medium (1 X VLE-RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin) ersetzt. Die adhären

Herzmuskelbiopsien wurden nach 3 bis 4 Wochen umkultiviert. Nach Abnehmen des Mediums und einmaligem Spülen mit 4 ml PBS (4 cm² Schalen) wurden die Zellen für maximal 3 min mit 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert, bis sie sich durch leichtes Klopfen vom Kulturschalenboden lösten. Nach Neutralisieren der Trypsin-Aktivität durch Zugabe der 5-fachen Menge an Medium (DMEM HAM'S-F12 + 20 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin) wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:4 in neue Kulturgefäße überführt.

2.2.2. Qualitative und quantitative Untersuchungen auf mRNA-Ebene

Die Gewinnung von zellulärer Gesamt-RNA aus humanem linksventrikulärem Myokard sowie aus dem Myokard von Ratten erfolgte nach dem Protokoll für RNA-Minipräparationen (20 bis 50 mg Gewebe) der Firma QIAGEN (RNeasy Mini Kit) unter Verwendung der mitgelieferten Pufferlösungen. Je Probe wurde 1 µg isolierte Gesamt-RNA für die anschließende cDNA-Synthese eingesetzt. Die Reverse Transkription erfolgte unter Nutzung eines Kits (Reverse Transcription System) von Promega.

2.2.2.1. Qualitativer Nachweis von MLC1V- und MLC2V-mRNA in verschiedenen Zelllinien

Für den Nachweis von MLC1V- und MLC2V-mRNA in verschiedenen Arten von Zellen wurde cDNA aus 1 µg Gesamt-RNA aus Monozyten (U937-Zelllinie), Fibroblasten (Endomyokardbiopsien) und Endothelzellen (HUVEC) gewonnen. Die Amplifizierung erfolgte über 30 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 57 °C nach folgendem Schema:

- 1 µl cDNA
- 18,9 µl steriles H₂O
- 2,5 µl Puffer 10 X
- 0,5 µl dNTP-Mix
- 0,5 µl MLC2V-Exp2 bzw. MLC1V Vorwärts-Primer (10 µM)
- 0,5 µl MLC2V-Exp2 bzw. MLC1V Rückwärts-Primer (10 µM)
- 0,1 µl Dynazyme-Polymerase (10 u/µl)

Das resultierende PCR-Produkt (502 bzw. 775 bp) wurde in einem 1,5%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.2.2. *Equilibrierung der cDNA-Proben aus Myokardgewebe*

Für die vergleichende Aussage über die Expression des MLC2V-Gens in verschiedenen Patienten (IDCM, KHK)- und Kontrollproben wie auch in Myokardproben von ischämischen Ratten und Kontrolltieren wurden die entsprechenden cDNA-Proben unter Zuhilfenahme des Haushaltsgens GAPDH durch kompetitive PCR equilibriert. Hierfür diente ein Kompetitorfragment von bekannter Größe und Konzentration (352 bp, 1000 attomol/ μ l), welches Primerbindungsstellen für GAPDH besitzt (PCR MIMIC Construction Kit, Clontech; (99)). Für die kompetitive PCR wurden cDNA und Kompetitorfragment in einen PCR-Ansatz gegeben, in welchem sie um die Primer, für welche sowohl Haushaltsgen als auch Kompetitorfragment Bindungsstellen besitzen, konkurrieren. Für jede cDNA-Probe wurden mehrere PCRs mit variierenden Kompetitorverdünnungen durchgeführt, wodurch eine Angleichung der Konzentrationen beider Fragmente erzielt wurde.

1 μ l cDNA

1 μ l Kompetitorfragment

18,9 μ l steriles H₂O

2,5 μ l Puffer10 X (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,5 mM MgCl₂; BIOMETRA)

0,5 μ l dNTP-Mix (200 μ M; BIOMETRA)

0,5 μ l GAPDH-CT bzw. rGAPDH Vorwärts-Primer (200 nM; CLONTECH)

0,5 μ l GAPDH-CT bzw. rGAPDH Rückwärts-Primer (200 nM; CLONTECH)

0,1 μ l DNA-Polymerase (10 u/ μ l; BIOMETRA)

Nach 3 min initialer Denaturierung bei 95 °C wurde die DNA über 29 Zyklen bei 95 °C für 30 s, 66 °C für 45 s und 72 °C für 30 s amplifiziert. Die resultierenden zwei PCR-Produkte (472 bzw. 352 bp) wurden nach Auftrennung in einem 1,5%-igen Agarosegel sichtbar gemacht. Zur videodensitometrischen Analyse wurde das ScanPack II-Programm (BIOMETRA) verwendet. Entsprechend wurden die cDNAs auf eine Konzentration von 0,25 attomol relativ zum Kompetitorfragment eingestellt.

2.2.2.3. *Semiquantitative RT-PCR*

Die equilibrierten cDNA-Proben wurden nun nach folgendem Ansatz auf die Expression des MLC2V-Gens hin untersucht.

- 5 µl cDNA (eingestellt mit A. dest., s. o.)
- 15,9 µl steriles H₂O
- 2,5 µl Puffer 10 X (s. o.)
- 0,5 µl dNTP-Mix (s. o.)
- 0,5 µl GAPDH-CT bzw. MLC2V-Exp1 Vorwärts-Primer (200 nM)
- 0,5 µl GAPDH-CT bzw. MLC2V-Exp1 Rückwärts-Primer (200 nM)
- 0,1 µl Dynazyme-Polymerase (10 u/µl)

Die PCR-Bedingungen wurden gleich denen der kompetitiven PCR gewählt. Durch anschließende elektrophoretische Auftrennung und computergestützte Analyse mittels ScanPack II konnten die Expressionsgrade nach Abgleich mit GAPDH erfaßt werden.

2.2.2.4. *Echtzeit-PCR (real time PCR)*

Zur Überprüfung des MLC2V-Expressionsgrades mittels Echtzeit-PCR wurde mit einem Light Cycler-FastStart DNA Master SYBR Green I Kit der Firma Roche Diagnostics in Kombination mit einem Kapillar Light Cycler (Roche) gearbeitet. Mit dieser Methode kann die Konzentration eines PCR-Produktes während der Amplifikation mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen direkt vermessen werden. Das Fluoreszenzsignal steigt proportional zur Einbaurate des Farbstoffes in die cDNA an. Es wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I (Roche) eingesetzt und bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm und einer Ausstrahlungswellenlänge von 510 nm vermessen. Mit Hilfe einer definierten Standardkurve, die mit bekannten Mengen eingesetzter Plasmid-DNA ermittelt wird, können unbekannte Konzentrationen der Proben-cDNA berechnet werden. Für die Standardkurven wurden ein 258 bp großes MLC2V-Fragment beziehungsweise ein 292 bp großes GAPDH-Fragment kloniert (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen) und in einer Verdünnungsreihe von 5×10^{-1} bis 5×10^{-7} µg/µl amplifiziert. Unter den gleichen Bedingungen wurde die Amplifizierung der zu untersuchenden Proben durchgeführt.

2 µl DNA-Probe
12,6 µl steriles H₂O
2,4 µl MgCl₂-Lösung (25 mM)
0,5 µl MLC2Vb bzw. GAPDHα Vorwärts-Primer (10 µM)
0,5 µl MLC2Vb bzw. GAPDHα Rückwärts-Primer (10 µM)
2 µl FastStart Reaction Mix 10 X (Taq DNA-Polymerase (1 u/µl), SYBR Green I, dNTPs, Puffer)

Die Amplifikation fand über 60 Zyklen bei einer T_A von 62 °C (MLC2V) bzw. 58 °C (GAPDH) statt.

2.2.2.5. MLC1V/MLC2V-Duplex-RT-PCR

Nach Optimierung wurden die Primer für das humane MLC1V- und MLC2V-Gen im Verhältnis MLC1V:MLC2V = 7:1 eingesetzt.

1 µl cDNA
16,9 µl steriles H₂O
2,5 µl Puffer 10 X
0,5 µl dNTP-Mix
1 µl MLC1V Vorwärts-Primer (10 µM)
1 µl MLC1V Rückwärts-Primer (10 µM)
1 µl MLC2V-Exp2 Vorwärts-Primer (1:7 Verdünnung aus 10 µM)
1 µl MLC2V-Exp2 Rückwärts-Primer (1:7 Verdünnung aus 10 µM)
0,1 µl Dynazyme-Polymerase (10 u/µl)

Die Amplifizierung erfolgte über 24 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 57 °C. Die resultierenden PCR-Produkte von 775 bp und 502 bp wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Simultan erfolgte eine Amplifizierung des GAPDH-Gens (s. o.), welches für die videodensitometrische Auswertung herangezogen wurde.

2.2.2.6. Northernblot

RNA aus humanem linksventrikulären Herzgewebe sowie aus dem linken Ventrikel von Rattenherzen wurde mittels RNeasy Mini Kit der Firma QIAGEN isoliert. 5 µg Gesamt-RNA je Probe wurden in 15 µl RNA-Laufpuffer aufgenommen, 15 min bei 65 °C denaturiert und in einem 1%-igen Agarose-MOPS-Gel aufgetrennt. Mittels Vakuumblotter wurde die RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen und durch UV-Bestrahlung (5 min) fixiert.

Herstellung der DNA-Sonden

205 bzw. 295 bp große DNA-Abschnitte wurden aus kardialer cDNA amplifiziert und mittels TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) kloniert. Nach Isolierung des Inserts aus dem Plasmid und Gelextraktion erfolgte die radioaktive Markierung der DNA (Random Primed DNA Labeling Kit; Roche):

- 11,5 µl DNA (2 µg in A. bidest.)
- 3,0 µl dGTP-, dCTP-, dTTP-Mix (je 0,5 mM)
- 2,0 µl Hexanukleotidgemisch (in 10 X Puffer)
- 2,5 µl $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (25 µCi)
- 1,0 µl Klenow-Enzym (2 u/µl)

Nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA gestoppt und nicht eingebaute $\alpha^{32}\text{P}$ -dATPs wurden unter Verwendung des QIAquick Purification Systems (QIAGEN) abgetrennt.

Hybridisierung

Die Membran wurde zunächst mit 5 ml Hybridisierungslösung für 3 h bei 42 °C und 7 rpm vorhybridisiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe der radioaktiv markierten Sonde zu 5 ml frischer Hybridisierungslösung und eine rotierende (7 rpm) Inkubation über 48 h bei 42 °C. Nach mehreren Waschschritten mit 2 X SSC (3 x 30 min, 68 °C) wurde die Membran zur Sichtbarmachung der gebundenen Radioaktivität über Nacht auf einem Röntgenfilm exponiert.

2.2.2.7. DNA Microarray Analyse

Zusätzlich zur semiquantitativen RT-PCR, zur Echtzeit-PCR und zum Northernblot wurde diese Methode zum Vergleich des MLC2V-Expressionsgrades in zwei IDCM-Herzen und einem Kontrollherz herangezogen. Mittels eines Oligotex mRNA Midi Kits (QIAGEN) wurden je Probe 600 ng mRNA isoliert und auf 50 ng/µl in TE-Puffer eingestellt. Für die cDNA-Synthese, die kovalente Bindung eines Fluoreszenzfarbstoffes (Cy3 bzw. Cy5) sowie die Hybridisierung der Proben auf einem Unigem V Chip wurde der kommerziell verfügbare Service der Firma Genomsystems Inc. (St. Louis, MO, USA) genutzt.

2.2.3. Suche nach Mutationen in den Genen der leichten Myosinketten

2.2.3.1. Didesoxy-Fingerprinting (ddF)

PCR-Amplifikation

DNA von 54 Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie sowie von 53 Kontrollpersonen wurde unter Verwendung des QIAamp Blood Mini Kits (QIAGEN) aus Leukozyten des peripheren Blutes extrahiert. Die Amplifikation der zu sequenzierenden Bereiche erfolgte nach folgendem Ansatz:

- 2 µl DNA (25 - 35 ng)
- 39,5 µl A. dest.
- 5 µl 10X-Puffer
- 1 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 1 µl Vorwärts-Primer (10 µM), biotinyliert
- 1 µl Rückwärts-Primer (10 µM), biotinyliert
- 0,5 µl HF Polymerase-Mix (10 u/µl, CLONTECH)

Nach 5 min initialer Denaturierung bei 94 °C wurde die DNA über 35 Zyklen bei 94 °C für 30 s, der entsprechenden Annealingtemperatur für 30 s, 72 °C für 30 s gefolgt von einer Extension bei 72 °C über 5 min amplifiziert. Die resultierenden PCR-Produkte wurden unter

Verwendung eines PCR-Reinigungskits von Qiagen nach dem zugehörigen Protokoll aufgereinigt und in 30 µl Tris-Puffer aufgenommen.

Cycle Sequencing

Für die Sequenzierungs-PCR nach Sanger et al. (108) wurde ein AmpliCycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) verwendet. Pro 1 µl Probe ergab sich folgender Ansatz:

2,66 µl A. dest.

0,13 µl Vorwärts- (bzw. Rückwärts-) Primer (20 µM), biotinyliert

0,5 µl Cycling Mix (10 X), enthält 0,25 u/µl AmpliTaq DNA-Polymerase

1,0 µl dTTP Terminations-Mix (10 µM dNTP-Mix + 900 µM ddTTP)

Der Ansatz wurde 2 min bei 94 °C denaturiert und es folgten 30 Zyklen (30 s 94 °C, 45 s entsprechende Annealingtemperatur, 45 s 72 °C) der Amplifikation sowie 3 min terminale Elongation. Die Reaktion wurde mit 2 µl Stopplösung beendet.

ddF-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Sequenzierungsprodukte erfolgte in einem 7%-igen nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel unter Verwendung eines DNA Seq Gel Systems (Biometra). Vor dem Auftragen wurden die Proben 5 min bei 95 °C denaturiert. Pro Bahn wurden 2 µl Probe geladen und es erfolgte die elektrophoretische Trennung über 6 h bei 17 W.

Detektion

Der Transfer der aufgetrennten Proben auf eine positiv geladene Nylonmembran erfolgte über 30 min durch einseitig gerichtetes Kapillarblotting mit 10 X SSC als Transferpuffer. Durch 5-minütige UV-Bestrahlung wurde die DNA kovalent an die Membran gebunden. Zur Chemilumineszenz-Detektion wurde mit dem Phototope-Star Detection Kit der Firma New England BioLabs gearbeitet. Die Exposition erfolgte auf einem Röntgenfilm (BioMax MR-1, 35 x 43 cm) und die Sequenzen wurden manuell gelesen.

2.2.3.2. Sequenzierung

Vorbereitend für die Sequenzierung wurden die entsprechenden DNA-Abschnitte analog zu Punkt 2.2.3.1., jedoch mit nichtbiotinylierten Primern, amplifiziert. Darauf folgte eine Aufreinigung der Produkte (QIAquick PCR Purification Kit) sowie deren Überprüfung im Agarosegel. Zur Sequenzierung wurde die Kettenabbruchmethode von Sanger et al. (1977) in modifizierter Form (Cycle Sequencing) in Kombination mit dem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer System (Applied Biosystems) verwendet. Die Sequenzierungsreaktion wurde unter Zuhilfenahme eines ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems) nach folgendem Ansatz durchgeführt:

- 5 µl gereinigtes PCR-Produkt (100 - 200 ng)
- 4 µl Aqua dest.
- 1 µl Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer (10 µM)
- 2 µl BigDye Terminator Mix

Nach einer 2-minütigen Denaturierung bei 95 °C folgten 25 Zyklen mit jeweils 1 min 95 °C, 45 s 50 °C und 4 min 60 °C. Die Produkte wurden mit 35 µl 96%-igen Ethanol für 10 min präzipitiert, 30 min bei 13500 rpm zentrifugiert, mit 100 µl 70%-igen Ethanol gewaschen und 5 min vakuumgetrocknet. Die DNA wurde in 25 µl Template Suppression Reagent (Applied Biosystems) resuspendiert und für 2 min bei 95 °C denaturiert. Die Probenauftrennung erfolgte mit dem Kapillarsequenzierer ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

2.2.3.3. Sequenzanalyse und Restriktionsenzymverdau

Die Analyse der Sequenzierdaten erfolgte durch Abgleich der erhaltenen Sequenzen mit der NCBI-Gendatenbank unter Zuhilfenahme des BLAST-Programms.

Für den Nachweis des T132C-Polymorphismus in Exon drei der leichten Myosinkette Typ 2 wurden je Ansatz 2 µl gereinigtes PCR-Produkt (s. 2.2.3.2.), 6 µl A. dest., 1 µl 10 X Restriktionspuffer sowie 1 µl *TaqI*-Restriktionsenzym (10 u/µl) eingesetzt. Die Proben wurden bei 65 °C für 1,5 h inkubiert und anschließend in einem 2%-igen Agarosegel aufgetrennt.

2.2.4. Quantitative und qualitative Untersuchungen auf Proteinebene

2.2.4.1. Quantitativer Immunblot

Gewebeaufschluß

Proben zwischen 30 und 50 mg humanem linksventrikulärem Herzgewebe wurden zur Proteingewinnung zunächst mit 200 µl Waschpuffer gespült, dann auf flüssigem Stickstoff zermörsert und in das 5-fache Volumen Lysispuffer aufgenommen. Nach 30 min Zentrifugation (15000 rpm, 10 °C) wurde der Überstand, welcher die Proteinfraction enthält, abgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am Spektrophotometer.

Immunblot-Analyse

Nach Optimierung von Proteinmenge und AK-Konzentration in Vorversuchen wurden auf ein 12%-iges SDS-PAA-Gel pro Tasche 10 µg Gesamtprotein plus 3 µl Probenpuffer (6 X) nach 5-minütigem Denaturieren bei 95 °C aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte auf einem Minigel (Mini Protean II, Biorad, 10 cm x 8 cm) bei 120 V über 1,5 h. Das Gel wurde mittels Naßblot (120 mA, über Nacht) auf eine Nitrozellulosemembran (0,2 µm Porengröße) übertragen. Das gewünschte Protein wurde mit einem kolorimetrischen System der Firma Biorad (Immun-Blot Assay Kit) nach folgendem Schema sichtbar gemacht:

- Blockierung: TBS + 3 % BSA, 1 h, RT
- Primärantikörper: anti MLC2V, 1:1000, 1 h, RT
- Sekundärantikörper: Ziege-anti-Kaninchen IgG (H + L), Alkalische Phosphatasegekoppelt, 1:3000, 1 h, RT
- Farbentwicklung: BCIP + NBT, 5 – 30 min, RT

Der MLC2V-spezifische Primärantikörper wurde dabei durch Immunisierung von Kaninchen (Research Genetics, Inc., USA) mit dem folgenden Aminosäuresequenz-Motiv der humanen MLC2V hergestellt:

N'-KADYVREMLTTQAERFSKEEVD-C'

Das Sequenzmotiv war dabei so gewählt, daß keine Homologien zu anderen MLC-Isoformen bestanden.

Für die Quantifizierung wurden die Proben in gleicher Menge auf ein paralleles PAA-Gel aufgetragen und das Gel wurde anschließend Coomassie-gefärbt. Durch die videodensitometrische Erfassung des Gesamtproteins in einer Probe wurden diese zueinander abgeglichen und der densitometrische Wert der MLC2V-Banden aus dem Immunblot wurde relativ zum Gesamtprotein ermittelt.

Direkter ELISA

Als weitere Methode zur Untersuchung des MLC2V-Gehalts in den Gewebeproben diente eine Abwandlung der Standard-ELISA-Technik.

Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde mit 100 ng/Loch Gesamtproteinaufschluß einer Probe, verdünnt in 100 µl TBS, über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dieser Beschichtung folgte die Blockierung der freien Bindungsstellen mit 3 % BSA/TBS (300 µl/Loch) für 1,5 h bei 37 °C. Als Primärantikörper dienten 50 µl anti-MLC2V-Antikörper (1:1000, 2 h, RT) und als Sekundärantikörper 100 µl eines AP-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-IgG (1:1000, 1 h, RT). Die Reaktion mit einer PNPP-Lösung (50 µl/Loch) ergab eine Substratumsetzung, deren Signal nach 60 min bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen wurde (Lambda E ELISA Reader, MWG-Biotech; KC4-Software).

2.2.4.2. Herstellung von rekombinantem MLC2V

PCR-Amplifikation und Restriktionsverdau

Die Primersequenzen für die selektive Amplifikation des MLC2V-Transkripts wurden so gewählt, daß unter Aussparung des Startkodons und unter Beachtung des offenen Leserahmens am 5'-Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bam*HI sowie am 3'-Ende für das Enzym *Hind*III entstand. Nach der Amplifikation erfolgte die Überprüfung der gewünschten Bande in einem 1,5%-igen Agarosegel. Das Amplifikat wurde gereinigt (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN), in 30 µl Trispuffer aufgenommen und anschließend mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI 2,5 h bei 37 °C inkubiert. Dieser Ansatz wurde erneut aufgereinigt und für weitere 20 h mit dem Restriktionsenzym *Hind*III, ebenfalls bei 37 °C, inkubiert. Es folgte eine Auftrennung im Agarosegel und die Extraktion der DNA aus dem Gel (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN).

Mit dem Expressionsvektor pQE9 (QIAGEN) erfolgte vorbereitend auf die Ligation mit dem MLC2V-Transkript ebenfalls ein Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (*Bam*HI, *Hind*III).

Ligation und Subklonierung

Die kodierende MLC2V-Sequenz wurde nun durch gerichtete Ligation in die Vektor-DNA eingefügt. Die Reaktion erfolgte bei 16 °C über Nacht.

Ligationsansatz:	10 µl pQE9 (<i>Bam</i> HI-, <i>Hind</i> III-gespalten; gereinigt)
	4 µl MLC2V-cDNA (<i>Bam</i> HI-, <i>Hind</i> III-gespalten; gereinigt)
	2 µl steriles H ₂ O
	2 µl Ligationspuffer (10 X)
	2 µl T4 DNA-Ligase (1 u/µl)

Anschließend wurden 2 µl des Ligationsansatzes in 50 µl chemisch kompetente *E. coli* (TOP10, Invitrogen) transformiert und auf LB-Agar mit 50 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Sichtbare Einzelkolonien wurden am Folgetag gepickt, in 5 µl H₂O suspendiert und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Dieses Template wurde über 40 Zyklen nach folgendem Schema amplifiziert:

5 µl Template	→ 40 Zyklen á 1 min 95 °C
36,5 µl H ₂ O	45 s 55 °C
5 µl 10 X Puffer	45 s 72 °C
1 µl dNTP-Mix	
1 µl pQE9-Vorwärts-Primer (10 µM)	
1 µl pQE9-Rückwärts-Primer (10 µM)	
0,5 µl DNA-Polymerase (2 u/µl)	

Durch die Größe des PCR-Produktes nach Auftrennung im Agarosegel konnte auf den Einbau des Inserts in den Expressionsvektor geschlossen werden. Für einige der Insert-positiven Kolonien wurde durch Minipräparation (GFX Micro Plasmid Prep, Amersham) und Sequenzierung die Orientierung sowie die Vollständigkeit und Einhaltung des Leserahmens der eingefügten Fragmente überprüft. Zur Sequenzierung wurde der Kapillarsequenzierer

CEQ 2000XL (Beckman) in Kombination mit dem CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing Quick Start Kit (Beckman) verwendet.

Sequenzierungsansatz: 150 ng Plasmid (in 14 μ l A. dest.)
 2 μ l Vorwärts- bzw. Rückwärts-Primer (10 μ M)
 4 μ l Dye Terminator Cycle Sequencing Master Mix (Beckman)

Klone mit korrekter Insert-DNA wurden zur Herstellung größerer DNA-Mengen in einem 100 ml Kulturvolumen angesetzt und das Plasmid wurde (pQE9-MLC2V) unter Verwendung eines Endo Free Plasmid Maxi Kits der Firma QIAGEN aufgereinigt. Die Plasmid-DNA wurde mit einer Konzentration von 12,5 μ g/ μ l in TE-Puffer aufgenommen.

Transformation in M15(pREP4) und Induktion der Expression

Der E. coli-Stamm M15(pREP4) besitzt das Repressorplasmid pRep4 und kann damit nach Zugabe eines pQE-Plasmids die Produktion von rekombinanten Proteinen steuern. Die Herstellung chemisch kompetenter M15(pREP4) erfolgte mit der CaCl_2 -Methode. Für die Herstellung kompetenter M15(pREP4)-Zellen wurde deren Wachstum (in LB-Medium mit 25 μ g/ml Kanamycin) bei einer OD von 0,6 abgebrochen und die Zellen wurden auf Eis abgekühlt. Nach einer Zentrifugation (4000 rpm, 4 °C, 10 min) konnte das Zellpellet in eiskaltem 0,1 M CaCl_2 aufgenommen, 5 min auf Eis inkubiert, erneut zentrifugiert und am Ende in 0,1 M CaCl_2 mit 15 % Glycerol (87%-ig) gelöst werden. Die Lagerung der Zellen erfolgte in kleinen Portionen bei -80 °C.

Für die Transformation wurden 50 μ l kompetente M15(pREP4) mit 5 μ l des gereinigten pQE9-MLC2V-Plasmids 30 min auf Eis inkubiert, für 2 min bei 42 °C erwärmt und auf Eis abgekühlt. Nach 1 h Inkubation in 1 ml LB-Medium (37 °C, 220 rpm) wurden die Zellen abzentrifugiert, in 100 μ l Medium resuspendiert und auf LB-Agar mit 100 μ g/ml Ampicillin und 25 μ g/ml Kanamycin ausplattiert. Für einige Kolonien wurde in der Folge eine 5 ml Vorkultur angesetzt, aus dieser durch Minipräparation das Plasmid isoliert und die Vollständigkeit des Inserts mittels Sequenzierung (s. o.) überprüft.

Zur Induktion der Expression des rekombinanten Proteins wurde 1 ml einer positiven Vorkultur mit 4 ml Selektionsmedium verdünnt und zunächst 1 h bei 37 °C inkubiert. Darauf erfolgte die Induktion durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,1 M. Die

Kultur wurde weitere 18 h inkubiert, wobei zur Bestimmung des optimalen Expressionszeitpunktes zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen wurden. Für die Bestimmung der Löslichkeit des Proteins wurde nach 18 h aus 2,5 ml Kultur das abzentrifugierte Pellet in 0,5 ml Lysispuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Aufschluß der Probe durch Ultraschall (5 x 10 s, 300 W) und eine Zentrifugation für 30 min bei 4 °C, 14000 rpm. Der Überstand, welcher die lösliche Proteinfraction enthält, wurde abgenommen und das Pellet mit den unlöslichen Proteinen nochmals in 0,3 ml Lysispuffer resuspendiert. Durch die Auftrennung dieser Proben in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel und anschließende Coomassiefärbung wurden Löslichkeit und Expressionszeitpunkt des rekombinanten Proteins sichtbar gemacht.

Proteinaufreinigung

Für eine präparative Aufreinigung des rekombinanten Proteins diente ein N-terminales Fusionspeptid (6 x Histidin), welches in der Vektorsequenz (pQE9) enthalten ist. Durch die hohe Affinität der Hexahistidinsequenz an Ni-NTA-Agarose (Metall-Chelat-Affinitätschromatographie) und eine pH-abhängige Eluierung von dieser lassen sich entsprechend fusionierte Proteine leicht aus einem Proteingemisch aufreinigen.

Die affinitätschromatographische Reinigung fand unter denaturierenden Bedingungen statt. Aus einer M15(pREP4)/pQE9-MLC2V-Vorkultur wurden 2 ml in 200 ml Selektionsmedium verdünnt, 1 h inkubiert und anschließend mit einer Endkonzentration von 0,1 M IPTG induziert. Nach 16 h Wachstum wurden die Zellen abzentrifugiert (15 min, 4 °C, 5000 rpm) und das Pellet wurde in 4 ml Lysispuffer aufgenommen. Die Probe wurde weitere 30 min zentrifugiert (13500 rpm, RT), der Überstand abgenommen und mit 1 ml Ni-NTA-Agarose (Qiagen) bei 200 rpm geschüttelt. Nach 1 h wurde das Gemisch auf eine 1 ml-Polypropylensäule appliziert und 2 x mit je 4 ml Waschpuffer gewaschen. Es folgte die Elution des Fusionsproteins mit 4 x 0,5 ml Elutionspuffer. Die Effizienz der Aufreinigung wurde wiederum auf einem 12%-igen SDS-PAA-Gel mit anschließender Coomassiefärbung überprüft. Am Ende wurde die Probe in 0,1 M Natriumphosphat umgepuffert (PD-10 Desalting Columns, Amersham). Die Konzentration des rekombinanten MLC2V wurde an einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm vermessen und auf 5 µg/µl eingestellt.

2.2.4.3. Autoantikörper-Screening

Der Gewebeaufschluß aus linksventrikulärem Myokard sowie die Durchführung des Immunblots, soweit nicht anders erwähnt, erfolgten analog zu Punkt 2.2.4.1.

Autoantikörper-Screening mittels Immunblot

Rekombinantes MLC2V wurde in größerer Menge (ca. 600 µg) auf ein 12%-iges SDS-Polyacrylamidgel mit nur einer Tasche aufgetragen und nach der Elektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Diese wurde nach dem Blockierungsschritt in einen Multiscreen Apparat (BIORAD) eingebaut. In die Kanäle dieser Apparatur wurden je 300 µl Patientenserum anstelle eines spezifischen Primärantikörpers pipettiert. Nach einer Inkubation bei 4 °C über Nacht wurden die Seren abgesaugt, die Membran aus der Kammer entfernt und mit einem anti-human-IgG-Antikörper + Alkalische Phosphatase standardmäßig detektiert.

Autoantikörper-Screening mittels direktem ELISA

Als weitere Methode zur Untersuchung der Patientenseren hinsichtlich einer Immunantwort auf das MLC2V-Protein diente ein direkter ELISA.

Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde mit 100 ng/Loch rekombinatem MLC2V über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dieser Beschichtung folgte die Blockierung der freien Bindungsstellen mit 3 % BSA/TBS (300 µl/Loch) für 1,5 h bei 37 °C. Als Primärantikörper dienten 100 µl Patientenserum (1:20 in TTBS + 1 % BSA verdünnt, 2 h, 4 °C) und als Sekundärantikörper 100 µl eines AP-gekoppelten anti-human-IgG (1:1000, 1 h, RT). Die Reaktion mit einer PNPP-Lösung (100 µl/Loch) ergab eine Substratumsetzung, welche nach 40 min, 60 min und 90 min bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen wurde (Lambda E ELISA Reader, MWG-Biotech; KC4-Software).

2.2.4.4. Immunhistochemie

Die topographische Verteilung und Stärke der Expression von MLC2V wurde durch immunhistochemische Farbmarkierung von Aceton-fixierten Schnitten kryokonservierter Patientenproben ermittelt.

Es wurden 6- μ m-Kryostatschnitte angefertigt, auf beschichtete Objektträger (Superfrost Plus, Fischer) aufgebracht und für 1,5 h bei RT getrocknet. Bis zur Weiterverwendung wurden die Schnitte mit Parafilm abgedeckt und bei -80 °C gelagert.

Die gefrorenen Schnitte wurden zunächst für 1,5 h bei RT getrocknet. Es folgte eine Fixierung mit 100%-igem, eiskaltem Aceton für 5 min und eine weitere Trocknung für 30 min bei Raumtemperatur. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte für 5 min mit 0,1 % Natriumazid / 0,3 % H_2O_2 / 0,3 % Ziegennormalserum in PBS inkubiert (RT). Freie Bindungsstellen wurden mit 2,5%-igem BSA / 0,3 % Ziegennormalserum in PBS blockiert (30 min, 37 °C) und der primäre Antikörper (anti-MLC2V, 1:1000, 1 h, 37 °C) wurde mittels biotinyliertem Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen IgG, 1:200, 2 h, 37 °C) lokalisiert. Nach mehreren Waschschritten (1 X PBS) wurde mit einem Streptavidin-Peroxidase-Komplex (Vectastain Elite ABC-Kit, Serva) für 30 min bei 37 °C inkubiert (1:100 in PBS / 0,02 % Tween / 2,5 % BSA). Die Farbentwicklung erfolgte durch Zugabe von Diaminobenzidin + H_2O_2 (DAB-Peroxidasesubstrat-Tabletten, Sigma) für 30 min. Mittels Hämatoxyllin wurden die Kerne gegengefärbt (10 s), abschließend die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (95 % EtOH, 100 % EtOH, 100 % Xylol) entwässert und in Abdeckmedium (Vector Laboratories) eingebettet. Die Auswertung erfolgte an einem Durchlichtmikroskop (Zeiss).

2.2.4.5. 2D-Elektrophorese

Ohne Fluoreszenzmarkierung

Der Gewebeaufschluß aus humanem Myokard wurde analog zu Punkt 2.2.4.1. durchgeführt, jedoch mit einem speziellen 2D-Lysispuffer. Für die Auftrennung in der 1. Dimension wurden 500 μ g Protein, verdünnt in Rehydratisierungspuffer, auf einen Gelstreifen mit immobilisiertem pH-Gradienten (pH-Bereich 3 – 10, nicht linear, 18 cm) appliziert. Es folgte zunächst eine Rehydratisierung des Gels über 16 h bei 40 V. Für die isoelektrische Fokussierung erfolgte die Auftrennung mit folgenden Parametern:

- 150 V; 0,5 h
- 500 V; 0,5 h
- 1000 V; 1 h
- 4000 V; 1 h
- 8000 V; 0,5 h
- 8000 V; 58000 Vh

Die Auftrennung in der 2. Dimension erfolgte auf einem 12,5%-igen SDS-PAA-Gel. Vor dem Auftragen des Gelstreifens wurde dieser 2 x 15 min in Equilibrierungspuffer 1 bzw. 2 geschüttelt. Die Elektrophorese lief mit 20 mA über 19 h bei 15 °C. Nach Beendigung wurde das Gel für 30 min fixiert, für weitere 30 min Coomassie-gefärbt und anschließend mit A. dest. entfärbt. Die Visualisierung erfolgte mittels Herolab-Geldokumentationssystem (E.A.S.Y.Win32, Herolab GmbH).

Mit Fluoreszenzmarkierung

Um zwei verschiedene Proteinpopulationen auf einem Gel laufen lassen zu können, wurden diese zur späteren Trennung voneinander vor der Elektrophorese mit verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Hierfür wurde die Proteinkonzentration der Probe auf 2,4 µg/µl eingestellt und 550 µl davon mit Alexa Fluor 488 bzw. Alexa Fluor 594 (Molecular Probes) 1 h bei RT gerührt. Es folgte eine Aufreinigung der Probe mit dem Alexa Fluor Protein Labeling Kit (Molecular Probes) und die Überprüfung der Markierung auf einem 12%-igen SDS-PAA-Gel. Anschließend wurden die Proben konzentriert, entsalzt (Plus One 2-D Clean-Up Kit, Amersham) und in 50 µl Rehydratisierungspuffer aufgenommen. Nach einer Konzentrationsbestimmung folgte die Rehydratisierung (s. o.), wobei pro Streifen zwei verschiedene Proteinpopulationen à 70 µg markiertes Protein vermengt und aufgetragen wurden. Nach Auftrennung in der 1. und 2. Dimension (s. o.) erfolgte die Visualisierung der Gele an einem Fluoreszenzimager (FLA 5000).

Fluor 488: Anregung = 473 nm	Emissionsfilter = FITC
Fluor 594: Anregung = 532 nm	Emissionsfilter = CY5

3. Ergebnisse

3.1. Qualitative und quantitative Untersuchungen auf mRNA-Ebene

3.1.1. Qualitativer Nachweis der MLC1V- und MLC2V-Transkription

Für die nachfolgenden quantitativen Analysen wurde zunächst das Vorhandensein der ventrikulären Isoformen der MLC1V und MLC2V für die verschiedenen Zelltypen einer Myokardgewebeprobe untersucht. Im einzelnen handelt es sich dabei neben den Kardiomyozyten um Fibroblasten, Endothelzellen und Monozyten. Der Nachweis von MLC2V-mRNA in Fibroblasten erfolgte aus cDNA einer kultivierten Endomyokardbiopsie, der Nachweis in Endothelzellen und Monozyten aus cDNA einer Nabelschnurendothel-Zelllinie (HUVEC) beziehungsweise aus cDNA einer monozytären Zelllinie (U 937).

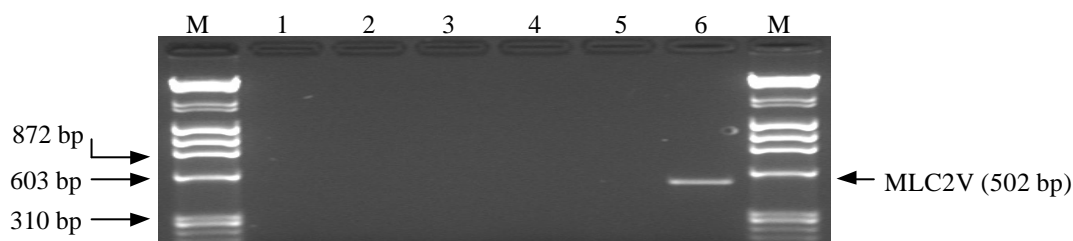


Abb. 3-1 Qualitativer Nachweis der MLC2V-mRNA-Expression in verschiedenen Zelllinien mittels PCR

Aus humanen Zelllinien wurde Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit MLC2V-spezifischen Primern amplifiziert.

M = DNA-Größenstandard (λ DNA *Hind*III + ϕ X174DNA *Hae*III)

1 = Endomyokardbiopsie-Primärkultur (4 Wochen); 2 = Endomyokardbiopsiekultur - 2. Passage (12 Wochen);

3 = HUVEC; 4 = U 937; 5 = Negativkontrolle (H_2O); 6 = Positivkontrolle (Kardiomyozyten)

(1,5%-iges Agarosegel)

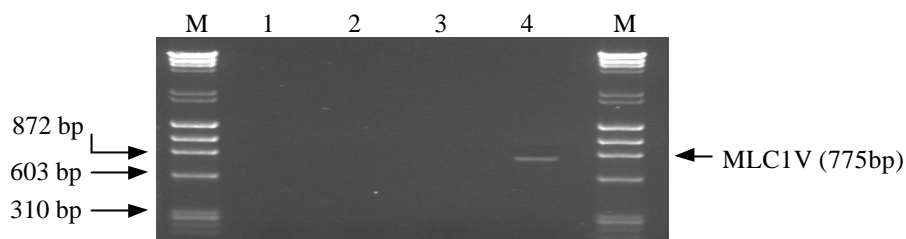


Abb. 3-2 Qualitativer Nachweis der MLC1V-mRNA-Expression in verschiedenen Zelllinien mittels PCR

Aus humanen Zelllinien wurde Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit MLC1V-spezifischen Primern amplifiziert.

M = DNA-Größenstandard (λ DNA *Hind*III + ϕ X174DNA *Hae*III)

1 = Endomyokardbiopsie-Primärkultur (4 Wochen); 2 = HUVEC; 3 = U 937;

4 = Positivkontrolle (Kardiomyozyten)

(1,5%-iges Agarosegel)

Wie aus den Abbildungen 3-1 und 3-2 ersichtlich, ist sowohl die MLC1V- als auch die MLC2V-Transkription auf die Kardiomyozyten beschränkt.

3.1.2. Equilibrierung der cDNA-Proben aus Myokardgewebe

Um die MLC2V-mRNA-Expression in den verschiedenen Gewebeproben vergleichen zu können, wurden zunächst die cDNA-Konzentrationen der Proben an dem Haushaltsgen GAPDH normalisiert. Je 1 µg isolierte Gesamt-RNA aus humanem Myokardgewebe wurde zur Synthese von komplementärer DNA eingesetzt. Im einzelnen handelte es sich um 11 IDCM-Proben, 9 KHK-Proben sowie 6 Kontrollproben. Durch die Amplifizierung von GAPDH in Gegenwart eines Kompetitorfragments bekannter Konzentration konnte die Konzentration an GAPDH bestimmt werden. Die Analyse erfolgte über die elektrophoretische Auftrennung von Kompetitorkonzentrationsreihen, die Quantifizierung der Banden wurde mit Hilfe des ScanPack II-Programms (Biometra) durchgeführt. Anhand dieser Werte wurde die cDNA der einzelnen Proben auf eine gleiche Ausgangskonzentration relativ zum Kompetitorfragment eingestellt, so daß von einem annähernd gleichwertigen Transkriptionsstatus für weitere Untersuchungen ausgegangen werden konnte. Abbildung 3-3 zeigt an fünf Beispielen die zunehmende GAPDH-Konzentration bei gleichzeitig abnehmender Kompetitorkonzentration.

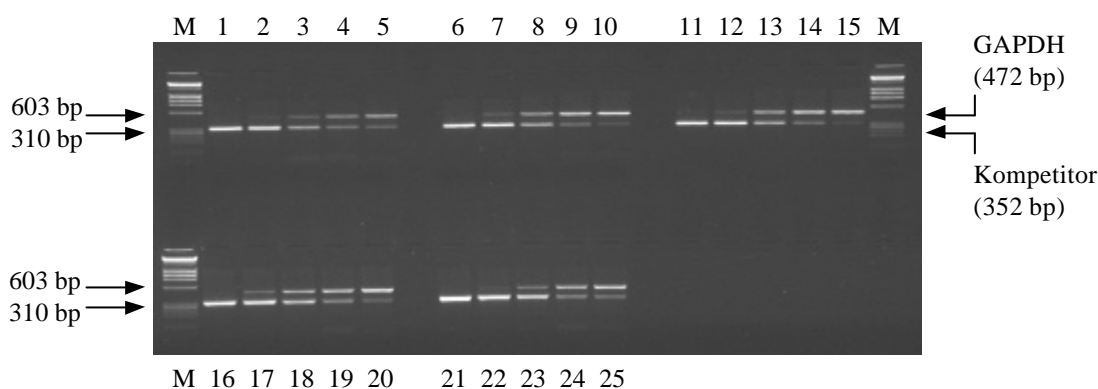


Abb. 3-3 Kompetitive PCR von Myokardgewebeproben am Beispiel von fünf IDCM-Proben

Aus linksventrikulärem Myokard wurde Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit GAPDH/Kompetitor-spezifischen Primern amplifiziert.

M = DNA-Größenstandard (λ DNA *Hind*III + ϕ X174DNA *Hae*III)

1 – 5 = cDNA-Probe 1; 6 – 10 = cDNA-Probe 2; 11 – 15 = cDNA-Probe 3; 16 – 20 = cDNA-Probe 4;

21 – 25 = cDNA-Probe 5

(1,5%-iges Agarosegel)

3.1.3. Quantifizierung der cDNA-Proben mittels semiquantitativer RT-PCR

Die equilibrierten cDNA Proben der 11 IDCM-, 9 KHK- und 6 Kontroll-Myokardgewebe wurden mittels semiquantitativer RT-PCR auf den Expressionsstatus des MLC2V-Gens hin untersucht. Die unter gleichen PCR-Bedingungen laufende Amplifizierung des GAPDH-Gens, welche noch in der exponentiellen Phase abgebrochen wurde, bestätigte dabei die durch die kompetitive PCR ermittelte Normalisierung der Proben (Abb. 3-4, 3-5 und 3-6). Die genaue quantitative Analyse wurde wiederum mit dem ScanPack II-Programm durchgeführt, wobei die densitometrischen Werte der MLC2V-Banden im Verhältnis zu den GAPDH-Banden ermittelt wurden.

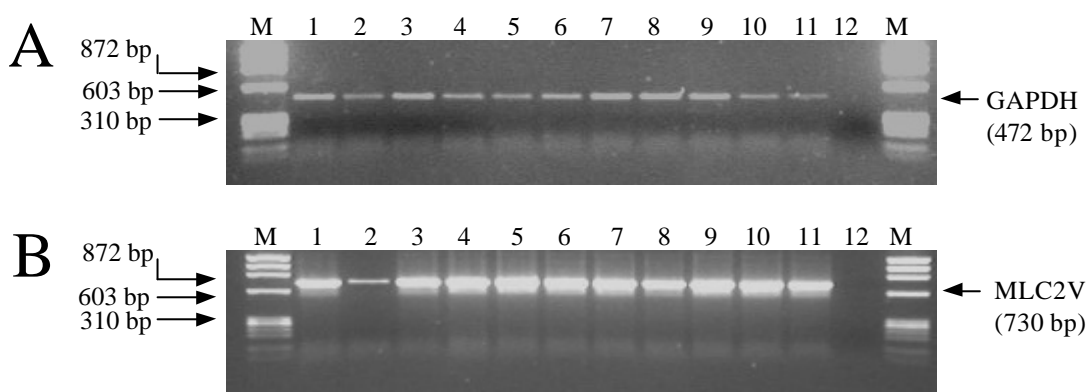


Abb. 3-4 Semiquantitative RT-PCR der IDCM-Proben

Aus linksventrikulärem Myokard wurde Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit MLC2V- bzw. GAPDH-spezifischen Primern amplifiziert.

M = DNA-Größenstandard (λ DNA *Hind*III + ϕ X174DNA *Hae*III)

1 – 11 = linksventrikuläres Gewebe von Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie (IDCM)

12 = Negativkontrolle (PCR mit H₂O)

Bild A: PCR mit GAPDH-spezifischen Primern; *Bild B*: PCR mit MLC2V-spezifischen Primern

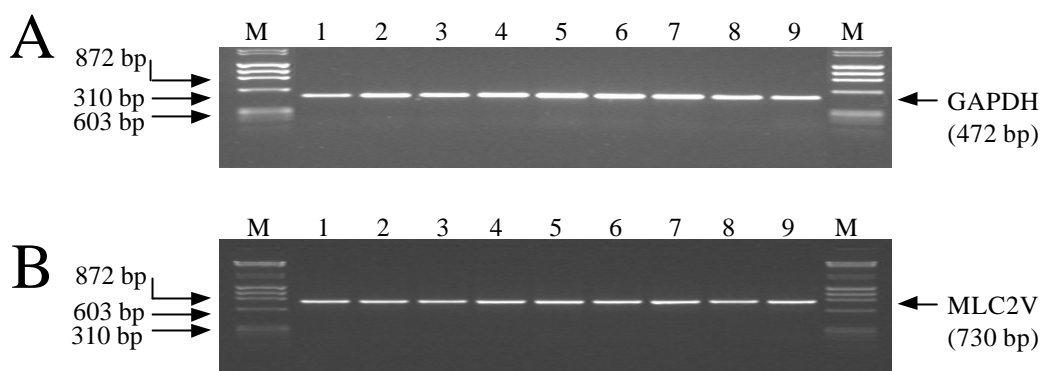


Abb. 3-5 Semiquantitative RT-PCR der KHK-Proben

Aus linksventrikulärem Myokard wurde Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit MLC2V- bzw. GAPDH-spezifischen Primern amplifiziert.

M = DNA-Größenstandard (λ DNA *Hind*III + ϕ X174DNA *Hae*III)

1 – 9 = linksventrikuläres Gewebe von Patienten mit Koronarer Herzkrankheit (KHK)

Bild A: PCR mit GAPDH-spezifischen Primern; *Bild B*: PCR mit MLC2V-spezifischen Primern

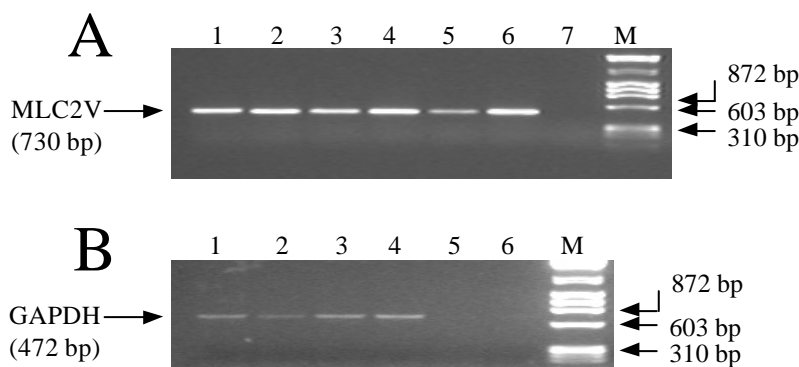


Abb. 3-6 Semiquantitative RT-PCR der Kontrollproben

Aus linksventrikulärem Myokard wurde Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit MLC2V- bzw. GAPDH-spezifischen Primern amplifiziert.

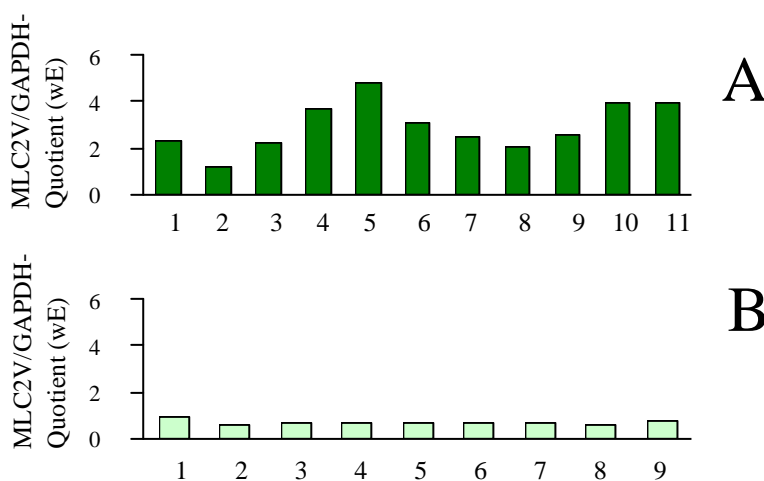
M = DNA-Größenstandard (λ DNA *Hind*III + ϕ X174DNA *Hae*III)

1 – 6 = Kontrollgewebe mit normaler linksventrikulärer Funktion

7 = Negativkontrolle (PCR mit H₂O)

Bild A: PCR mit GAPDH-spezifischen Primern; *Bild B*: PCR mit MLC2V-spezifischen Primern

Es läßt sich ein signifikanter Unterschied im Transkriptionsniveau des MLC2V-Gens sowohl zwischen den IDCM- und den Kontrollproben als auch zwischen den IDCM- und KHK-Proben feststellen. Abbildung 3-7 stellt das Verhältnis zwischen MLC2V- und GAPDH-Werten für IDCM, KHK und Kontrollen dar. Die individuellen MLC2V/GAPDH-Werte bei Patienten mit IDCM ($2,95 \pm 0,32$) waren im Vergleich zu Patienten mit KHK ($0,69 \pm 0,03$) und zu den Kontrollen mit normaler Herzfunktion ($0,28 \pm 0,08$) deutlich höher. Die MLC2V-mRNA-Konzentration in den untersuchten IDCM-Geweben war somit im Mittel 4,3-fach beziehungsweise 9,8-fach höher als in den KHK- bzw. Kontrollgeweben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-8 zusammengefaßt.



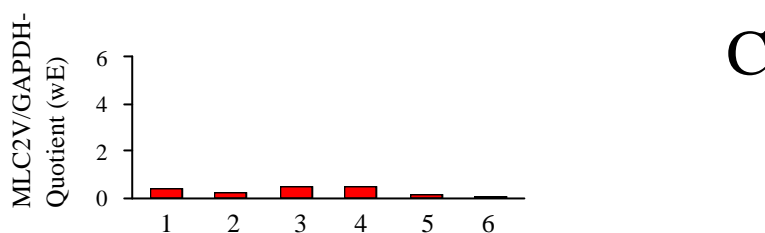


Abb. 3-7 Vergleich der individuellen MLC2V/GAPDH-Verhältnisse in Myokardgewebeproben

Aus linksventrikulärem Myokard wurde Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit MLC2V- bzw. GAPDH-spezifischen Primern amplifiziert. Es wurden die videodensitometrischen Werte der MLC2V-Banden in einem Agarosegel im Verhältnis zu den GAPDH-Banden ermittelt.

Bild A: 1 – 11 = IDCM

Bild B: 1 – 9 = KHK

Bild C: 1 – 6 = Kontrollen

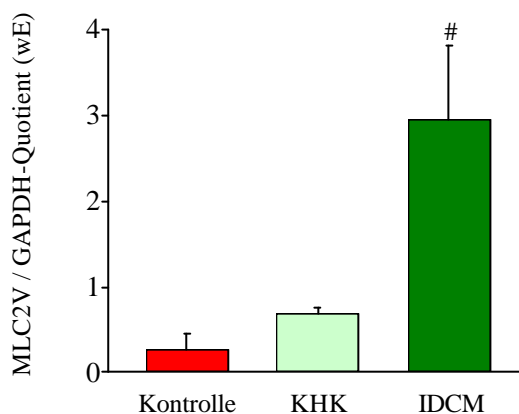


Abb. 3-8 Zusammenfassung der mittels RT-PCR ermittelten MLC2V-mRNA-Expression in explantiertem Myokardgewebe

Gesamt-RNA von Patienten mit IDCM (n = 11), KHK (n = 9) und Kontrollen (n = 6) wurde aus linksventrikulärem Gewebe isoliert. Nach der Reversen Transkription wurde die cDNA durch kompetitive PCR equilibriert und mit MLC2V- bzw. GAPDH-spezifischen Primern amplifiziert. Das MLC2V/GAPDH-Verhältnis wurde videodensitometrisch ermittelt und repräsentiert den Status der MLC2V-mRNA-Expression im linksventrikulären Myokard. Gezeigt ist der Mittelwert aller individuellen Proben (s. Abb. 3-7) der jeweiligen Gruppe.

Statistisch wurde ein multipler t-Test mit α -Korrektur ($P < 0,01$ im Vergleich zu den Kontrollen und $< 0,01$ im Vergleich zu KHK) durchgeführt.

3.1.4. Quantifizierung der cDNA-Proben mittels Echtzeit-PCR (real time PCR)

Die Konzentration der MLC2V-mRNA wurde zusätzlich an 10 IDCM-Proben, 8 KHK-Proben und 5 Kontrollproben mittels Echtzeit-PCR untersucht. Mit dieser Methode kann die Transkriptionsrate des gewünschten Gens in einer Probe aus nur wenigen Zyklen innerhalb der exponentiellen Phase der PCR gewonnen werden. Es wurde mit einem Light Cycler Instrument der Firma Roche und der zugehörigen Software gearbeitet. Als Analysemodus

wurde die Methode der maximalen zweiten Ableitung (*Second Derivative Maximum*) gewählt, zur Berechnung der Konzentration diente eine definierte Standardkurve mit bekannten Mengen eingesetzter Plasmid-DNA (s. Abb. 3-9). Die Linearität der Standardkurve ($r = 1,00$) zeigte dabei die Vergleichbarkeit der PCR-Effizienz der Proben an. Neben der MLC2V-spezifischen PCR wurde wiederum eine Amplifikation des GAPDH-Gens durchgeführt und die Transkription des MLC2V-Gens relativ zur GAPDH-Transkription ermittelt.

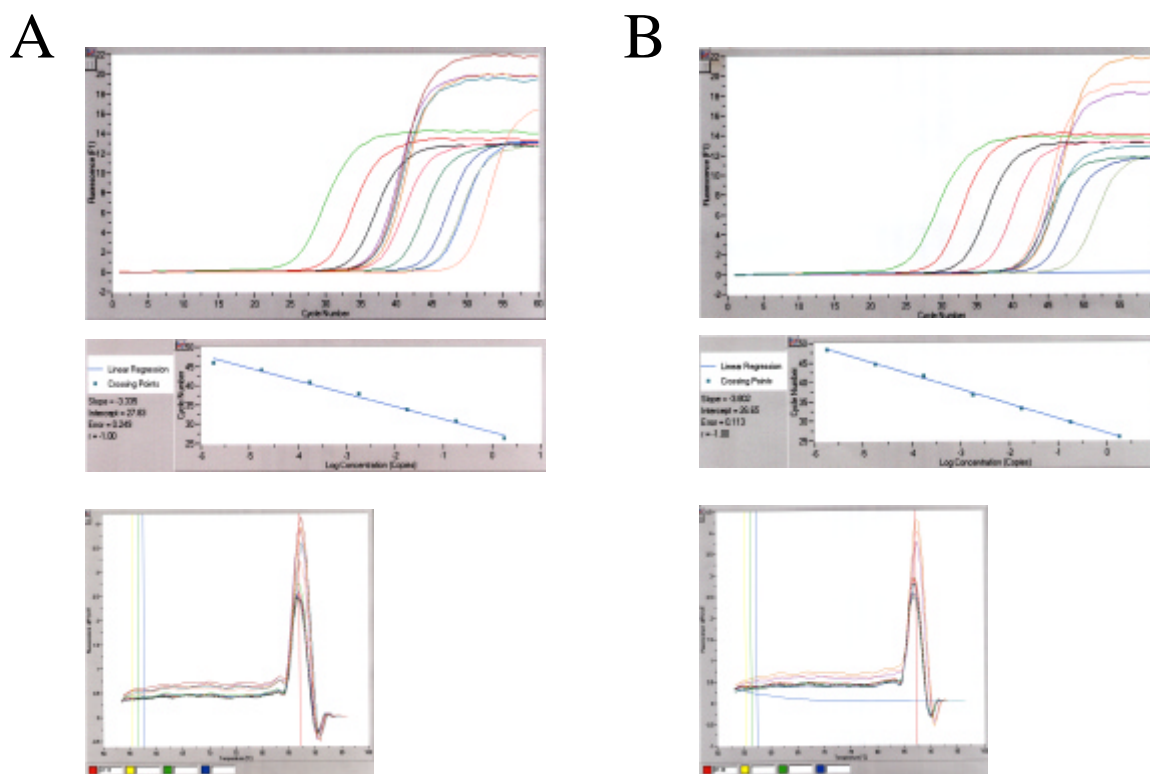


Abb. 3-9 MLC2V-Echtzeit-PCR von Gewebeproben aus explantiertem Myokard

Es wurde Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit MLC2V-spezifischen Primern amplifiziert. *Bild A*: PCR-Verlaufskurven (oben), Standardkurve (mitte) und Schmelzkurven (unten) am Beispiel von 5 IDC-M-Proben

Bild B: PCR-Verlaufskurven (oben), Standardkurve (mitte) und Schmelzkurven (unten) am Beispiel von 4 Kontrollproben

Für die Standardkurve diente eine Verdünnungsreihe eines klonierten MLC2V-Produktes von 5×10^{-1} bis $5 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\mu\text{l}$; die Linearität der Kurve demonstriert dabei, daß die PCR-Effizienz der Proben über den analysierten Bereich miteinander vergleichbar ist; die Schmelzkurven zeigen die Spezifität des Amplifikats an.

Der unterschiedliche Transkriptionsspiegel des MLC2V-Gens ist in Abbildung 3-10 am Verhältnis der ermittelten MLC2V-Werte zu den GAPDH-Werten dargestellt. Die individuellen MLC2V/GAPDH-Werte liegen dabei bei Patienten mit IDC ($4,53 \pm 1,37$) im Vergleich zu den KHK-Patienten ($1,81 \pm 0,9$) und zu den Kontrollen mit normaler Herzfunktion ($0,82 \pm 0,21$) signifikant höher (Abb. 3-11).

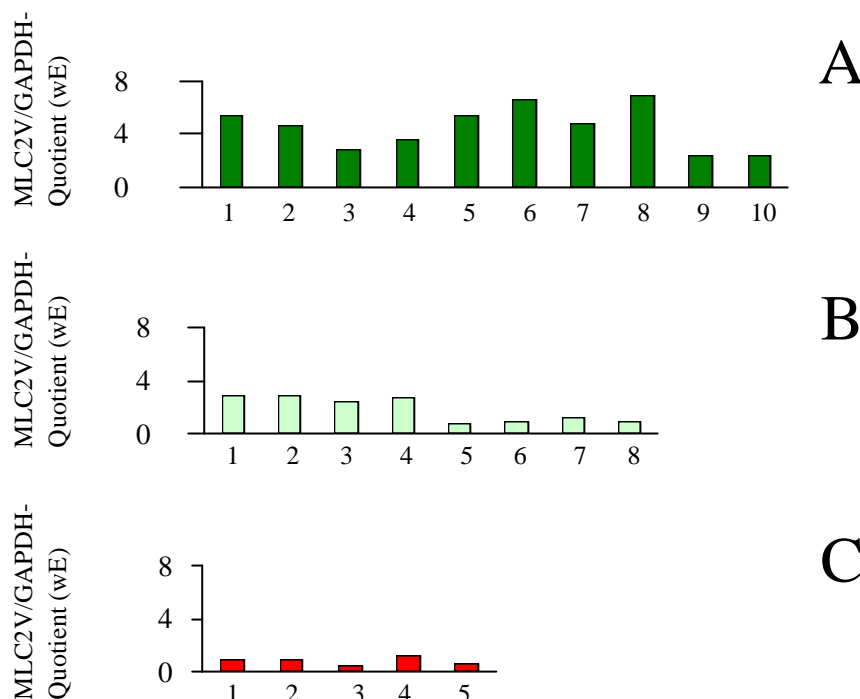


Abb. 3-10 Vergleich der individuellen MLC2V/GAPDH-Verhältnisse in Myokardgewebe

Aus linksventrikulärem Myokard wurde Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit MLC2V- bzw. GAPDH-spezifischen Primern amplifiziert.

Bild A: 1 – 10 = IDCM

Bild B: 1 – 8 = KHK

Bild C: 1 – 5 = Kontrollen

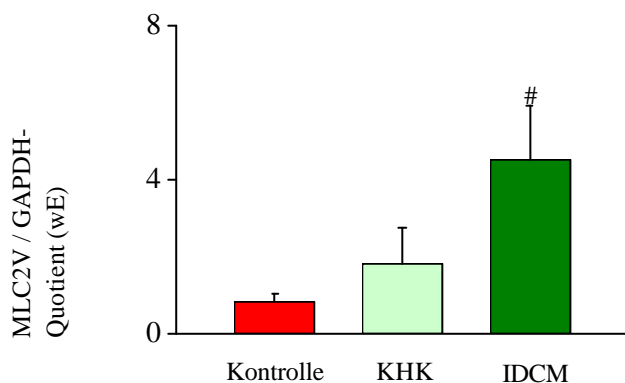


Abb. 3-11 Zusammenfassung der mittels Echtzeit-PCR ermittelten MLC2V-mRNA-Expression in explantiertem Gewebe

Gesamt-RNA von Patienten mit IDCM (n = 10), KHK (n = 8) und Kontrollen (n = 5) wurde aus linksventrikulärem Myokardgewebe isoliert. Nach der Reversen Transkription wurde die cDNA durch kompetitive PCR equilibriert und mit MLC2V- bzw. GAPDH-spezifischen Primern mittels Echtzeit-PCR amplifiziert. Die Probenkonzentrationen wurden über den Analysemodus „Second Derivative Maximum“ und einen externen Standard (Eichkurve) berechnet und das MLC2V/GAPDH-Verhältnis als Mittelwert aller individueller Proben (s. Abb. 3-10) der jeweiligen Gruppe dargestellt.

Statistisch wurde ein multipler t-Test mit α Korrektur ($P < 0,01$ im Vergleich zu den Kontrollen und $< 0,01$ im Vergleich zu KHK) durchgeführt.

3.1.5. Quantifizierung der cDNA-Proben mittels MLC2V/MLC1V-Duplex-RT-PCR

Der weiteren Analyse der MLC2V-mRNA-Konzentration im Falle einer IDCM diene die Bestimmung des Verhältnisses zwischen dem Expressionsgrad der MLC1V und MLC2V. Dieses Verhältnis ist im gesunden Herzen als nahezu gleich (1:1) beschrieben (109). Durch die Amplifizierung der equilibrierten cDNA mit MLC1V- und MLC2V-spezifischen Primern in einem Ansatz und nachfolgende videodensitometrische Messungen wurde dieses Verhältnis in 14 IDCM-, 9 KHK- und 6 Kontrollproben bestimmt (Abb. 3-12).

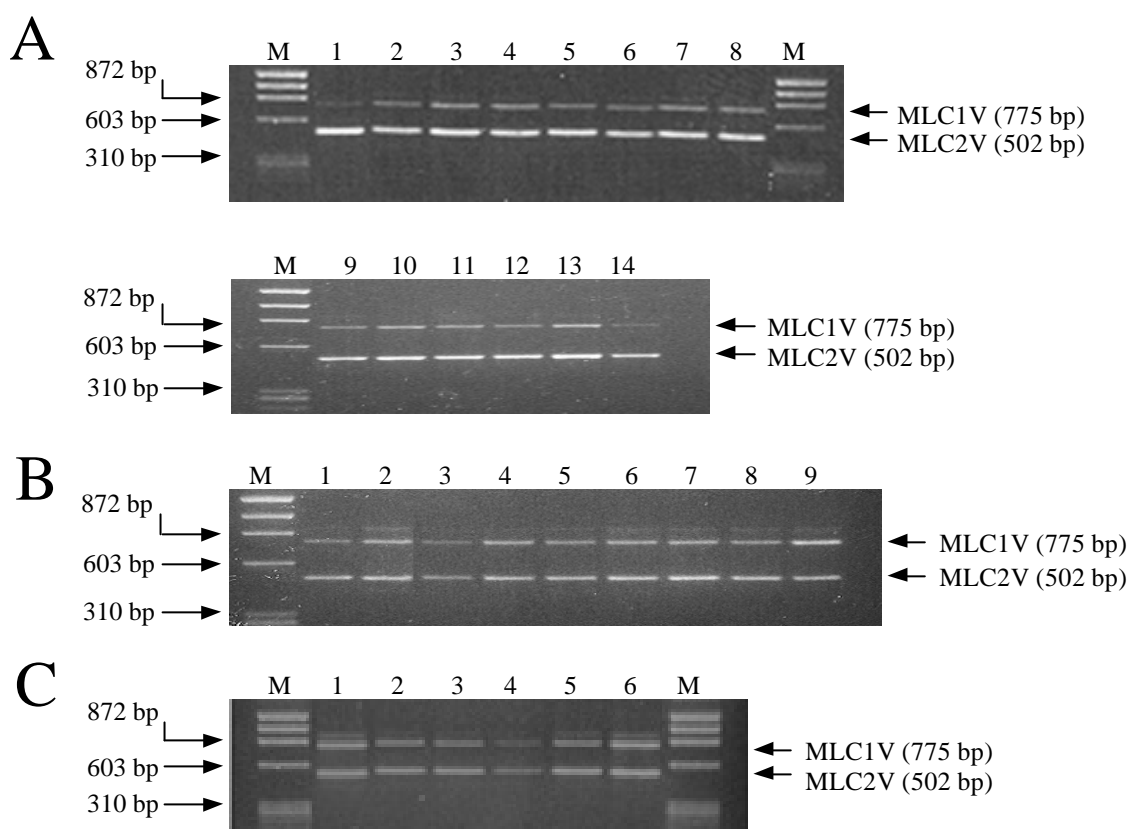


Abb. 3-12 MLC1V/MLC2V-Duplex-RT-PCR von Myokardgewebeproben

Aus linksventrikulärem Myokard wurde Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit MLC2V- bzw. MLC1V-spezifischen Primern in einem Ansatz amplifiziert.

M = DNA-Größenstandard (λ DNA *Hind*III + ϕ X174DNA *Hae*III)

Bild A: 1 – 14 = linksventrikuläres Gewebe von Patienten mit idiopathischer DCM

Bild B: 1 – 9 = linksventrikuläres Gewebe von Patienten mit KHK

Bild C: 1 – 6 = Kontrollgewebe mit normaler linksventrikulärer Funktion

(1,5%-iges Agarosegel)

Wie in Abbildung 3-13 dargestellt, liegen die individuellen MLC2V/MLC1V-Werte bei Patienten mit IDCM signifikant höher. Es ließ sich ein durchschnittliches Verhältnis von 2,8 (\pm 0,72):1 in den IDCM-Proben, von 1,14 (\pm 0,31):1 in den KHK-Proben und von 1,25 (\pm 0,28):1 in den Kontrollproben zugunsten von MLC2V ermitteln. Dies zeigt eine 2,5-fache

Verschiebung des Expressionsverhältnisses der leichten Myosinketten zueinander in den IDCM-Proben im Vergleich zu KHK beziehungsweise eine 2,25-fache Verschiebung im Vergleich zu den Kontrollen und damit eine signifikante Veränderung der MLC2V-Expression bei IDCM (Zusammenfassung in Abbildung 3-14).

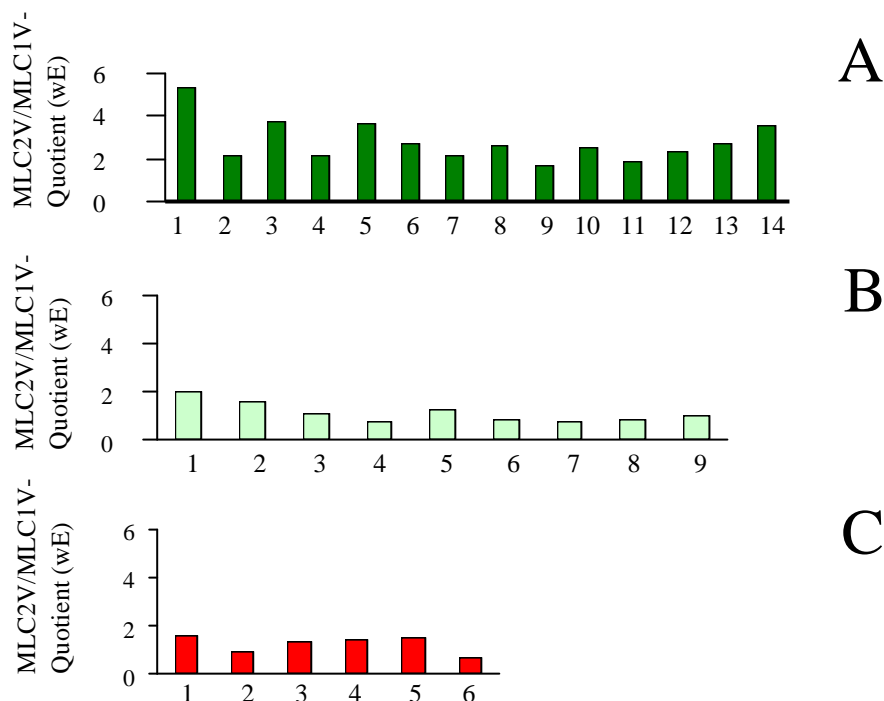


Abb. 3-13 Vergleich der individuellen MLC2V/MLC1V-Verhältnisse in Myokardgewebe

Aus linksventrikulärem Myokard wurde Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit MLC2V- bzw. MLC1V-spezifischen Primern amplifiziert. Es wurden die videodensitometrischen Werte der MLC2V-Banden in einem Agarosegel im Verhältnis zu den MLC1V-Banden ermittelt.

Bild A: 1 – 14 = IDCM

Bild B: 1 – 9 = KHK

Bild C: 1 – 6 = Kontrollen

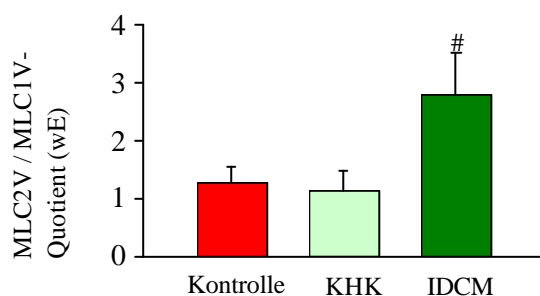


Abb. 3-14 Zusammenfassung des Expressionsverhältnisses von MLC1V zu MLC2V in explantiertem Gewebe

Gesamt-RNA von Patienten mit IDCM (n = 14), KHK (n = 9) und Kontrollen (n = 6) wurde aus linksventrikulärem Gewebe isoliert. Nach der Reversen Transkription wurde die cDNA durch kompetitive PCR equilibriert und mit MLC2V- und MLC1V-spezifischen Primern in einem Ansatz amplifiziert. Das MLC2V/MLC1V-Verhältnis wurde videodensitometrisch ermittelt und repräsentiert den Status der MLC2V-mRNA-Expression im Verhältnis zur MLC1V-mRNA-Expression im linksventrikulären Myokard. Gezeigt ist der Mittelwert aller individuellen Proben (s. Abb. 3-13) der jeweiligen Gruppe.

Statistisch wurde ein multipler t-Test mit α -Korrektur ($P < 0,01$ im Vergleich zu den Kontrollen und $< 0,01$ im Vergleich zu KHK) durchgeführt.

3.1.6. Verifizierung der erhöhten Transkription des MLC2V-Gens im Myokard

3.1.6.1. Quantifizierung von RNA-Proben mittels Northernblot

Um die bisher ermittelten Daten weiter zu untermauern, wurde die MLC2V-Transkription zusätzlich direkt auf RNA-Ebene untersucht. Aus linksventrikulärem Myokardgewebe von drei IDCM-Patienten und drei Kontrollen wurde die Gesamt-RNA isoliert und je 5 µg auf einem MOPS-Gel aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mit einer $\alpha^{32}\text{P}$ -markierten, für das MLC2V-Gen spezifischen DNA-Sonde (205 bp) hybridisiert. Die Intensität des Hybridisierungssignals ist dabei von der Menge vorhandener MLC2V-mRNA in der jeweiligen Probe abhängig und kann nach Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm durch videodensitometrische Auswertung ermittelt werden. Die Auftrennung der RNA sowie der Röntgenfilm sind in Abbildung 3-15 gezeigt.

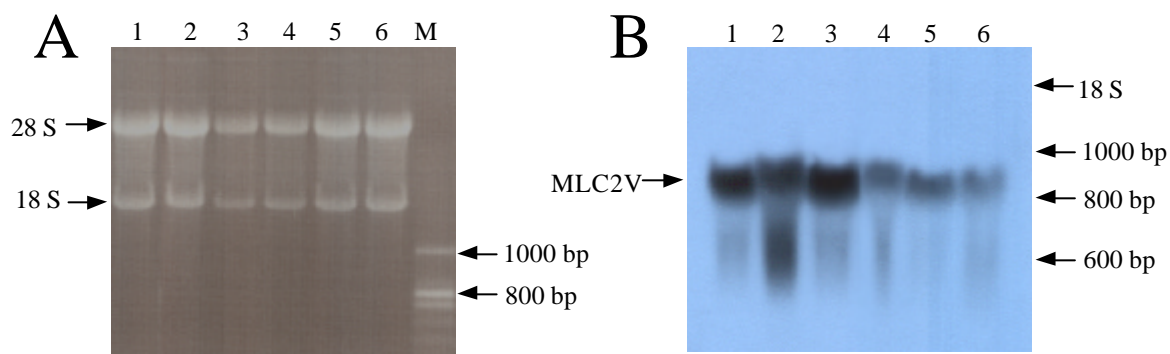


Abb. 3-15 RNA-Gel und Northernblot-Hybridisierung von humanem Myokard

Bild A: Gesamt-RNA nach Auftrennung in einem 1%-igen MOPS-Gel.

1 – 3 = IDCM, 4 – 6 = Kontrollen, M = RNA-Marker (Low Range, Fermentas)

Bild B: Exposition des Filters (nach Hybridisierung mit einer MLC2V-spezifischen Sonde) auf einem Röntgenfilm (Expositionszeit 48 h).

1 – 3 = IDCM, 4 – 6 = Kontrollen

Die Menge der detektierten MLC2V-mRNA war bei den IDCM-Proben ($11,92 \pm 1,14$) um ein 2,1-faches höher als bei den Kontrollen ($5,68 \pm 0,87$), wobei die errechneten Werte das Verhältnis zur eingesetzten Gesamt-RNA-Menge (videodensitometrisch am RNA-Gel ermittelt) widerspiegeln (s. Abb. 3-16).

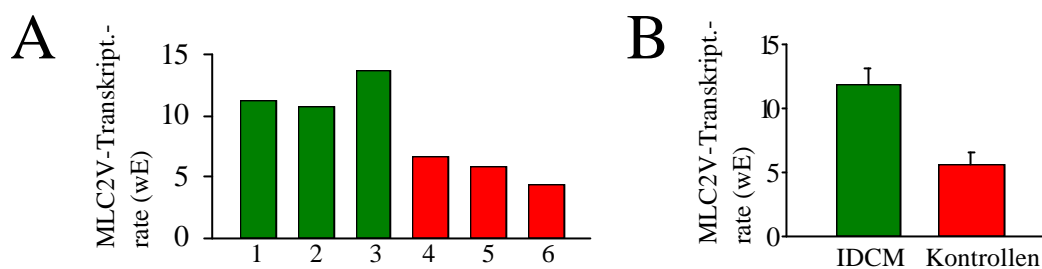


Abb. 3-16 Darstellung der mittels Northernblot bestimmten MLC2V-Transkription in explantiertem Myokard

Gesamt-RNA von Patienten mit IDCM (n = 3) und KHK (n = 3) wurde aus linksventrikulärem Gewebe isoliert, in einem MOPS-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Hybridisierung erfolgte mit einer für die MLC2V-mRNA spezifischen, $\alpha^{32}\text{P}$ -markierten Sonde. Die Signalintensität wurde videodensitometrisch ermittelt und repräsentiert den Transkriptionsspiegel des MLC2V-Gens.

Bild A: Vergleich der individuellen MLC2V-Werte; 1 – 3 = IDCM, 4 – 6 = Kontrollen

Bild B: Zusammenfassung der ermittelten MLC2V-Expressionen (Darstellung der Mittelwerte).

3.1.6.2. Quantifizierung von mRNA-Proben mittels Microarray Analyse

Für zwei IDCM-Proben sowie eine Kontrollprobe wurden jeweils 600 ng mRNA aus Myokardgewebe gewonnen und für alle weiteren Arbeitsschritte (cDNA-Synthese, Bindung eines Fluoreszenzfarbstoffes, Hybridisierung auf einem Unigem V Chip) der kommerziell verfügbare Service der Firma Genomsystems Inc. (St. Louis, MO, USA) genutzt. An die Glasoberfläche des Chips sind 7075 Sequenzen bekannter Gene bzw. ESTs (500 – 5000 bp, größtenteils Myokard-spezifisch) kovalent gebunden, was etwa 7 % des menschlichen Genoms entspricht. Die Sensitivität des Arrays liegt bei einer Detektion von 1×10^{-12} g RNA (1 Kopie in 100.000 Kopien). Die Normalisierung der mRNA-Proben (RNA-Quantität, RT-Effizienz, Hybridisierungseffizienz, Detektionssensitivität, Hintergrundfluoreszenz) durch interne Kontrollen sowie die Berechnung einer balancierten Expression erfolgte seitens Genomsystems Inc. (GEMTools 2.4 Image Analysis Software). Durch die Markierung der cDNAs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen konnten eine IDCM-Probe (Cy3-markiert) und eine Kontrollprobe (Cy5-markiert) auf einem Chip kohybridisiert werden (Abb. 3-17). Die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Farbe ist dabei proportional zur RNA-Menge in der Probe. Eine Transkriptionsrate mit einem balancierten Faktor von ≥ 2 bzw. ≤ -2 wurde als signifikant erhöht bzw. vermindert angesehen.

Bei den untersuchten Proben handelte es sich um Gewebe von zwei männlichen IDCM-Patienten (52 bzw. 55 Jahre), welche mit dem gleichen männlichen gesunden Spender (53 Jahre) verglichen wurden. Für das MLC2V-Gen wurde im Falle einer IDCM im Vergleich zum Kontrollgewebe eine erhöhte Transkriptionsrate von 2,8 (3,7 Chip 1 bzw. 1,8 Chip 2) gefunden.

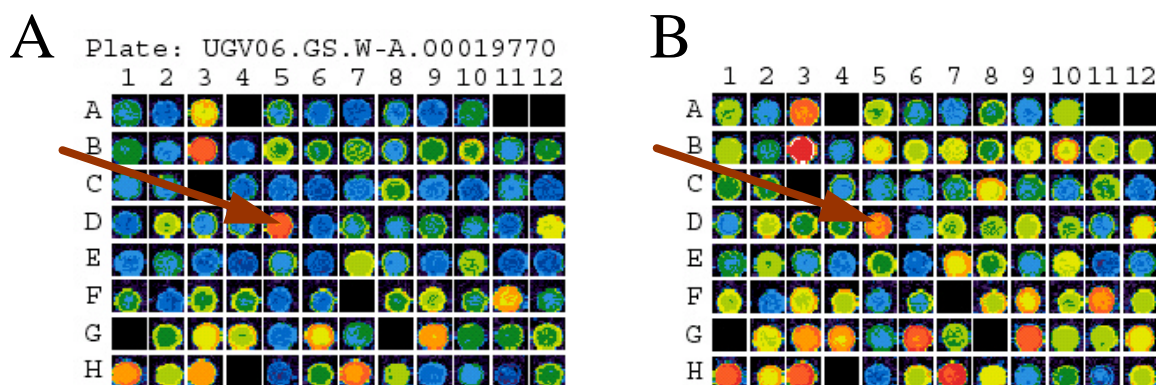


Abb. 3-17 Microchip-Array von Myokardgewebeproben (Ausschnitt)

Rohdaten (Fluoreszenzaktivität) der Kohybridisierung von IDCM-cDNA (Bild A; Cy3) und Kontroll-cDNA (Bild B; Cy5) auf einem Unigem V Microchip.
MLC2V = Position D5

3.1.7. Quantifizierung von RNA-Proben aus dem Rattenmyokard mittels Northernblot

Zur weiteren Validierung des erhöhten MLC2V-mRNA-Spiegels bei der IDCM in Abgrenzung von der KHK wurde die Transkriptionsrate des MLC2V-Gens am Tiermodell (männliche Lewis-Ratten, IVTK Jena) bestimmt. Dazu wurde an fünf Ratten ein künstlicher Herzinfarkt, welcher eine Manifestationsform der KHK ist, herbeigeführt. Neben diesen Tieren dienten elf nicht infarzierte Tiere als Kontrollen. Analog zu den humanen Gewebeproben wurde die Gesamt-RNA isoliert und es wurden 5 µg je Probe auf einem MOPS-Gel aufgetrennt (s. Abb. 3-18) und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Hybridisierung erfolgte mit einer $\alpha^{32}\text{P}$ -markierten, für das MLC2V-Gen der Ratte spezifischen DNA-Sonde. Die Menge der transkribierten MLC2V-mRNA wurde nach Exposition auf einem Röntgenfilm (s. Abb. 3-18) videodensitometrisch erfaßt.

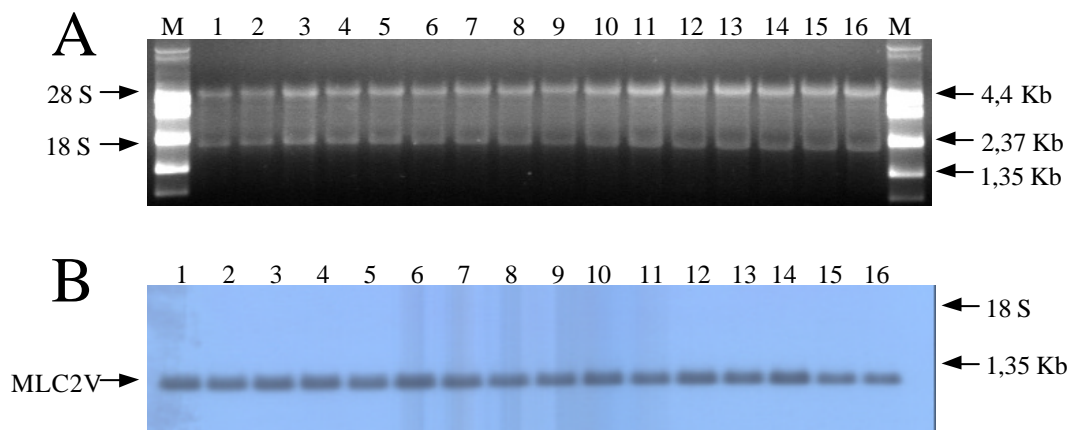


Abb. 3-18 RNA-Gel und Northernblot-Hybridisierung von RNA aus Myokardgewebe der Ratte

Bild A: Gesamt-RNA nach Auftrennung in einem 1%-igen MOPS-Gel.

1 – 11 = Kontrolltiere, 12 – 16 = Infarkttiere, M = RNA-Längenmarker (0,24 - 9,5 Kb RNA Leiter, Invitrogen)

Bild B: Exposition des Filters (nach Hybridisierung mit einer MLC2V-spezifischen Sonde) auf einem Röntgenfilm (Expositionszeit 24 h).

1 – 11 = Kontrolltiere, 12 – 16 = Infarkttiere

Der Abgleich der detektierten MLC2V-mRNA-Mengen mit der eingesetzten Gesamt-RNA-Menge (videodensitometrisch am RNA-Gel ermittelt) ergab bei den infarzierten Tieren einen Wert von $5,31 \pm 0,49$ und bei den Kontrollen einen Wert von $5,28 \pm 0,72$ (s. Abb. 3-19). Dies schließt einen Unterschied in der MLC2V-Expression im infarzierten Herzen der Ratte im Vergleich zum gesunden Kontrolltier aus.

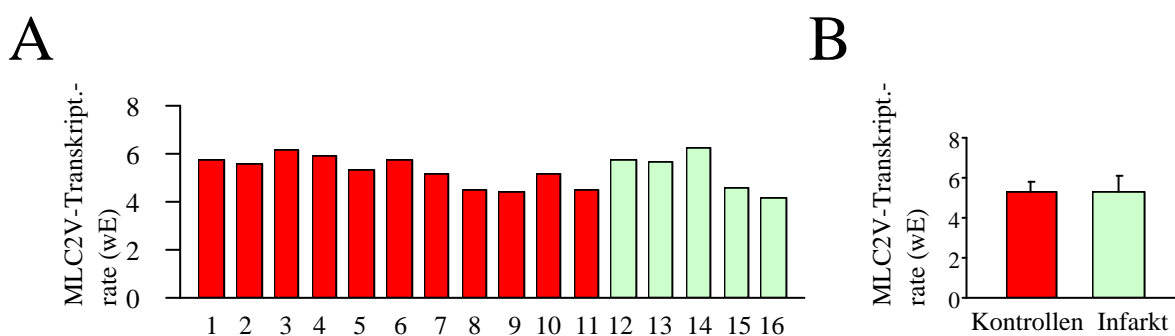


Abb. 3-19 Darstellung der mittels Northernblot bestimmten MLC2V-Transkription im Myokard der Ratte

Gesamt-RNA von Ratten mit ($n = 5$) und ohne Infarkt ($n = 11$) wurde aus linksventrikulärem Gewebe isoliert, in einem MOPS-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Hybridisierung erfolgte mit einer für die MLC2V-mRNA der Ratte spezifischen, $\alpha^{32}\text{P}$ -markierten Sonde. Die Signalintensität wurde videodensitometrisch ermittelt und repräsentiert den Transkriptionsspiegel des MLC2V-Gens der Ratte.

Bild A: Vergleich der individuellen MLC2V-Werte. 1 – 11 = Kontrollen, 12 – 16 = Infarkt

Bild B: Zusammenfassung der ermittelten MLC2V-Expressionen (Darstellung der Mittelwerte).

3.1.8. Zusammenfassung der quantitativen Untersuchungen auf mRNA-Ebene

Die Transkriptionsrate des MLC2V-Gens im gesunden wie im kranken Myokard wurde durch semiquantitative RT-PCR, Duplex-RT-PCR, Echtzeit-PCR, Northernblot sowie Microarray Analyse untersucht. Dabei zeigte sich mit den angewandten Methoden ein signifikanter Unterschied sowohl zwischen den IDCM- und den Kontrollproben als auch zwischen den IDCM- und KHK-Proben (Abb. 3-20). Als signifikant wurde eine Erhöhung der Transkriptionsrate um einen Faktor von >2 angesehen. Wie in Tabelle 3-I gezeigt, lagen die Transkriptionsraten in den IDCM-Proben jeweils um mindestens ein 2-faches höher als in den KHK- bzw. Kontrollproben.

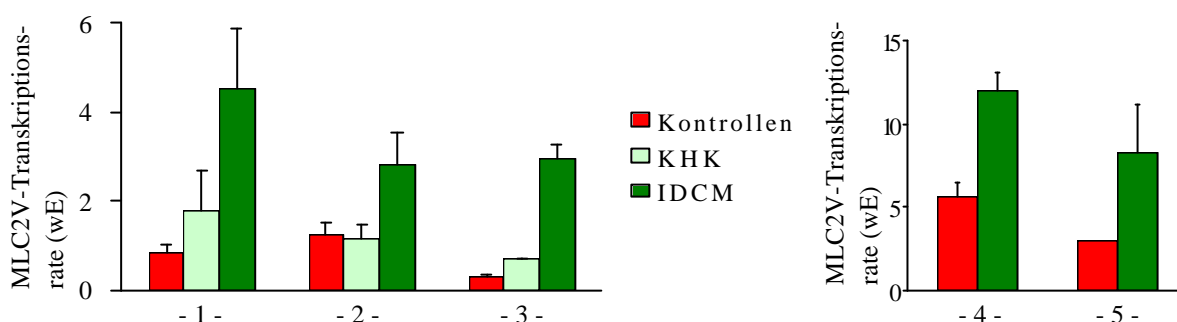


Abb. 3-20 Zusammenfassung der quantitativen Untersuchungen auf mRNA-Ebene

Nach Reverser Transkription wurde die cDNA equilibriert und mittels Echtzeit-PCR (1), Duplex-RT-PCR (2), semiquantitativer PCR (3), Northernblot (4) und Microarray Analyse (5) auf den Grad der MLC2V-Transkription hin untersucht.

	IDCM/KHK	IDCM/Kontrolle
Semiquantitative RT-PCR	4,3	9,8
Duplex-RT-PCR	2,5	2,3
Echtzeit-PCR	2,5	5,5
Northernblot	---	2,1
Microarray Analyse	---	2,8

Tabelle 3-I Zusammenfassung der quantitativen Untersuchungen auf mRNA-Ebene

Mehrfaches der Expression von MLC2V in den IDCM-Proben im Verhältnis zur KHK (IDCM/KHK) beziehungsweise zu den Kontrollen (IDCM/Kontrolle).

3.2. Suche nach Mutationen in den Genen der leichten Myosinketten

3.2.1. Suche nach Veränderungen in der DNA-Sequenz mittels Didesoxy-Fingerprinting

Für die Suche nach Mutationen im Gen der MLC2V wurde die Methode des Didesoxy-Fingerprinting (ddF) an Proben von 20 Patienten mit IDCM sowie an 10 Kontrollpersonen angewandt. Dafür wurde genomische DNA aus dem peripheren Blut isoliert und anschließend wurden die sieben Exons des MLC2V-Gens einzeln einschließlich ihrer Exon/Intron-Grenzen amplifiziert. Die Sequenzierung erfolgte unter Zugabe eines didesoxy-Thymidintriphosphats (ddTTP) zum Nukleotidgemisch, wodurch ein Kettenabbruch stets dann erfolgt, wenn ein entsprechendes Thymidin in den Synthesestrang eingebaut wird. Das sich ergebende Verteilungsmuster des Thymidins in der DNA-Sequenz kann als genetischer Fingerabdruck angesehen werden. Durch die Auftrennung der Proben in einem nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel und die nachfolgende Sichtbarmachung auf einem Röntgenfilm können potentielle Mutationen durch eine Verschiebung des Bandenmusters erkannt werden.

Von den sieben Exons der MLC2V ließ sich in Exon drei in 7 von 20 IDCM-Proben sowie in 1 von 10 Kontrollproben eine abweichende Bandenmigration erkennen, welche sich teils heterozygot, teils homozygot darstellt (Abb. 3-21).

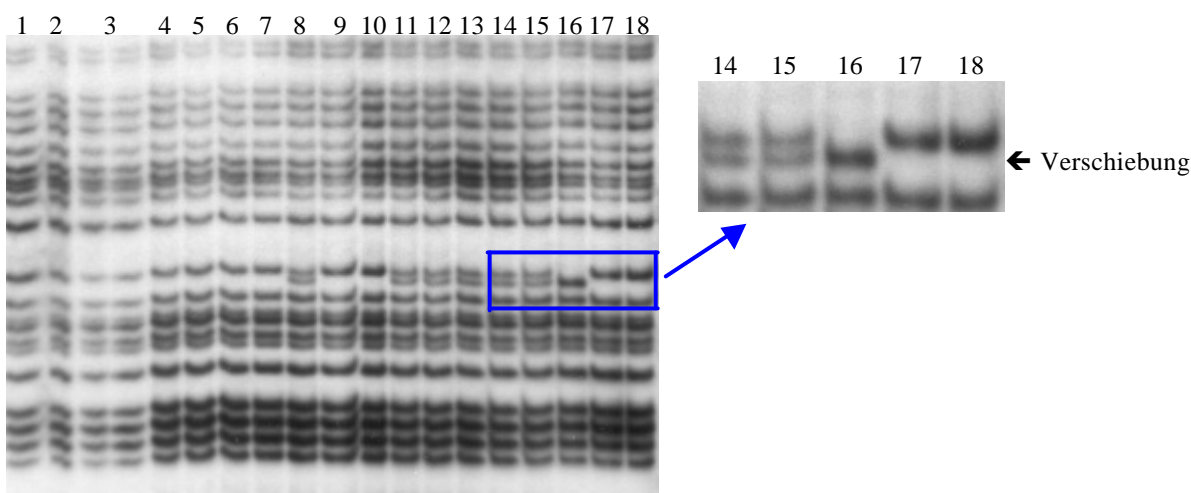


Abb. 3-21 Sequenzausschnitt des MLC2V-Gens mittels Didesoxy-Fingerprinting am Beispiel der IDCM-Proben

Exon 3 der MLC2V wurde mit einem biotinylierten Rückwärts-Primer und ddTTP amplifiziert und nach der elektrophoretischen Auftrennung mittels Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm detektiert (Expositionszeit 15 min).

1 – 7, 9 – 10, 17 – 18 = normale Migration; 8, 11 – 15 = anormale Migration (heterozygot), 16 = anormale Migration (homozygot)

3.2.2. Suche nach Veränderungen in der DNA-Sequenz mittels Sequenzierung

Da die Methode des Dideoxy-Fingerprinting im Erkennen von bestimmten Substitutionen limitiert ist, wurden alle Exons des MLC2V-Gens zusätzlich mit einem Kapillarsequenzierer aufgetrennt und analysiert. Gleichzeitig wurde die Zahl der Proben auf 54 IDCM- und 53 Kontrollproben erhöht. Die Proben mit abweichenden Bandenmustern in der ddF-Elektrophorese wurden zur Kontrolle in beide Richtungen sequenziert. Zusätzlich wurde die potentielle Promotorregion sowie der 5'-untranslatierte und der 3'-untranslatierte Bereich in die Analyse eingeschlossen. Des weiteren wurden die sieben Exons des MLC1V-Gens einschließlich ihrer Exon/Intron-Grenzen sowie ihrer 5'- und 3'-untranslatierten Regionen (UTR) und die Bindungsregionen der leichten Myosinketten in der kardialen schweren Myosinkette (β -MHC) analysiert. Zunächst wurden alle Bereiche mit dem Vorwärts-Primer (sense) sequenziert. Die erhaltenen Daten wurden durch einen Sequenzabgleich mit der NCBI-Datenbank (BLAST-Programm) ausgewertet. Nicht übereinstimmende Sequenzen wurden sowohl vorwärts als auch rückwärts (antisense) mehrfach sequenziert, um methodische Artefakte auszuschließen. Tabelle 3-II gibt einen Überblick über Lage und Art der gefundenen Genotypveränderungen.

	MLC1V	MLC2V	β -MHC
5'UTR / Promotorregion	k.V.	k.V.	-
Exon 1	C69T	k.V.	-
Exon 2	k.V.	k.V.	-
Exon 3	k.V.	T132C	-
Exon 4	k.V.	k.V.	-
Exon 5	C490A	k.V.	-
Exon 6	k.V.	k.V.	-
Exon 7 + 3'UTR	G676A	T507C	-
MLC1V-Bindungsregion	-	-	k.V.
MLC2V-Bindungsregion	-	-	k.V.

Tabelle 3-II Zusammenfassung der gefundenen Genotypveränderungen in den untersuchten Genen

Die Angaben zu den Genotypveränderungen stellen die Substitution des ursprünglichen Nukleotids (Wildtyp, li) durch ein neues Nukleotid (Mutation, re) dar; die Zahl dazwischen zeigt an, an welcher Stelle in der Nukleotidsequenz der mRNA (ab Startkodon stromabwärts gelesen) die Sequenzveränderung im jeweiligen Gen zu finden ist. k.V. = keine Veränderung, d. h. in diesen Bereichen wurden keine Abweichungen von der Datenbank-Sequenz gefunden.

Im Gen der MLC1V fand sich in Exon eins in 2 von 54 IDCM-Proben eine C→T-Substitution (C69T), welche keinen Aminosäureaustausch bewirkt (stille Mutation), in Exon fünf fand sich in 1 von 54 IDCM-Proben eine C→A-Substitution (C490A), welche einen Aminosäureaustausch von Leucin zu Methionin und damit ein fehlerhaftes Protein (*missense* Mutation)

nach sich zieht sowie in der 3'-untranslatierten Region (88 Nukleotide nach dem Stopkodon) in 10 von 54 IDCM-Proben und 9 von 53 Kontrollproben eine G→A-Substitution (G679A). Im Gen der MLC2V waren in Exon drei sowie in der 3'-untranslatierten Region jeweils eine T→C-Substitution zu finden. Die stille Mutation T132C kam in Exon drei in 10 von 54 IDCM-Proben und in 4 von 53 Kontrollproben vor. In der 3'-UTR fand sich der Austausch in 1 von 54 IDCM-Proben 9 Nukleotide nach dem Stopkodon (T507C). Die Veränderungen im kodierenden Bereich beider Gene sind in Tabelle 3-III und Abbildung 3-22 dargestellt.

Gen/Exon	Genotyp	Kodon-Sequenz	Aminosäure
MLC1V/1	Wildtyp	CCC	Prolin
	C69T	CCT	Prolin
MLC1V/5	Wildtyp	CTG	Leucin
	C490A	ATG	Methionin
MLC2V/3	Wildtyp	ATT	Isoleucin
	T132C	ATC	Isoleucin

Tabelle 3-III Lage der Genotypveränderungen im kodierenden Bereich der MLC1V- und MLC2V-Gene

In Exon 1 der MLC1V und Exon 3 der MLC2V führt die Nukleotidsubstitution in der 3. Position des Triplets zu keinem Aminosäureaustausch. In Exon 5 der MLC1V zieht der Austausch der 1. Position im Triplet den Wechsel von Leucin zu Methionin nach sich.

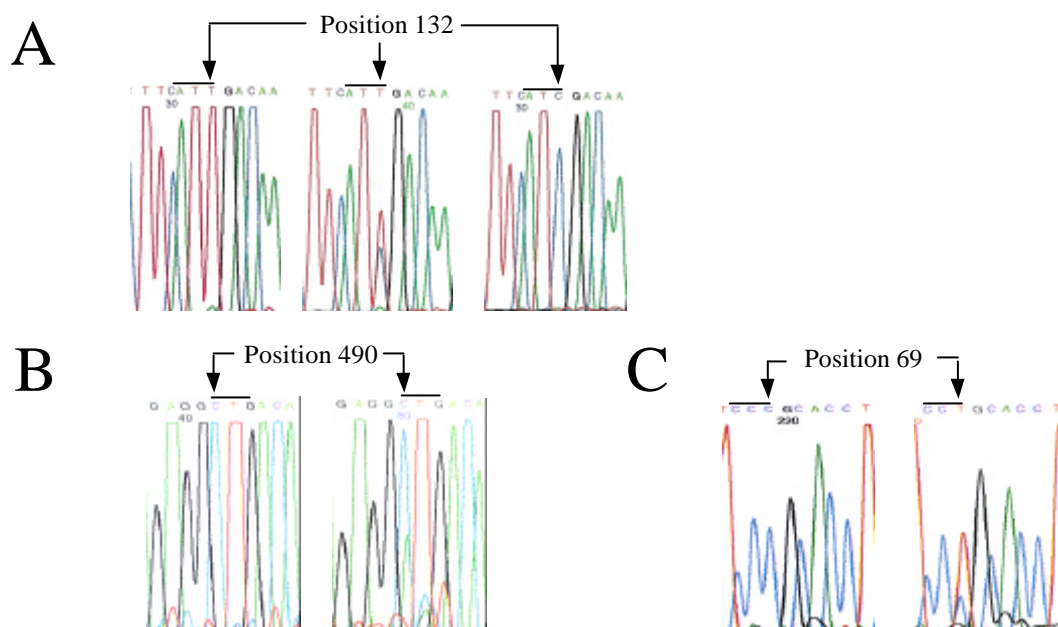


Abb. 3-22 Sequenzausschnitte der leichten Myosinketten nach Sequenzierung mit dem ABI PRISM 310-Kapillarsequenzierer

Bild A: C→T-Substitution in Exon 3 der MLC2V (li = Wildtyp, mitte = Mutation, heterozygot, re = Mutation, homozygot)

Bild B: C→A-Substitution in Exon 5 der MLC1V (li = Wildtyp, re = Mutation, heterozygot)

Bild C: C→T-Substitution in Exon 1 der MLC1V (li = Wildtyp, re = Mutation, heterozygot)

Im 5'-untranslatierten Bereich sowie in der potentiellen Promotorregion waren bei keiner der leichten Myosinketten Veränderungen der DNA zu finden. Ebenso wiesen die Exons 19 und 20 der schweren Myosinkette, welche die Bindungsregionen des MLC1V-Proteins (Exon 19) und des MLC2V-Proteins (Exon 20) kodieren, keine Veränderungen auf Nukleotidebene auf.

3.2.3. Untersuchung des T132C-Polymorphismus mittels Restriktionsenzymverdau

Zur Überprüfung einer möglichen Markerfunktion wurde der T132C Allelstatus in Exon 3 der MLC2V in einer größeren Population untersucht. Hierzu diente die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease *TaqI*, welche die mutierte Sequenz TCGA, jedoch nicht die Wildtyp-Sequenz TTGA schneidet (Abb. 3-23). Für den Vergleich wurde DNA von 159 IDCM-Patienten, 359 KHK-Patienten und 220 Kontrollindividuen (Tab. 3-IV) herangezogen.

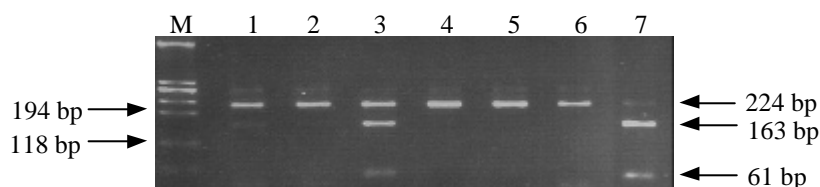


Abb. 3-23 Restriktionsenzymverdau von genomischer DNA aus dem peripheren Blut

Exon 3 der MLC2V wurde amplifiziert, gereinigt, für 1,5 h bei 65 °C mit *TaqI* inkubiert und auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen. Im Falle des T132C-Polymorphismus wurde ein 224 bp großes Produkt in zwei kleinere (163 bp + 61 bp) gespalten.

1, 2, 4, 5, 6 = Wildtyp (T132C-/-)

3 = heterozygote Mutation (T132C-/+)

7 = homozygote Mutation (T132C+/+)

	IDCM	KHK	Kontrollen
Anzahl	159	359	220
Geschlecht, männl. (%)	120 (75,5) [#]	293 (81,6)	132 (60,0)
Alter (a)	51,1±10,5 [†]	61,3±9,1	56,3±9,85
BMI (kg/m ²)	27,6±4,2 [†]	26,9±3,3	27,1±3,7
Raucherdosiss (Packg./a)	9,7±13,1 [†]	14,0±18,5	7,95±12,8
LDL-C (mmol/l)	4,1± 1,0 [†]	4,4±1,3	4,1±1,2
LVEF	45,0±18,9 [†]	63,8±18,8	79,5±8,9

Tabelle 3-IV Charakteristika der Testpersonen für die Genotypisierung

Daten sind als ganze Zahlen (Prozent) bzw. als Mittelwerte (± Standardabweichung) angegeben.

Statistisch wurde ein multipler t-Test (†) bzw. ein Chi-Quadrat-Test (#) durchgeführt. Die einzelnen Parameter zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

BMI = Body Mass Index; LDL-C = Low Density Lipoprotein-Cholesterol; LVEF = linksventrikuläre Ejektionsfraktion

Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 3-V dargestellt. Der T132C^{-/-} Allelstatus ergab in der IDCM-Gruppe (n = 159) eine Häufigkeit von 82 %, 17 % für den T132C^{-/+} Allelstatus und 1 % für den T132C^{+/+} Allelstatus. In der KHK-Gruppe (n = 359) war die Verteilung 86 % bezüglich des T132C^{-/-} Allelstatus, 12 % für den T132C^{-/+} Allelstatus und 2 % für den T132C^{+/+} Allelstatus. Für die Kontrollgruppe (n = 220) ergab sich eine Häufigkeit von 84 % für den T132C^{-/-} Genotyp, 16 % für den T132C^{-/+} Genotyp und 0 % für den T132C^{+/+} Genotyp.

Genotyp	IDCM	KHK	Kontrollen	Gesamt	erwartet
T132C ^{-/-}	131 (0.82)	311 (0.86)	186 (0.84)	628 (0.85)	0.851
T132C ^{-/+}	27 (0.17)	42 (0.12)	34 (0.16)	103 (0.14)	0.140
T132C ^{+/+}	1 (0.01)	6 (0.02)	0 (0.0)	7 (0.01)	0.009
Gesamt	159	359	220	739	1

Tabelle 3-V Verteilung des T132C-Genotyps im Exon 3 des MLC2V-Gens

Daten sind als n (ganze Zahlen) dargestellt, in Klammern sind die relativen Häufigkeiten angegeben. Die Genotypverteilung in den Gruppen (IDCM, KHK und Kontrollen) wurde mittels Chi-Quadrat-Test verglichen und zeigte keine Signifikanz.

Eine Chi-Quadrat-Test-Analyse zeigte, daß sich die Verteilung des Genotyps zwischen der IDCM-, der KHK- und der Kontrollgruppe nicht signifikant unterscheidet. Zusätzlich wurden IDCM-Patienten, welche nur den Wildtyp (T132C^{-/-}) tragen, mit IDCM-Patienten, welche ein oder beide mutierten Allele (T132C^{-/+} bzw. T132C^{+/+}) tragen, hinsichtlich ihrer klinischen, echokardiographischen und hämodynamischen Parameter miteinander verglichen (s. Tab. 3-VI). Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Sowohl die Infiltration des Myokards durch inflammatorische Zellen (CD2, CD4, CD45R) als auch die Schwere der Herzerkrankung blieben bei allen IDCM-Patienten vom Vorhandensein des T132C-Genotyps unbeeinflusst.

Parameter [#]	T132C ^{-/-} (n = 131)	T132C ^{-/+} bzw. T132C ^{+/+} (n = 27 + 1)
LVEF (%)	45,1 ± 19,5	45,0 ± 15,7
IVS (mm)	11,1 ± 2,4	11,1 ± 1,9
LVEDD (mm)	62,4 ± 10,6	60,6 ± 7,4
LVEDP (mmHg)	16,4 ± 8,6	17,1 ± 7,9
Symptome seit (Monate)	28,4 ± 58,4	21,1 ± 32,1
NYHA-Klasse	2,3 ± 0,7	2,2 ± 0,7
CD2-Zellen (per HPF)	0,3 ± 0,5	0,4 ± 0,4
CD4-Zellen (per HPF)	0,3 ± 0,3	0,2 ± 0,4
CD45RO-Zellen (per HPF)	1,4 ± 2,3	0,9 ± 1,1

Tabelle 3-VI Einfluß des T132C-Genotyps innerhalb der IDCM-Gruppe

[#] Statistisch wurde ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt, welcher für keinen Parameter einen signifikanten Unterschied zwischen dem T132C^{-/-} Genotyp und dem T132C^{-/+} bzw. T132C^{+/+} Genotyp ergab.

3.2.4. Untersuchung des C490A-Genotyps

Der C490A-Genotyp in Exon 5 der MLC1V führt zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz (Leucin → Methionin). Um eine funktionelle Relevanz dieser Mutation zu ermitteln, wurde eine Familienuntersuchung des Indexpatienten mit Genotyp-Phänotyp-Korrelation durchgeführt. Sowohl Familienmitglieder der I., II. als auch III. Generation wurden mittels Kapillarsequenzierung auf die C490A-Mutation hin untersucht (Abb. 3-24).

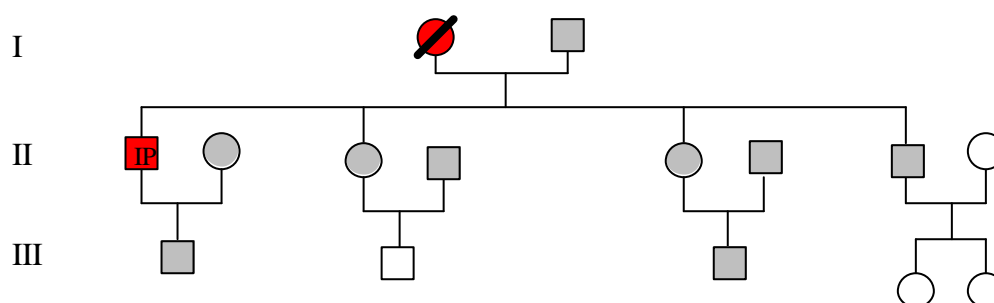


Abb. 3-24 Familienstammbaum des C490A-positiven Indexpatienten

Der Vater des Indexpatienten (IP), der Sohn, die 3 Geschwister sowie 1 Neffe und 3 angeheiratete Personen wurden bezüglich der C490A-Mutation untersucht (s. grau gewürfelte Markierung). Bisher nicht mit in die Untersuchung einbezogen werden konnten 1 weiterer Neffe sowie 2 Nichten des IP. Von einer familiären DCM betroffen sind nur der IP und die früh verstorbene Mutter (rote Markierung).

□ = männlich ○ = weiblich

Bis auf den Indexpatienten konnte die C490A-Mutation bei keinem weiteren Familienmitglied nachgewiesen werden und auch klinisch ergaben sich keine Einschränkungen. Die Familienanamnese ergab jedoch, daß die Mutter des Patienten im Alter von 34 Jahren an plötzlichem Herztod verstorben war. Da eine vererbte bzw. familiäre DCM dann vorliegt, wenn außer dem Indexpatienten mindestens ein weiteres Familienmitglied an einer DCM erkrankt oder ein Verwandter ersten Grades im Alter von bis zu 35 Jahren plötzlich verstorben ist (110), werden im vorliegenden Fall die Kriterien für eine familiäre DCM als erfüllt angesehen.

3.3. Quantitative und qualitative Untersuchungen auf Proteinebene

Ziel der folgenden Arbeiten war es, die auf RNA-Ebene gewonnenen Ergebnisse auf der Proteinebene zu ergänzen bzw. zu erweitern. Ausgehend von Berichten aus der Literatur, welche auf einen Abbau des MLC2V-Proteins sowie das Auftreten von Autoimmunphänomenen im Rahmen einer DCM hindeuten (80; 109), sollte der Befund der Verminderung von MLC2V-Protein im Myokard im Hinblick auf folgende Schwerpunkte näher untersucht werden. Durch die Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen die MLC2V sollte die Verringerung des Proteins im Vergleich zur KHK und zu Kontrollen ohne Herzinsuffizienz quantifiziert, sowie mittels immunhistochemischer Methoden nach spezifischen Proteinverteilungsmustern gesucht werden. Zudem sollte das MLC2V-Protein *in vitro* exprimiert werden und das resultierende rekombinante Protein als Antigen für die Suche nach anti-MLC2V-spezifischen Antikörpern im Serum von DCM-Patienten dienen.

3.3.1. Quantitativer Nachweis des MLC2V-Proteins mittels Immunblot

Es sollte untersucht werden, ob der veränderte Spiegel der MLC2V-mRNA auch auf dem Proteinlevel wiederzufinden ist. Obwohl eine Verminderung des MLC2V-Proteins im Myokard von DCM-Patienten beschrieben ist (109; 111), sollte der Proteinspiegel der MLC2V speziell an den Proben nachgewiesen werden, welche auch den Befund der erhöhten Transkription lieferten. Dazu wurde der unter 3.3.2. beschriebene Peptidantikörper verwendet, welcher spezifisch an Epitope der Region 109-130 (= Aminosäure 109-130) des MLC2V-Proteins bindet. Es wurden 14 IDCM-Proben, 9 KHK-Proben und 5 Kontrollproben untersucht und jeweils 10 µg des Gesamtproteinaufschlusses aus Myokardgewebe in einem 12%-igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt. In einem parallelen Gel wurden die Proben Coomassiegefärbt und durch videodensitometrische Erfassung zueinander abgeglichen. Für die Detektion des MLC2V-Proteins im Immunblot wurde der anti-MLC2V-Antikörper eingesetzt (Bsp. in Abb. 3-25). Die in der Literatur beschriebene verminderte Nachweisbarkeit des MLC2V-Proteins im Myokard konnte, zumindest mit den vorhandenen Proben, nicht nachvollzogen werden. Die quantitative Analyse der Immunblots mit Hilfe des ScanPack II-Programms zeigte weder zwischen den IDCM- und den KHK-Proben noch zwischen den IDCM- und Kontrollproben signifikante Unterschiede.

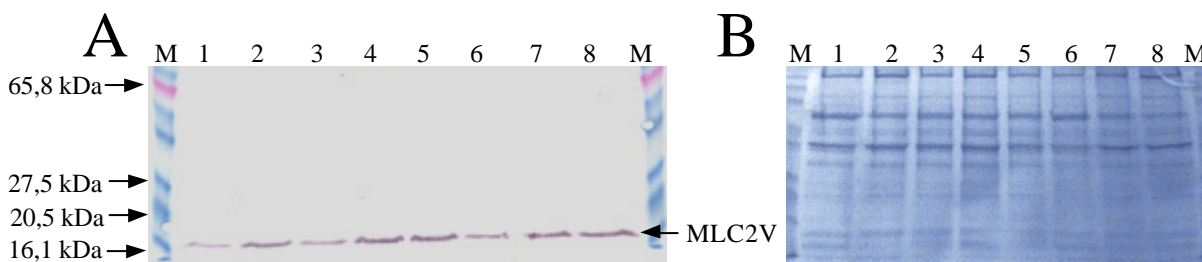


Abb. 3-25 Semiquantitativer Immunblot und Coomassiegel von humanem Gesamteproteinenaufschluß

Kolorimetrische Färbung des MLC2V-Proteins auf einer Nitrozellulosemembran (A) und zugehörige Coomassiefärbung eines 12%-igen PAA-Gels (B). Zur Immundetektion wurde der anti-MLC2V-AK 1:3000 eingesetzt, als Zweit-AK diente ein AP-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-IgG-AK (1:3000)

M = Bench Mark Protein Leiter (Invitrogen);

1 – 3 = KHK-Proben, 4 – 6 = IDCM-Proben, 7 – 8 = Kontrollproben

Die Entwicklung des Immunblots wurde nach 2 min gestoppt und die Banden videodensitometrisch erfasst.

Zusätzlich zum Immunblot wurde zur Quantifizierung des MLC2V-Proteins ein direkter ELISA herangezogen. Dazu wurde eine Mikrotiterplatte mit 1000 ng Gesamtprotein pro Loch mit der zu untersuchenden Probe beschichtet. Nach Inkubation mit dem primären (anti-MLC2V) und sekundären (Ziege-anti-Kaninchen-IgG, AP-gekoppelt) Antikörper sowie der Substratzugabe (PNPP) konnte das Signal bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen werden. Zwar zeigten sich in der Signalintensität zwischen den IDCM-, KHK- und Kontrollproben schwache Unterschiede, diese waren jedoch nicht signifikant.

3.3.2. Herstellung von rekombinantem MLC2V-Protein

Als Ausgangsmaterial für die Amplifizierung des MLC2V-Gens wurde mRNA aus gesundem linksventrikulärem Herzgewebe verwendet. Die Primersequenzen wurden dabei so gewählt, daß unter Aussparung des Startkodons am 5'-Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bam*HI sowie am 3'-Ende für das Enzym *Hind*III entstand. Der Expressionsvektor wurde vorbereitend auf die Ligation mit den gleichen Restriktionsenzymen in der „Multiple Cloning Site“ geöffnet. Als Expressionsvektor wurde das Plasmid pQE-9 (QIAGEN) verwendet, auf welchem sich das eingefügte MLC2V-Transkript direkt hinter dem *lacI*-abhängigen *lac*-Operator, dem ATG-Startkodon und der Hexahistidinsequenz befindet. Das pQE-9-MLC2V-Konstrukt wurde durch Transformation in *E. coli* TOP10 vermehrt und mittels Plasmidpräparation aufgereinigt. Die Einhaltung des korrekten Leserahmens wurde durch Sequenzierung überprüft. Für die MLC2V-Proteinexpression wurde das erzeugte Konstrukt in den *E. coli*-Stamm M15(pREP4) transformiert. Dieser ist Träger des Repressorplasmids pRep-4, auf welchem das Repressorgen *lacI* sowie das Gen für

Kanamycinresistenz kodiert sind. Durch das Zusammenführen beider Plasmide (pQE-9 und pREP-4) kann die Expression des MLC2V-Proteins gesteuert werden, da diese unter der Kontrolle eines T5-Promotors steht, dessen Funktion durch das lacI-Repressorprotein in Abhängigkeit von der IPTG-Konzentration reguliert wird (Abb. 3-26).

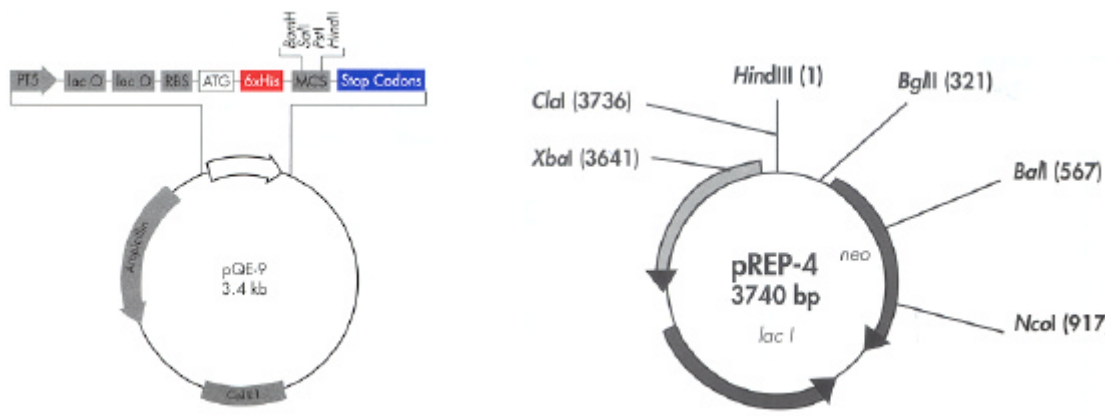


Abb. 3-26 Schematische Darstellung der Expressionsvektoren pQE-9 und pREP-4

pQE-9: PT5 = T5-Promotor; lacO = lac-Operator; 6x His = Hexahistidinsequenz (His-tag)

pREP-4: lac I = lac-Repressor

(aus: The QIAexpressionist, QIAGEN, 2001)

Nach erfolgreicher Transformation in *E. coli* M15(pREP4) erfolgte die Induktion der MLC2V-Proteinexpression durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,1 M. Der optimale Zeitpunkt der rekombinanten Proteinexpression sowie die Löslichkeit des Proteins wurden mit Hilfe von SDS-PAGE und Coomassiefärbung ermittelt (Abb. 3-27).

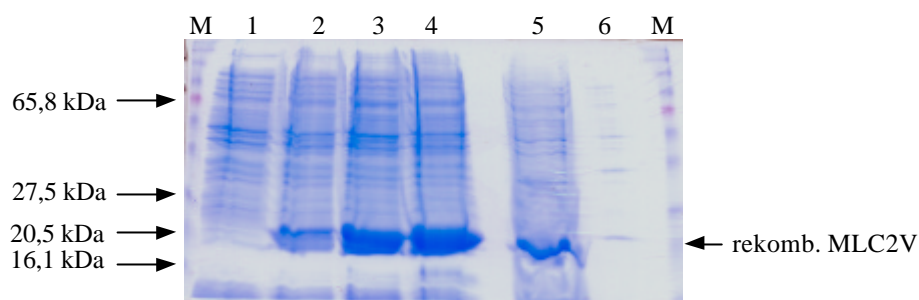


Abb. 3-27 Induktion der MLC2V-Proteinexpression in transformierten *E. coli* M15(pREP4)

Coomassiefärbung eines 12%-igen Polyacrylamidgels.

M = Bench Mark Protein Leiter (Invitrogen); 1 – 4 = *E. coli*-Flüssigkultur vor (1) und 1 h (2), 4 h (3) bzw. 7h (4) nach Induktion mit IPTG; 5 – 6 = Gesamtproteinextrakt aus *E. coli* nach Aufschluß mit Lysispuffer und Unterteilung in eine lösliche (5) und unlösliche (6) Fraktion

Aufgrund der Ergebnisse dieser Versuche wurde für die präparative Gewinnung des rekombinanten Proteins im weiteren nach dem Protokoll für die Aufreinigung von löslichen Proteinen (s. 2.2.4.2.) und mit einer Inkubationszeit von 7 h nach Induktion gearbeitet.

Die affinitätschromatographische Reinigung fand unter denaturierenden Bedingungen statt, wobei der His-tag die Bindung des Proteins an die Ni-NTA-Agarose ermöglichte. So war eine Gewinnung des rekombinanten Proteins mit hoher Reinheit möglich (s. Abb. 3-28).

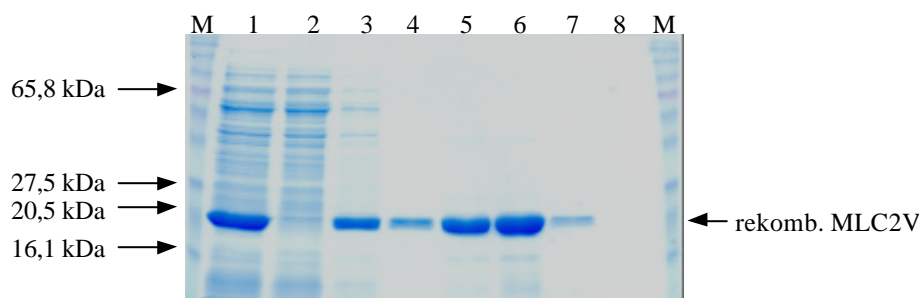


Abb. 3-28 Präparative Aufreinigung von rekombinatem MLC2V über Ni-NTA-Agarose

Coomassiefärbung eines 12%-igen Polyacrylamidgels.

M = Bench Mark Protein Leiter (Invitrogen); 1 = Lysat der *E. coli*-Flüssigkultur 7 h nach Induktion; 2 = Durchfluß nach Auftragen des Lysats auf die Ni-NTA-Agarose; 3 – 4 = 1. und 2. Waschen; 5 – 8 = Eluat 1 – 4 bei pH 6,3

Die Identität der MLC2V wurde durch eine teilweise Sequenzierung des rekombinanten Proteins (IMB Jena, Abt. Biochemie, Dr. Schlott) bestätigt. Das Molekulargewicht steigt aufgrund des N-terminalen Fusionspeptids von 18,7 kDa (natives Protein) auf 20,2 kDa an. Mittels der affinitätschromatographischen Reinigung wurden aus 1 Liter *E. coli*-Kulturvolumen ca. 15 mg rekombinantes MLC2V-Protein gewonnen, in 0,1 M Natriumphosphat umgepuffert und auf eine Konzentration von 5 µg/µl eingestellt.

Überprüfung der Spezifität der rekombinanten MLC2V

Das rekombinante MLC2V-Protein wurde auf seine immunologische Nachweisbarkeit hin durch SDS-PAGE und Immunblot mittels eines spezifischen anti-MLC2V-Antikörpers untersucht. Da ein kommerzieller anti-MLC2V-AK nicht zur Verfügung stand, wurde die Herstellung eines polyklonalen Antiserums bei der Firma Research Genetics, Inc. (USA) in Auftrag gegeben. Als Antigen diente dabei ein 22 Aminosäuren langes Peptid, dessen Sequenz (s. 2.2.4.1.) unter Berücksichtigung verschiedener Parameter (Ladung, Glykosylierung, Lage innerhalb des Gesamtproteins, geringe Übereinstimmung mit ähnlichen

Proteinen) ausgewählt wurde. Das MLC2V-Peptid wurde mittels Fmoc-Festphasenmethode synthetisiert und nach Konjugation an das Trägerprotein KLH in Kaninchen injiziert. Die Funktionalität des resultierenden polyklonalen anti-MLC2V-Peptidantikörpers wurde zunächst an einem linksventrikulären Gesamtproteinextrakt optimiert und im folgenden auch für den Nachweis der rekombinanten MLC2V bestätigt (s. Abb. 3-29).

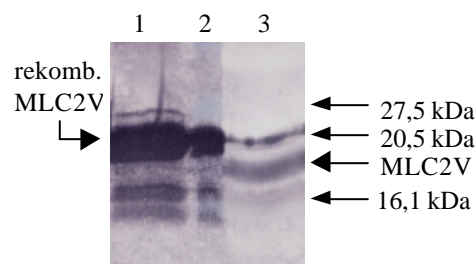
Abb. 3-29 Testung des anti-MLC2V-Peptid-AK

Kolorimetrische Färbung des MLC2V-Proteins auf einer Nitrozellulosemembran nach SDS-PAGE und Blot. Als Primärantikörper wurde anti-MLC2V-AK in einer 1:1000-Verdünnung eingesetzt, als Sekundärantikörper AP-gekoppeltes Ziege-anti-Kaninchen-IgG (1:3000), die Farbreaktion erfolgte mittels BCIP/NBT.

1 = 40 µg rekombinantes MLC2V (MG = 20,2 kDa)

2 = Bench Mark Protein Leiter (Invitrogen)

3 = 40 µg Proteingesaftaufschluß des linken Ventrikels



3.3.3. Suche nach Autoantikörpern im Serum von DCM-Patienten

3.3.3.1. Autoantikörper-Screening mittels Immunblot

Unter der Verwendung des *in vitro* exprimierten MLC2V-Proteins sollte mittels Immunblot nach Autoantikörpern gesucht werden. Dazu wurden Seren von 40 IDCM-Patienten, welche hinsichtlich des Nachweises von Enterovirus-RNA im Myokard („enterovirusassoziierte IDCM“, n = 20) untergruppiert wurden, verwendet. Bei zwei der untersuchten Seren wurde ein positives Signal detektiert, davon fiel ein Serum in die Subgruppe enterovirusnegativ und ein Serum in die Subgruppe enteroviruspositiv. Abbildung 3-30 zeigt das Bild eines Immunblots unter Verwendung eines Multiscreen-Apparates (Bio-Rad), der es ermöglichte, je Blot 20 Seren simultan zu testen, Abbildung 3-31 die Einzeldetektion der entsprechenden positiven Seren unter normalen Detektionsbedingungen.

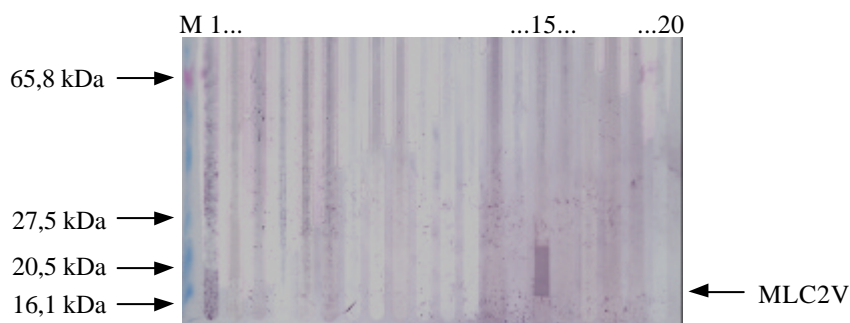


Abb. 3-30 Autoantikörper-Screening in humanen Seren mittels Immunblot

Kolorimetrische Färbung des MLC2V-Proteins auf einer Nitrozellulosemembran nach SDS-PAGE und Blot. Rekombinantes MLC2V wurde in einem 12%-igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Die Seren wurden in einer 1:2 Verdünnung als Primärantikörper eingesetzt, als Sekundärantikörper diente ein AP-gekoppelter Ziege-anti-human-IgG-AK, die Farbreaktion erfolgte mittels BCIP/NBT.

M = Bench Mark Protein Leiter (Invitrogen)

1 – 20 = virusnegative DCM-Serumproben

15 = anti-MLC2V-Autoantikörper-positives Signal

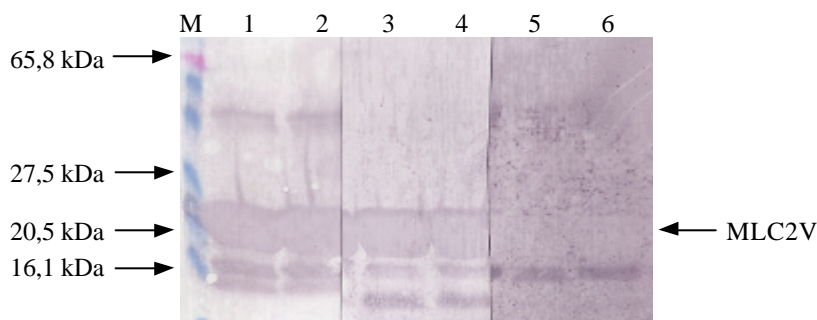


Abb. 3-31 Autoantikörper-Nachweis in humanen Seren mittels Immunblot

Kolorimetrische Färbung des MLC2V-Proteins auf einer Nitrozellulosemembran.

Je Spur wurden 40 µg rekombinantes MLC2V-Protein in einem 12%-igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Seren wurden in einer 1:10 Verdünnung als Primärantikörper eingesetzt, als Sekundärantikörper diente AP-gekoppelter Ziege-anti-human- bzw. für Spur 1+2 anti-Kaninchen-IgG-AK.

M = Bench Mark Protein Leiter (Invitrogen); 1+2 = Positivkontrolle (Primärantikörper = anti-MLC2V-AK, 1:3000); 3+4 = virusnegative DCM-Serumprobe 1; 5+6 = viruspositive DCM-Serumprobe

3.3.3.2. Autoantikörper-Screening mittels direktem ELISA

Zur Überprüfung der durch Immunblot erhaltenen Ergebnisse wurden die Seren hinsichtlich einer Immunantwort auf das MLC2V-Protein in einem ELISA validiert. Gleichzeitig wurden mit dieser Methode weitere 70 DCM-Proben (n = 60 virusnegativ, n = 10 viruspositiv) sowie 60 KHK- und 60 nicht kardial vorbelastete Kontrollproben untersucht. Eine mit 100 ng rekombinantes MLC2V-Protein je Loch beschichtete Mikrotiterplatte diente als Basis für die enzymvermittelte Detektion von anti-MLC2V-Autoantikörpern in den Seren. Die mittels

Immunblot positiv getesteten Seren wurden als Positivkontrollen eingesetzt. Es fanden sich innerhalb der virusnegativen DCM-Gruppe zwei weitere positive Signale, dagegen konnte weder bei Patienten mit KHK noch bei den Kontrollen ein vergleichbares Signal detektiert werden. Die beiden zusätzlichen positiven Signale sind wiederum im Immunblot dargestellt (s. Abb. 3-32).

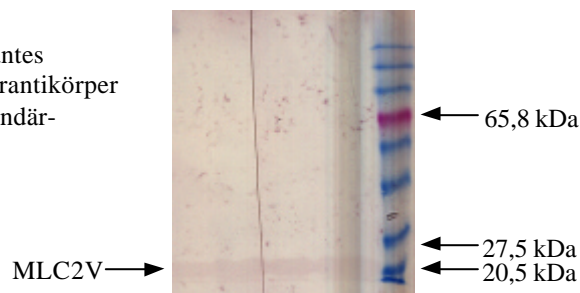
Abb. 3-32 Autoantikörper-Nachweis in humanen Seren mittels Immunblot

Kolorimetrische Färbung des MLC2V-Proteins auf einer Nitrozellulosemembran. Je Spur wurden 10 µg rekombinantes MLC2V-Protein durch SDS-PAGE aufgetrennt, als Primärantikörper diente Patientenserum in einer 1:10 Verdünnung, als Sekundärantikörper Ziege-anti-Human-IgG(H+L).

M = Bench Mark Protein Leiter (Invitrogen)

1 = virusnegative DCM-Serumprobe 2 (anti-MLC2V-Autoantikörper-positiv)

2 = virusnegative DCM-Serumprobe 3 (anti-MLC2V-Autoantikörper-positiv)



3.3.4. Nachweis der MLC2V-Proteinexpression mittels Immunhistochemie

Immunhistologisch wurde die Verteilung des MLC2V-Proteins in IDCM- und Kontrollproben unter Anwendung des hergestellten polyklonalen anti-MLC2V-Antikörpers als primärem Antikörper (1:1000) untersucht. Zum Ausschluß einer unspezifischen Reaktion durch den Zweitantikörper wurde in einer Negativkontrolle der Primärantikörper durch H₂O substituiert. Gefrierschnitte von drei IDCM- und drei Kontrollproben wurden acetontfixiert und einer immunhistochemischen Färbung auf Basis eines Peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Komplexes unterzogen. In Abbildung 3-33 ist deutlich ein Unterschied zwischen dem pathologischen und dem Normalgewebe zu sehen. Die Myofibrillenstreifung, in welcher sich Aktin- und Myosinfilamente organisieren, ist im Normalgewebe klar zu erkennen, während sich im IDCM-Gewebe ein diffuses Muster zeigt. Die Verteilung des MLC2V-Proteins erscheint somit bei IDCM im Vergleich zum Kontrollgewebe ungeordneter. Für die Stärke der Expression ließ sich hingegen zwischen IDCM- und Normalgewebe kein Unterschied ermitteln.

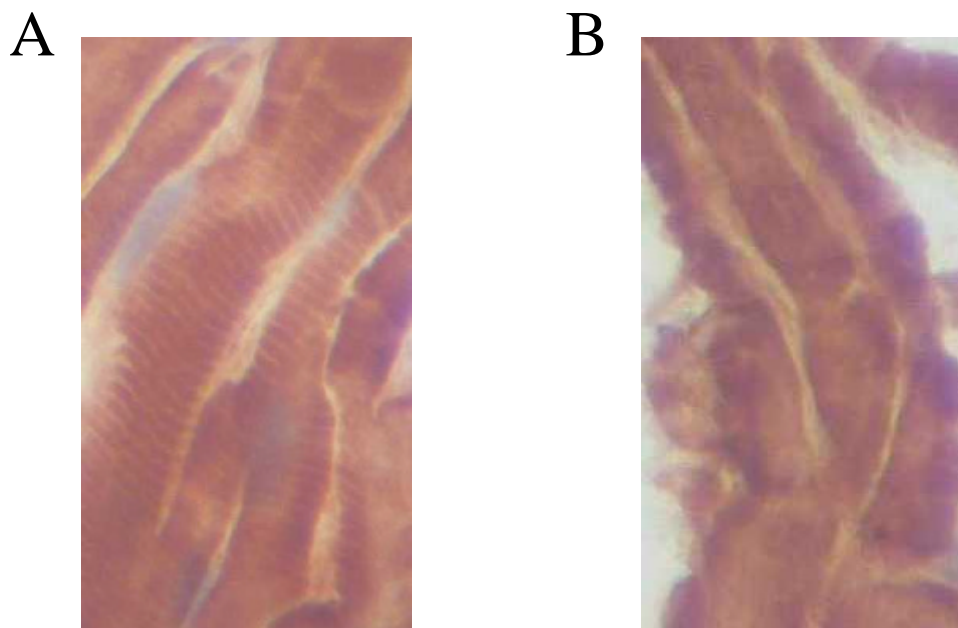


Abb. 3-33 Beispiel des immunhistochemischen Nachweises von MLC2V-Protein in Myokardgewebe

Die Färbung (rotbraun) erfolgte unter Verwendung eines biotinylierten Sekundärantikörpers, eines Peroxidase-konjugierten Streptavidin-Komplexes und Diaminobenzidin. Die Zellkerne (blau) wurden mit Hämatoxyllin gegengefärbt. (6- μ m-Kryostatschnitte, Durchlicht, 400-fache Vergrößerung)

A = Kontrollgewebe; B = IDCM-Gewebe

3.3.5. Untersuchungen zum MLC2V-Protein mittels 2D-Elektrophorese

Die Technik der zweidimensionalen Elektrophorese erlaubt es, Proteine sowohl nach ihrem isoelektrischen Punkt (IEF) als auch nach ihrem Molekulargewicht (SDS-PAGE) zu trennen. Die Separation einzelner Proteine kann damit im Vergleich zur eindimensionalen Elektrophorese effizienter sein. Es können zusätzliche Ansatzpunkte zur Analyse bestimmter Eigenschaften eines Proteins, wie post- und kotranslationale Modifizierungen oder das Vorhandensein von Isoformen, gewonnen werden. Hinsichtlich des MLC2V-Proteins sollten neben einer Quantifizierung potentielle Abbauprodukte sowie Unterschiede in den Laufeigenschaften, welche auf einen veränderten Modifizierungsstatus hinweisen könnten, überprüft werden. Es wurden drei IDCM-Proben im Vergleich mit drei Kontrollproben untersucht, wobei je 500 μ g Gesamtprotein einer Probe auf einen separaten Gelstreifen (18 cm, pH 3 – 10, NL) appliziert wurden (Abb. 3-34).

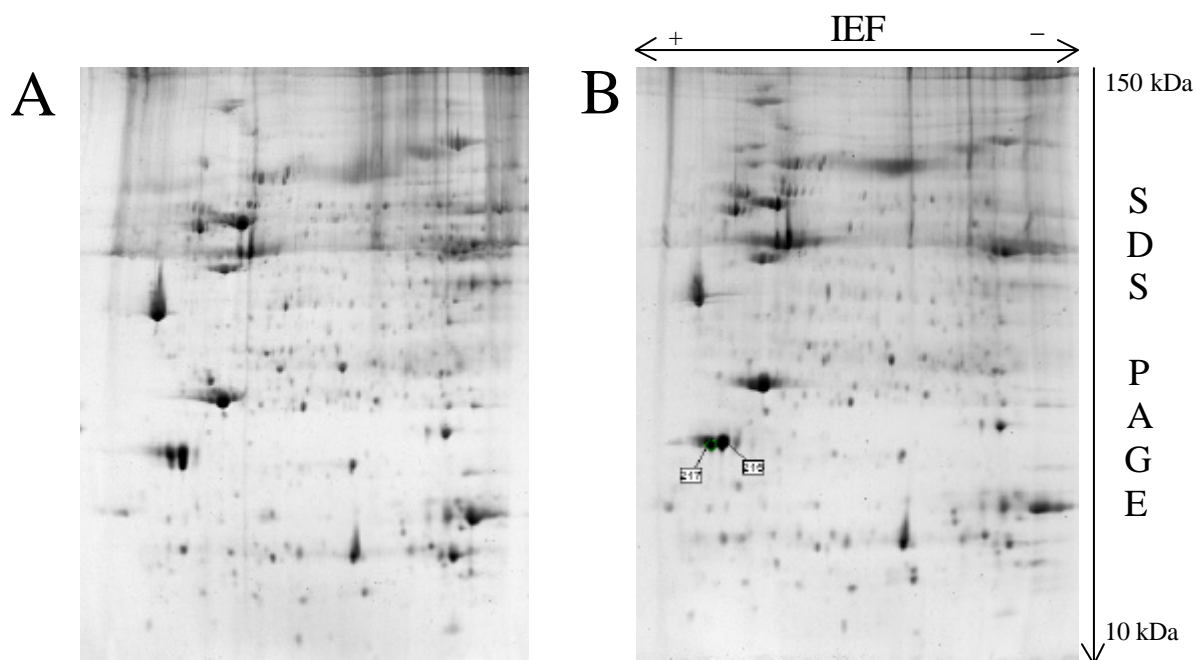


Abb. 3-34 2D-Elektrophorese von Myokard-Gesamtprotein

Coomassiefärbung eines 12,5%-igen SDS-PAA-Gels. A = Kontrolle; B = IDC

Massenspektrometrische Ergebnisse am Beispiel einer IDC-M-Probe:

Spot 215: Leichte regulatorische Myosinkette (MLC2V), Isoform a; 166 AA; 18,6 kDa; pI 4,92

mapkkakkRA GGANSNVFSM FEQTQIQEFK EAFTIMDQNR DGFIDKNDLR DTFAALGR_{vn} vkneidemi
kEAPGPINFT VFLTMFGEKL KGADPEETIL NAFKVFDPEG Kgvlkadyvr EMLTTQAERF SKEEVDQMFA
AFPPDVTGNL DYKnlvhiit hgeekd

Spot 217: Leichte regulatorische Myosinkette (MLC2V), phosphorylierte Isoform a; 166 AA; 18,6 kDa; pI 4,82
mapkkakkRA GGANSNVFSM FEQTQIQEFK eaftimdnr DGFIDKNDLR DTFAALGR_{vn} vkneidemi
kEAPGPINFT VFLTMFGEKL KGADPEETIL NAFKVfdpeg kgvlkadyvr EMLTTQAERF SKEEVDQMFA
AFPPDVTGNL DYKnlvhiit hgeekd

(rot = massenspektrometrisch identifizierte Peptide, blau = potentiell phosphorylierte Aminosäuren)

Am IMB Jena (Arbeitsgruppe Biochemie, Dr. Schlott) wurden die vermuteten Spots des MLC2V-Proteins aus dem 2D-Gel isoliert, mit Trypsin verdaut und die tryptischen Peptide massenspektroskopisch analysiert. Anhand der durch MALDI-TOF-Massenspektroskopie ermittelten Peptidmassen und deren eindeutiger Zuordnung zu den aus der Aminosäuresequenz der MLC2V berechneten Peptidmassen (www.expasy.org/tool/peptide) erfolgte die Identifizierung des Proteins. Die gewählten Bedingungen für die isoelektrische Fokussierung ließen eine optische Auftrennung des MLC2V-Proteins in mindestens zwei Isoformen zu. Zur Analyse der Isoformen bietet die massenspektroskopische Vorgehensweise zusätzliche Interpretationsmöglichkeiten: Peptidmassen, die nicht exakt (Abweichung max. 0,2 Da) den aus der Aminosäuresequenz abgeleiteten Werten entsprechen, können unter Berücksichtigung massenverändernder Modifikationen ebenfalls der MLC2V zugeordnet werden (www.expasy.org/tools/findmod). Auf diese Weise war es möglich, Hinweise auf Phosphorylierungen bestimmter MLC2V-Peptide zu erhalten und es fanden sich

Unterschiede, was die Anzahl der potentiellen Phosphorylierungen betraf (s. Abb. 3-34). In den IDCM-Proben wurden in der jeweiligen phosphorylierten Isoform drei Phosphatreste gefunden, wohingegen sich in den Kontrollen nur zwei Phosphorylierungen pro Molekül fanden. Quantitativ konnten wiederum keine signifikanten Unterschiede des MLC2V-Proteins, weder in Hinsicht auf die phosphorylierte Isoform noch auf die nicht phosphorylierte Isoform, zwischen den IDCM- und den Kontrollproben ermittelt werden.

Für die Detektion von MLC2V-Fragmenten wurden je zwei IDCM- und zwei Kontrollproben nach der 2D-Elektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und anschließend mit dem polyklonalen anti-MLC2V-Antikörper als Primärantikörper und einem AP-gekoppelten Sekundärantikörper kolorimetrisch detektiert.

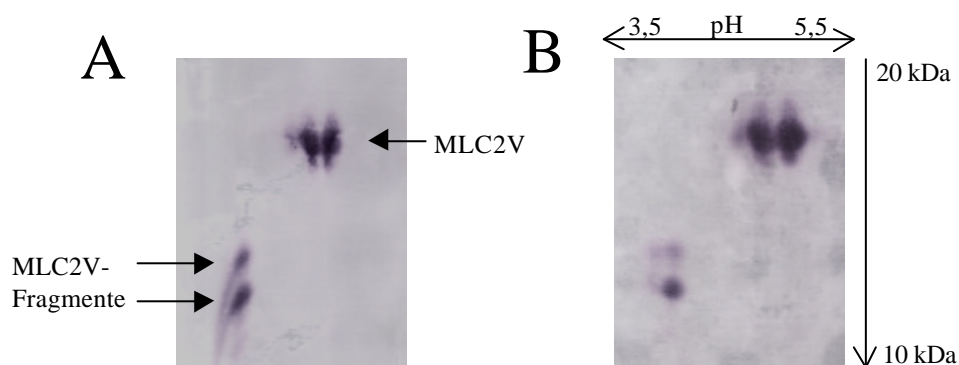


Abb. 3-35 2D-Elektrophorese von Myokard-Gesamtprotein mit anschließender Immunfärbung

Kolorimetrische Färbung des MLC2V-Proteins auf einer Nitrozellulosemembran (Ausschnitt). Je 500 µg Gesamtprotein wurden mittels 2D-Elektrophorese aufgetrennt und im Immunblot mit einem MLC2V-spezifischen Antikörper (1:1000) detektiert.

A = Kontrolle; B = IDCM

Wie aus Abbildung 3-35 ersichtlich, ergeben die neben den herkömmlichen MLC2V-Isoformen detektierten kleineren Fragmente kein IDCM-spezifisches Bild. Der Versuch wurde sowohl mit dem Einsatz von Proteinaseinhibitoren beim Proteinaufschluß als auch ohne Proteinaseinhibitoren wiederholt, erbrachte jedoch kein anderes als das hier gezeigte Ergebnis.

2D-Elektrophorese mit fluoreszenzmarkierten Proben

Die Fluoreszenzmarkierung der Proteinproben diente der Möglichkeit, zwei Populationen (IDCM und Kontrolle) zu vermischen und gemeinsam in einem Gel aufzutrennen. Die bisherigen Ergebnisse wiesen darauf hin, daß die MLC2V in den IDCM-Gelen im Vergleich zu den Kontrollgelen in der zweiten Dimension (Auftrennung nach Molekulargewicht) etwas langsamer läuft. Durch die gemeinsame Auftrennung in einem Streifen/Gel sollten eventuelle Unterschiede deutlicher zu erkennen sein. Zu diesem Zweck wurden die Proteinpopulationen vor dem Lauf mit verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen markiert und konnten später im Gel unabhängig voneinander mit einem Fluoreszenzimager visualisiert werden. Die Auswertung erfolgte mit der 2D-Software „Phoretix 2D 6.0“, mit welcher die beiden Fluoreszenzaufnahmen („gesund“ und „krank“) aus einem Gel übereinandergelegt werden konnten. Dabei trat der verzögerte Lauf der MLC2V in der IDCM-Population sowohl visuell als auch rechnerisch deutlich hervor (s. Abb. 3-36 und 3-37).

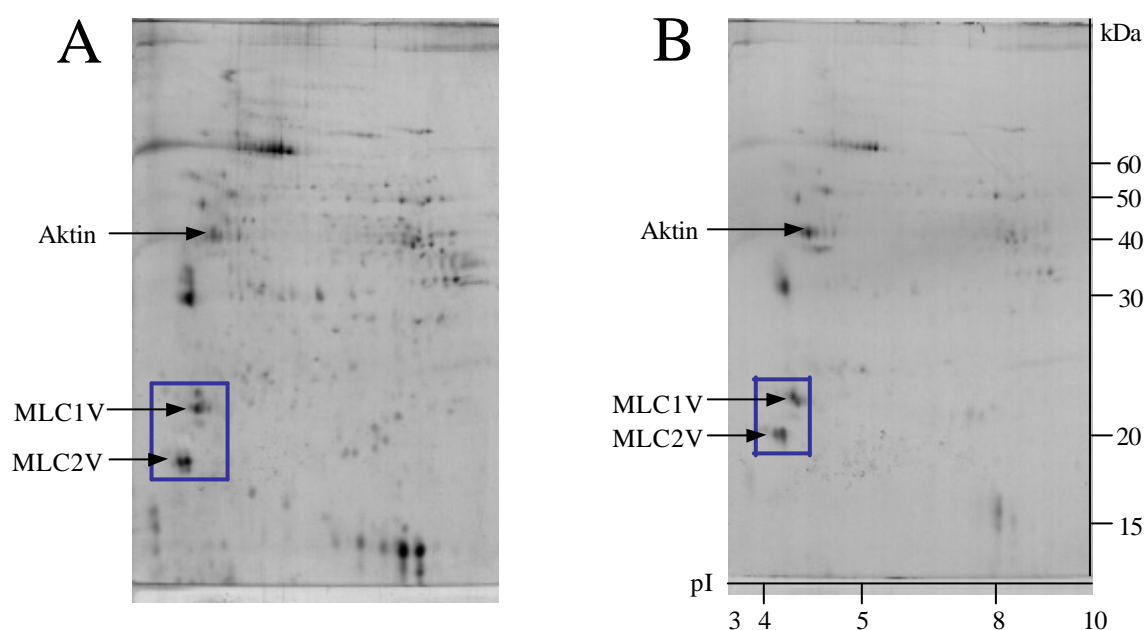


Abb. 3-36 2D-Elektrophorese von Myokard-Gesamtprotein mit Fluoreszenzmarkierung

Fluoreszenzaufnahme eines 12,5%-igen Polyacrylamidgels.

Je 70 µg Gesamtprotein einer IDCM- bzw. Kontrollprobe wurden gemeinsam mittels 2D-Elektrophorese (Gelstreifen = 18 cm; pH 3 – 10, NL) aufgetrennt.

A = Kontrolle + Fluor 594 (Ex. = 532 nm, Em. = CY5)

B = IDCM + Fluor 488 (Ex. = 473 nm, Em. = FITC)

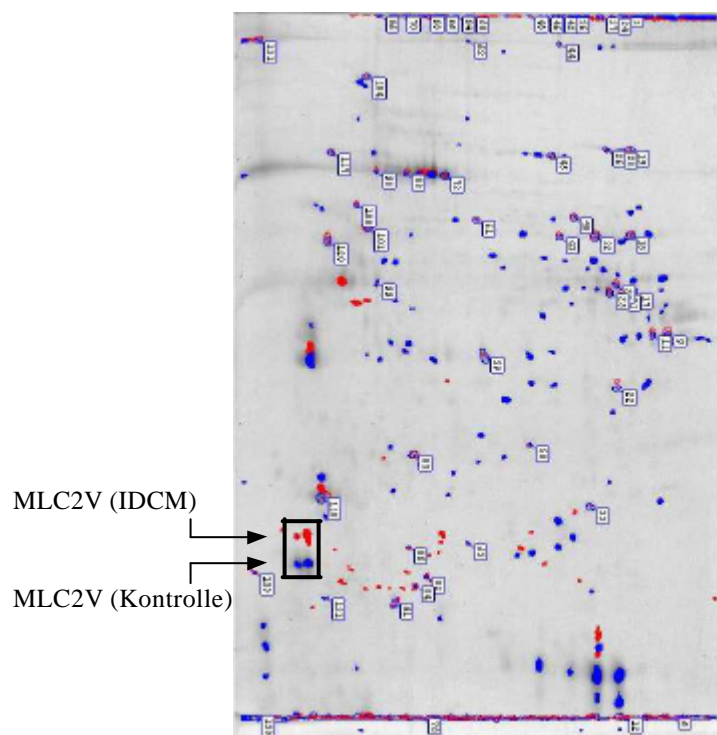


Abb. 3-37 2D-Elektrophorese von Myokard-Gesamtprotein mit Fluoreszenzmarkierung

„Spot Matching“ mittels 2D Phoretix-Software: Die in einem 2D-Gel gelaufenen Proben wurden verschieden fluoreszenzmarkiert und übereinandergelegt.

rote Spots = IDCM-Probe; blaue Spots = Kontroll-Probe; nummerierte Spots = Übereinstimmungen („matches“)

Die veränderte Laufeigenschaft des MLC2V-Proteins betrifft dabei nur die zweite Dimension, d. h. es gibt eine Veränderung des Molekulargewichtes, jedoch nicht des isoelektrischen Punktes. Das Molekulargewicht der MLC2V steigt um circa 1,2 kDa auf 19,8 kDa an. Der Versuch wurde mit drei weiteren IDCM-Proben und zwei weiteren Kontrollproben wiederholt, wobei der Befund der Verschiebung des MLC2V-Proteins in den höhermolekularen Bereich jeweils reproduziert werden konnte.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der ventrikulären leichten Myosinkette Typ 2 in der Pathogenese der IDCM näher zu charakterisieren. Dabei sollte speziell der Expressionsgrad der MLC2V auf mRNA- und auf Proteinebene betrachtet werden. Des Weiteren war beabsichtigt, nach Ursachen für Veränderungen der Expression, ausgelöst durch Modifizierungen der DNA oder des Proteins, zu suchen.

4.1. Untersuchungen zur MLC2V-Expression auf mRNA-Ebene

Die Expression der MLC2V-mRNA wurde an endomyokardbioptisch gewonnenem Material von Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie und an explantierten Herzen von Spendern mit normaler linksventrikulärer Funktion, Patienten mit IDCM und Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit untersucht. Es handelte sich dabei um eine konsekutive Patientenauswahl, welche nur hinsichtlich einer vergleichbaren Alterseinordnung eingeschränkt wurde.

In Vorarbeiten wurden mittels subtraktiver Hybridisierung mRNA-Populationen eines Spenders mit normaler linksventrikulärer Funktion und eines Patienten mit IDCM verglichen. Dieses Vorgehen wurde gewählt, um neue Targetgene, welche an der Entstehung/Progression einer IDCM beteiligt sind, zu identifizieren. Die Technik der subtraktiven Hybridisierung wurde 1996 erstmals beschrieben (112). Damit gelingt es, differentiell exprimierte Gene verschiedener Expressionsgrade mit großer Effizienz selektiv anzureichern (113). Erfolgreiche Anwendung fand die Methode unter anderem im Bereich der Krebsforschung zur Identifizierung Krebs-assoziiierter Gene (114). Die im Rahmen der IDCM untersuchten Individuen waren hinsichtlich ihres Alters und Geschlechts vergleichbar. Die Versuchsanordnung war so gewählt, daß sie eine selektive Anreicherung von Sequenzen, die bei IDCM überexprimiert werden, erlaubte. Als überexprimierte Sequenzen wurden die ventrikuläre leichte Myosinkette Typ 2, Skelettmuskel-Alpha-Aktin, Acyl-CoA-Synthase und KIAA0465 identifiziert. Unter diesen wurde die MLC2V als das Gen mit der stärksten klinischen Relevanz angesehen und die Validität ihrer mRNA-Überexpression sollte überprüft werden.

Im gesunden Herzen wird die ventrikuläre Isoform der MLC2 kontinuierlich und in einem Verhältnis von 1:1 zur MLC1 exprimiert (115). Die Expression von MLC2V-mRNA im Myokard von Patienten mit IDCM wurde bisher nicht untersucht. Anhand verschiedener

Methoden zur Quantifizierung der Transkriptionsrate eines Gens wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß die mRNA-Menge der MLC2V im linken Ventrikel von IDCM-Patienten gegenüber der MLC2V-mRNA-Menge im linken Ventrikel von Spenderherzen signifikant erhöht ist. Die Quantifizierung der MLC2V-mRNA erfolgte dabei relativ zur GAPDH-Konzentration in den Proben. Das Haushaltsgen GAPDH wird in der Literatur als Gen mit konstanter mRNA-Expression im Herzen angegeben und wurde in bisherigen Expressionsstudien am Myokard erfolgreich zur Quantifizierung eingesetzt (67; 116; 117). Um einen Vergleich der mRNA-Expression der MLC2V zwischen den Proben möglich zu machen, wurde zunächst die GAPDH-Expression in allen Proben analysiert. Mit Hilfe eines Kompetitorfragments bekannter Konzentration konnte der Gehalt an GAPDH-mRNA in den Proben ermittelt werden und es ergaben sich daraus nach statistischer Analyse keine signifikanten Schwankungen der GAPDH-mRNA-Spiegel in den IDCM- und Kontrollproben ($p < 0,001$). Eine Vergleichbarkeit der Gruppen war damit gegeben. Die untersuchten Myokardgewebeproben bestehen aus einem Gemisch aus Myokard-, Endothel-, Bindegewebszellen und Monozyten, welche alle eine GAPDH-Expression, jedoch nur im Falle der Myozyten auch eine MLC2V-Expression (s. empirische Daten unter 3.1.1.) aufweisen. Da es im Zuge einer IDCM zur Fibrosierung des Herzmuskels und damit zum Verlust von Myozyten kommt, führt der Vergleich der MLC2V-Expression mit der GAPDH-Expression bei einer gleichen Ausgangsmenge an Zellen des kranken bzw. gesunden Myokardgewebes zu einer Benachteiligung der MLC2V-mRNA in den IDCM-Proben. Somit ist zu vermuten, daß die tatsächliche MLC2V-mRNA-Expression in den Myozyten der IDCM-Proben noch höher als die hier ermittelte ist.

Als Nachteil der von uns durchgeführten Verifikationsexperimente ist die geringe Zahl an eingesetzten Normalgewebeproben ($n = 6$) anzusehen. Dies verhindert eine exakte statistische Absicherung der Ergebnisse. Würde es sich jedoch bei den ermittelten Werten der IDCM- und Kontrollproben um Zufallsschwankungen innerhalb einer größeren Population handeln, müßte die mittlere Standardabweichung innerhalb einer Gruppe sehr groß sein, d. h. nur sehr wenige Proben wären so stark/niedrig exprimiert, daß sie Proben mit niedrigen/hohen Expressionswerten verdecken würden. Da die Proben normalverteilt sind (David-Schnelltest), kann dies ausgeschlossen werden. Es zeigt sich eine relativ klare Erhöhung der Expressionswerte in allen IDCM-Proben gegenüber den Kontrollproben. Es gibt jedoch zwischen den einzelnen angewandten Methoden Schwankungen im Maße der Überexpression (s. Tab. 4-1), was vermutlich auf die unterschiedliche Sensitivität der Methoden zurückgeführt werden kann.

	RT-PCR	Duplex-PCR	Echtzeit-PCR	Northernblot	Microarray
IDCM/Kontrolle	9,8	2,3	5,5	2,1	2,8

Tabelle 4-1 Zusammenfassung der Expressionsunterschiede der MLC2V zwischen IDCM und Kontrollen

Die Zahlen geben die Faktoren an, um welche die Expression der MLC2V-mRNA in den IDCM-Proben im Verhältnis zu den Kontrollproben erhöht ist.

Die Untersuchungen mittels semiquantitativer RT-PCR, welche mit einem Faktor von 9,8 den größten Unterschied zwischen gesund und krank aufweisen, erscheinen methodisch am ungenauesten. Da hier nicht gesehen werden kann, wann die PCR in ihre gesättigte Phase übergeht, d. h. wann die Anzahl der Moleküle pro Zyklus nicht mehr exakt verdoppelt wird, kann es schnell zur Erfassung fehlerhafter Expressionsstärken kommen. Zudem erfolgt die Analyse der PCR-Produkte erst nach Beendigung der PCR in einem separaten Schritt, der Gelelektrophorese. Aus diesem Grunde wurden die Versuche mit Hilfe der Echtzeit-PCR wiederholt und es ließ sich von uns eine Erhöhung der MLC2V-mRNA-Expression um den Faktor 5,5 feststellen. Für die Amplifizierung mittels Echtzeit-PCR wurden ein anderes Primerpaar und eine höhere Ausgangsmenge an cDNA als in der RT-PCR verwendet, was die Amplifizierungsraten beeinflussen und somit erklären könnte, wieso der Expressionsfaktor der MLC2V niedriger als in der RT-PCR ist. Vorteile der Echtzeit-PCR sind die hohe Sensitivität, die gute Reproduzierbarkeit und der große dynamische Meßbereich (118; 119). Hier kann die Menge an PCR-Produkt während der Amplifikation, im vorliegenden Fall mittels Fluoreszenz, während jedem Zyklus analysiert werden. Wird die gemessene Fluoreszenz gegen die Zyklusanzahl aufgetragen, erhält man die Verlaufskurve einer PCR-Probe. Je nachdem, wie sich diese Kurve zu einem früheren oder späteren Zyklus hin verschiebt, läßt sich anhand standardisierter Proben auf die anfängliche Kopienzahl des amplifizierten Gens in einer Probe schließen und dieses sich somit quantifizieren. Es gibt eine Reihe von Arbeiten, in denen mittels Echtzeit-PCR die Quantifizierung eines Gens untersucht wurde. So wurde beispielsweise die Menge an HPV-mRNA in der Zervix mit der Wahrscheinlichkeit der Entstehung des Zervixkarzinoms korreliert (120) und in der Entstehung von Nierentumoren konnte die gestörte Expression des Apoptoseinhibitors XIAP identifiziert werden (121). Im Einklang mit der Literatur kann somit sehr wahrscheinlich davon ausgegangen werden, daß auch die von uns mittels Echtzeit-PCR bestimmten Expressionsunterschiede der MLC2V einer tatsächlichen Erhöhung der Expressionsspiegel in den IDCM-Proben entsprechen.

Zur weiteren Verdeutlichung der Expressionsunterschiede wurde die Duplex-RT-PCR angewandt, mittels welcher das Verhältnis der MLC2V-mRNA zur MLC1V-mRNA bestimmt werden konnte. Im direkten Vergleich der MLC1V-Expression zwischen den Gruppen unterschied sich die MLC1V-Expression in der IDCM-Gruppe auf einem geringen Signifikanzniveau von der Kontrollgruppe durch eine Erhöhung um den Faktor 1,5. Die Verschiebung des Verhältnisses der MLC2V zur MLC1V von 1,25:1 in den Kontrollproben zu 2,8:1 in den IDCM-Proben zeigt damit eine deutliche Änderung der MLC2V-mRNA-Expression, welche gerade durch ihre Unabhängigkeit von der Ausgangsmenge an cDNA eine besondere Signifikanz aufweist. Der Faktor, um welchen die Expression erhöht ist, liegt deutlich niedriger als bei den anderen Quantifizierungsmethoden, dies kann jedoch auf die schon leicht erhöhte Expression der MLC1V-mRNA in den IDCM-Proben zurückzuführen sein. Eine andere Erklärung kann in den verschiedenen effizienten Bindungsraten der beiden Primerpaare in einem PCR-Ansatz liegen. Ebenfalls zu beachten ist die Tatsache, daß die Transkription der MLC2V nicht wie sonst zu GAPDH, sondern zur MLC1V, welche vermutlich eine höhere physiologische Transkriptionsrate als GAPDH aufweist, ins Verhältnis gestellt wurde. Durch Northernblot und Microarray Analyse konnten wir die Daten zur differentiellen Transkription der MLC2V weiter überprüfen. Da für beide Methoden größere Mengen an Ausgangsmaterial notwendig sind, konnte hier nur mit einer geringen Probenanzahl gearbeitet werden. Der Vorteil des Northernblots liegt in der direkten Vermessung der RNA, ohne den Schritt der Reversen Transkription (122). Auch mit dieser Methode wurden signifikante Expressionsunterschiede deutlich, was weiter für die Relevanz unseres Befundes spricht. Die DNA-Chip-Technologie bietet in Form des Microarray eine neue Möglichkeit, Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen cDNA-Populationen zu erfassen (123; 124). In zwei Experimenten wurden in dieser Arbeit cDNA-Populationen von zwei IDCM-Patienten mit jeweils dem gleichen Spender verglichen. Unter der Annahme, daß eine balancierte Überexpression von > 2 signifikant ist, wurden insgesamt 38 bei IDCM überexprimierte Sequenzen ermittelt. Für die MLC2V wurde dabei, mit einem Faktor von 2,8, eine balancierte Überexpression an dritthöchster Stelle erfaßt. In den vorliegenden Untersuchungen war außerdem eine Überexpression des ANF-Vorläuferproteins (Atrialer Natriuretischer Faktor) mit dem zweithöchsten Wert nachweisbar. Im Rahmen der Entwicklung eines embryonalen Expressionsmusters im Verlauf einer IDCM ist die Überexpression der ANF-mRNA im linken Ventrikel gut dokumentiert (125; 126). Somit kann der Wert der ANF-mRNA als interne Kontrolle für die DNA-Microarray Technologie bei Herzinsuffizienz angesehen werden, welche die Validität der Methode zusätzlich bewies.

Insgesamt konnten wir mit fünf unabhängigen Methoden die erhöhte Transkription des MLC2V-Gens in den IDCM-Proben bestätigen. Gemessen an der unterschiedlichen Sensitivität und Fehlerrate der Methoden, läßt sich von einer Erhöhung der MLC2V-mRNA um circa das drei- bis fünffache über dem physiologischen Spiegel ausgehen. Dies spricht dafür, daß mit Hilfe der subtraktiven Hybridisierung in myokardialen Gewebe neue pathophysiologisch relevante Gene identifiziert werden können.

Neben dem Vergleich zwischen „gesund“ und „krank“ sollte weiterhin untersucht werden, ob sich die erhöhte Transkription der MLC2V spezifisch in der Pathogenese der IDCM zeigt oder ob sie einen generellen Mechanismus in Endstadien von Herzerkrankungen verschiedener Ursachen darstellt. Dazu wurde die MLC2V-mRNA-Expression in den IDCM-Proben (n = 14) mit der Expression in KHK-Proben (n = 11) verglichen. Die koronare Herzkrankheit (KHK) bzw. ischämische Kardiomyopathie repräsentiert, als die häufigste Erkrankung mit dem Endzustand des Herzversagens, einen sehr großen Anteil aller Herzinsuffizienzfälle (127). Sie unterscheidet sich von einer IDCM durch ihre Art der Entstehung. Die Herzkranzgefäße führen durch eine Verengung bzw. durch Verschuß dazu, daß das Myokard nicht mehr versorgt und nach ausgedehnten Myokardinfarkten insuffizient wird. Die KHK ist so, im Gegensatz zur IDCM, nicht primär myokardialer Ursache.

Auch für den Vergleich der IDCM- und KHK-Proben wurden verschiedene Methoden angewandt – die semiquantitative RT-PCR, die Echtzeit-PCR und die Duplex-PCR (s. Tab. 4-2).

	RT-PCR	Duplex-PCR	Echtzeit-PCR
IDCM/KHK	4,3	2,5	2,5

Tabelle 4-2 Zusammenfassung der Expressionsunterschiede der MLC2V zwischen IDCM und KHK

Die Zahlen geben die Faktoren an, um welche die Expression der MLC2V-mRNA in den IDCM-Proben im Verhältnis zu den KHK-Proben erhöht ist.

Es konnte mit allen drei Methoden ein Unterschied in der Expression der MLC2V-mRNA festgestellt werden, wiederum mittels RT-PCR um einen höheren (4,3) Faktor als mit der Echtzeit- (Faktor 2,5) und der Duplex- (Faktor 2,5) PCR. In der Arbeitsgruppe stand außerdem ein Ratten-Tiermodell mit künstlich erzeugtem Herzinfarkt zur Verfügung. Bei den Tieren konnte durch Vergleich des Myokards von infarzierten Ratten zu gesunden Kontrolltieren die Transkription der MLC2V der Ratte untersucht werden. Der Herzinfarkt ist eine Manifestationsform der KHK und die Untersuchung von infarziertem Gewebe sollte die

Spezifität der MLC2V-Erhöhung bei der IDCM durch den Vergleich von KHK-Proben und Kontrollproben weiter bestätigen. Auch in der Ratte wird die leichte Myosinkette als ventrikuläre und als atriale Isoform, sowohl des Typs 1 als auch 2, exprimiert (68; 128; 129; 130). Zur humanen MLC2V besteht eine Sequenzhomologie von 87 %. Zwischen den infarzierten Tieren (n = 5) und den Kontrolltieren (n = 11) konnten, gemäß den Erwartungen, mittels Northernblot keine signifikanten Expressionsunterschiede der MLC2V-mRNA ermittelt werden. Der Befund der erhöhten MLC2V-Transkriptionsrate trennt sich damit insgesamt von der KHK ab und es läßt sich die Schlußfolgerung ziehen, daß es sich bei der erhöhten Transkription des MLC2V-Gens um ein selektives Bild im Verlauf einer IDCM handeln könnte, was die pathophysiologische Bedeutung des Befundes deutlich erhöht.

Bei den untersuchten IDCM-Proben handelt es sich sowohl um Biopsien, welche zum Zeitpunkt der Krankheitserkennung zu Diagnosezwecken entnommen wurden und damit ein früheres Krankheitsstadium repräsentieren, als auch um Gewebe von explantierten Herzen, welche im Zuge einer Herztransplantation, also im Endstadium der Erkrankung, entnommen wurden. Zwischen diesen, verschiedene Stadien der IDCM repräsentierenden Proben konnten wir keine Unterschiede in der mRNA-Expression der MLC2V erfassen. Ein zeitlicher Verlauf der MLC2V-Expression konnte damit zwar nur eingeschränkt untersucht werden, legt jedoch die Schlußfolgerung nahe, daß die erhöhte Transkriptionsrate der MLC2V schon in einem frühen Stadium der Erkrankung auftritt und bis zum völligen Versagen der linksventrikulären Herzmuskulatur konstant auf diesem erhöhten Level bleibt. Durch die beobachtete Konsistenz der MLC2V-Transkription könnte sie als Teil der genetischen Signatur der IDCM eingeordnet werden. Im Idealfall müßten zur Kontrolle des zeitlichen Verlaufs Gewebeproben vor dem Auftreten der ersten klinischen Beschwerden sowie nach therapeutischer Besserung einer IDCM auf die Expression der MLC2V hin analysiert werden, was jedoch aus ethischen Gründen nicht vertretbar ist. Einen Ansatz für die genauere Untersuchung des zeitlichen Ablaufs der MLC2V-Expression während der Entwicklung einer IDCM würde die Arbeit an einem Tiermodell mit künstlich erzeugter dilatativer Kardiomyopathie darstellen. Denkbar wäre auch ein transgenes Tiermodell mit erhöhter MLC2V-Transkription, wie es im Falle des Desmin-, Aktin- und Dystrophingens bereits gezeigt wurde (131).

Für die Erfassung der Expressionsunterschiede der MLC2V-mRNA wurde in den vorliegenden Experimenten nicht beachtet, ob es sich um die MLC2V-a oder MLC2V-b Isoform (s. 1.3.1.) handelt. Die Erhöhung der MLC2V-mRNA könnte theoretisch nur eine der MLC2V-Isoformen betreffen. Ritter et al. fanden im hypertrophischen Herzen (HCM) eine Verringerung der MLC2V-a-Transkription zugunsten der MLC2V-b (132). Eine allgemeine

Erhöhung der MLC2V-mRNA konnte jedoch, im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen, nicht nachgewiesen werden. Da nicht geklärt ist, ob beide Isoformen auf dem selben Gen lokalisiert sind und der gleichen Promotorkontrolle unterliegen (12), läßt sich vermuten, daß ein regulatorischer Mechanismus besteht, welcher unter bestimmten Voraussetzungen die Transkription einer der Isoformen bevorzugt. Zur Klärung der Frage, ob das Verhältnis von 2,3:1 (15) zwischen der MLC2V-b und der MLC2V-a verschoben ist, müßte die Amplifizierung der MLC2V in zukünftigen Experimenten mit Primern erfolgen, die sich speziell nur an eine der Isoformen anlagern können. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer waren so gewählt, daß Start- und Stopkodon im Amplifikat mit eingeschlossen waren. So konnte ausgeschlossen werden, daß bereits während der Transkription und dem anschließenden Spleißen eine Degradation der (prä-)mRNA stattfindet und der erhöhte MLC2V-Spiegel nur eine Anhäufung von RNA-Abbauprodukten repräsentiert.

Die signifikanten Unterschiede zwischen den hier untersuchten IDCM-, KHK- und Kontrollproben geben einen Hinweis darauf, daß sich Patienten mit einer IDCM von Patienten mit einer KHK und gesunden Kontrollen in ihrer MLC2V-Transkription unterscheiden. Neben der signifikanten Erhöhung der MLC2V-Transkription in den IDCM-Proben ist auffällig, daß sich auch eine gegenüber gesunden Spendern gering erhöhte Transkription in den KHK-Proben fand. Die Transkriptionsspiegel bei IDCM sind gegenüber den Kontrollen nochmals doppelt so hoch wie gegenüber den KHK-Proben. Ein statistischer Vergleich zeigte zwischen KHK und Kontrollen nicht bei allen angewandten Methoden Signifikanz. Es läßt sich somit vermuten, daß eine leichte Erhöhung des MLC2V-Transkriptionsspiegels relativ schnell auftritt, sobald das Herz eine beginnende linksventrikuläre Dysfunktion aufweist. Bei der IDCM als besonderer Form der Herzinsuffizienz scheint es dabei zu einer stärkeren Erhöhung der MLC2V-Transkription zu kommen. Im Gegensatz zu anderen Herzinsuffizienz-/Kardiomyopathieformen tritt nur bei der IDCM eine Erweiterung des Ventrikels bei gleichzeitiger Abnahme der Wanddicke und zunehmender Fibrosierung auf. Somit könnte die erhöhte MLC2V-Transkription ein Ausdruck für das Bestreben des Herzmuskels sein, seinen kontraktilen Apparat an eine erhöhte Pumpleistung der Restmyozyten und an eine erhöhte Wandspannung anzupassen.

Der im Vergleich zur ischämischen Kardiomyopathie bei der IDCM erhöhte MLC2V-Transkriptionsspiegel deutet eine mögliche diagnostische Nutzbarkeit an. Die experimentelle Sicherung der Spezifität dieses Befundes für die IDCM muß dafür durch die Abgrenzung zu Klappen-bedingten Herzinsuffizienzformen und zur hypertensiven Herzkrankheit zukünftig noch erfolgen. Hier sehen wir Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen.

4.2. Suche nach Mutationen in den Genen der ventrikulären leichten Myosinketten

Die Nukleotidsequenzen der Gene für die MLC1V und die MLC2V sowie für Bereiche der β -MHC wurden an genomischer DNA aus dem peripheren Blut von Patienten mit IDCM, KHK-Patienten und Patienten mit nichtkardialen Krankheitsbildern untersucht.

Im Falle der hypertrophischen Kardiomyopathie (HCM), einer genetisch heterogenen, durch Mutationen in sarkomerischen Proteinen verursachten Herzmuskelerkrankung, spielen die leichten Myosinketten eine bedeutende Rolle. Flavigny et al. konnten im Gen der MLC2V zwei Mutationen, Phe18Leu und Arg58Gln, identifizieren (106). Beide Mutationen betreffen eine hoch konservierte Region des Proteins. Die Phe18Leu-Mutation in Exon 2 liegt sehr nahe einer potentiellen Phosphorylierungsstelle und es wird vermutet, daß der regulatorische Mechanismus der Phosphorylierungsdomäne damit beeinträchtigt ist und die kardiale Kontraktion verschlechtert. Die Arg58Gln-Mutation in Exon 4 betrifft die EF-Hand-Domäne und könnte somit die Bindung eines Metallions verhindern, was ebenfalls als Ursache für die verminderte Funktion des kontraktiven Apparates der Herzmuskelzellen in Betracht gezogen wird. Poetter et al. fanden im Gen für die MLC2V drei weitere Mutationen in Assoziation mit der HCM (107). Jede dieser drei Mutationen (Ala13Thr und Glu22Lys in Exon 2 und Pro94Arg in Exon 5) liegt im gefalteten Protein wiederum in enger Nachbarschaft zur Phosphorylierungsstelle der MLC2V und könnte die Phosphorylierbarkeit des Proteins beeinflussen. Dieselbe Arbeitsgruppe suchte auch im Gen für die MLC1V bei Patienten mit HCM nach Mutationen. Neben verschiedenen intronischen und stillen Mutationen wurde in der MLC1V eine missense Mutation, Met149Val, identifiziert. Diese liegt in der Bindungsregion der MLC1V an die schwere Myosinkette, und es wird eine Störung dieser Bindung als eine Ursache der HCM in Betracht gezogen. Neben diesen Arbeiten gibt es zahlreiche weitere Studien, welche im Bereich der MLC1V- (133; 134; 135) und MLC2V- (136; 137; 138; 139) Gene HCM-assoziierte Mutationen identifizieren konnten. Der Effekt der mutierten Allele auf die chemomechanischen Eigenschaften des Myosinmoleküls ist dabei noch weitgehend unbekannt. Auffällig ist jedoch, daß Mutationen in allen Proteindomänen vorkommen können, unabhängig davon, wie hoch die Region konserviert ist. Gleichzeitig wird aber auch deutlich, daß verschiedene Populationsstudien sehr unterschiedliche Ergebnisse aufweisen. So führte das systematische Screening der leichten Myosinketten im Rahmen der HCM in manchen Arbeiten zur Identifizierung von Mutationen und in anderen Arbeiten mit Patienten desselben klinischen Hintergrunds nicht. Es läßt sich deshalb vermuten, daß es neben methodischen Unterschieden auch von der untersuchten ethnischen

Population abhängig sein kann, eine distinkte Mutation zu finden oder nicht. Auch im Gen für die ventrikuläre schwere Myosinkette wurden im Rahmen einer HCM zahlreiche relevante Mutationen identifiziert (140; 141; 142; 143). Resultierende Veränderungen lagen dabei vor allem in einer gestörten Interaktion der schweren Ketten mit Aktin. In Assoziation mit der DCM konnten in der β -MHC zwei Mutationen, Ser532Pro und Phe764Leu, identifiziert werden (54), welche ebenfalls in enger Nachbarschaft zum Aktinmolekül liegen.

Im Rahmen dieser Arbeit war es das Ziel, festzustellen, ob Mutationen im Gen für die MLC2V in direktem oder indirektem Zusammenhang mit der erhöhten MLC2V-mRNA-Expression stehen können. Daneben sollte die Frage beantwortet werden, ob Mutationen in den Genen der leichten Myosinketten (MLC1V und MLC2V) für Formen einer familiären DCM verantwortlich sein können. Die Überlegung hierbei war, daß in manchen Fällen einer IDCM eine familiär-genetische Form vorliegt, deren Ursache nicht erkannt werden konnte, da Mutationen im Bereich der leichten Myosinketten bisher nicht in Betracht gezogen wurden. Neben den leichten Ketten sollten auch die Bereiche der schweren Myosinkette (β -MHC) berücksichtigt werden, welche die Bindungsstellen für die leichten Ketten repräsentieren, da Mutationen in diesem Bereich die Interaktion zwischen leichten und schweren Ketten erheblich stören könnten. Da bisherige Studien gezeigt haben, daß Mutationen in kardialen Proteinen genetisch bedingte Formen einer DCM auslösen können (54), wurde eine systematische Suche nach Veränderungen der Nukleotidsequenz in den Genen der MLC1V, MLC2V und Bereichen der β -MHC durchgeführt.

Die Sequenzierung der leichten Myosinketten ergab insgesamt nur geringe Sequenzvariationen in der untersuchten Population. Die Sequenz für das MLC2V- Gen wurde dem Datenbankeintrag Z15030 der NCBI-Datenbank entnommen. Mit Hilfe dieser Sequenz wurden die Primer so weit in die Introns gelegt, daß alle sieben Exons einschließlich der Exon/Intron-Grenzen amplifiziert und sequenziert werden konnten. Zusätzlich wurde am 3'-Ende von Exon sieben die nachfolgende intronische Sequenz von 1066 bp, welche auch die polyA-Stelle beinhaltet, sowie eine Sequenz von 1500 bp stromaufwärts von Exon eins sequenziert. Mutationen der Promotorregion können bewirken, daß Transkriptions-faktoren besser binden können bzw. die Bindung von Repressorproteinen geschwächt wird. Die Promotorregion der humanen MLC2V ist bisher nicht charakterisiert, weshalb wir den Bereich von 1500 bp stromaufwärts von Exon eins mit Hilfe von Promotor-Scan Programmen (BIMAS, MatInspector) nach homologen Elementen zu potentiellen eukaryontischen RNA-PolymeraseII- und Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen durchsuchten. Obwohl die Suche keine entsprechenden Sequenzelemente (z. B. TATA-Box, CAAT-Box) ergab, wurde der

Bereich im Hinblick auf eine eventuelle regulatorische Funktion in die Sequenzierung eingeschlossen. Zusätzlich wurde für Chromosom 12 eine Analyse der potentiellen Promotorregion für das MLC2V-Gen mit der Software MatInspector/ElDorado (Genomatix Software GmbH) durchgeführt. Die identifizierte Region erstreckt sich über 601 bp und liegt ca. 41100 bp stromaufwärts von Exon 1 der MLC2V. Dieser potentielle regulatorische Bereich wurde ebenfalls in die Sequenzierung eingeschlossen. Es wurde zunächst die DNA von 54 IDCM-Patienten und 53 Kontrollen mittels Didesoxy-Fingerprinting und automatisierter Kapillarsequenzierung in Vorwärtsstrangrichtung untersucht. Traten Veränderungen der Sequenz auf, wurden die entsprechenden Bereiche mehrfach, auch in Rückwärtsstrangrichtung, sequenziert, um methodische Artefakte ausschließen zu können. In Exon drei der MLC2V wurde in 10 von 54 IDCM-Patienten (19 %) sowie in 4 von 53 Kontrollen (8 %) eine T/C-Substitution (T132C) gefunden, welche eine Änderung des Tripletcodes von ATT nach ATC bewirkt. Dies äußert sich in einer stillen Mutation (Ile44Ile). Der T132C-Allelstatus erschien im Hinblick auf eine mögliche Markerfunktion statistisch interessant und sollte daraufhin in einer größeren Population mit aussagekräftiger Anzahl an Probanden untersucht werden. Dazu wurde der T132C-Allelstatus an 159 IDCM-, 359 KHK-Patienten und 220 Kontrollen ermittelt. Der statistische Vergleich dieser Gruppen untereinander zeigte jedoch weder heterozygot noch homozygot signifikante Unterschiede in der Verteilung des T132C-Genotyps. Auch innerhalb der IDCM-Gruppe ergaben sich keine Korrelationen zwischen dem Vorhandensein des T132C-Allelstatus und verschiedenen klinischen und hämodynamischen Parametern. Somit läßt sich schlußfolgern, daß der T132C-Phänotyp in dem hier untersuchten Zusammenhang nicht von Bedeutung ist. Außer dieser Substitution in Exon drei ließ sich im Gen der MLC2V im kodierenden Bereich keine Veränderung finden, jedoch trat in 1 von 54 IDCM-Proben im 3'untranslatierten Bereich (3'UTR), neun Nukleotide nach dem Stopkodon, eine T/C-Substitution (T507C) auf. Die untranslatierten Bereiche eukaryontischer mRNAs können regulatorische Elemente enthalten, welche sowohl die Transkription als auch posttranskriptionale Prozesse beeinflussen können (144). Besonders in der 3'UTR kann eine Sequenzänderung die Sekundärstruktur der (prä)mRNA und damit die RNA-Stabilität beeinflussen (145). Aus diesem Grunde wurde die 3'UTR der MLC2V mit Hilfe eines UTRScan-Programmes (146) auf bekannte Motive, deren funktionelle Rolle bei der Transkription charakterisiert wurden, durchsucht. Im Bereich der T/C-Substitution ergab die Suche jedoch keine bekannten Muster. Aufgrund dieser Tatsache und der geringen Häufigkeit der T507C-Substitution in der untersuchten Gruppe wurde dieser Allelstatus nicht weiter verfolgt. Auch der sequenzierte potentielle Promotorbereich sowie die

5'UTR (1500 bp) wiesen keine Sequenzänderungen auf. Die erhöhte MLC2V-Transkription läßt sich damit durch uns nicht auf Veränderungen im Bereich von potentiellen cis-aktiven Elementen oder Änderungen der kodierenden Sequenz des MLC2V-Gens zurückführen.

Als Grundlage für die Sequenzierung des MLC1V-Gens diente der NCBI-Datenbankeintrag NT_022517. Es wurden alle sieben Exons des Gens einschließlich der Exon/Intron-Grenzen und Bereichen der 5'UTR (1500 bp) und der 3'UTR (1500 bp) sequenziert. Auch hier wurde der 5'Bereich auf Promotorelemente (BIMAS Scan Programm, MatInspector) untersucht, es zeigten sich jedoch keine bekannten Motive. Als Proben für die Sequenzierung dienten wiederum 54 IDCM-Patienten und 53 Kontrollen. Im kodierenden Bereich der MLC1V wurden zwei Änderungen der DNA-Sequenz gefunden. In Exon eins trat eine C/T-Substitution (C69T) auf, welche keinen Aminosäureaustausch (Pro23Pro) bewirkt, und des weiteren war die Ereignisanzahl ($n = 2$ in der IDCM-Gruppe) nicht ausreichend, um weitere Experimente zu begründen. In Exon fünf dagegen führte eine C/A-Substitution (C490A) in einem IDCM-Patienten zur Änderung der Aminosäuresequenz von Leucin nach Methionin (Leu164Met). Die zusätzliche Sequenzierung weiterer 100 Kontroll-Proben wies in keinem Fall die Leu164Met-Mutation auf. Ein Aminosäureaustausch kann eine dramatische Konsequenz für das Gesamtprotein und dessen Funktionalität haben. Auf verschiedenen Gebieten der molekularen Medizin wurde bereits gezeigt, daß eine einzelne Punktmutation zum Funktionsverlust eines Proteins und zur Entstehung von Krankheiten führen kann (51; 54; 133; 147; 148). Obwohl wir die Leu164Met-Mutation nur bei einem IDCM-Patienten fanden, sollte diese deshalb im Hinblick auf eine Assoziation zur DCM näher charakterisiert werden. Um die Änderung der Aminosäure im MLC1V-Protein beurteilen zu können, wurde zunächst ein Homologievergleich der Proteinsequenz mit anderen Spezies und Isoformen durchgeführt (NCBI-Proteinblast). Dabei zeigte es sich, daß die Aminosäure Leucin an Position 164 in den ventrikulären Isoformen verschiedener Spezies konserviert ist (s. Abb. 4-1). Dagegen ist sie in der atrialen und der skelettalen Isoform des Menschen sowie anderer Spezies durch ein Methionin ausgetauscht. Es läßt sich darauf hin vermuten, daß die Aminosäure Leu164 wichtig für die Ausprägung der ventrikulären Isoform ist. Die MLC1V ist allgemein ein hoch konserviertes Protein und weist eine streng ventrikel-spezifische Expression auf (18; 149). Die veränderte Ausprägung der Isoform könnte somit die Funktion des MLC1V-Proteins im Ventrikel beeinflussen.

Leu164Met	156M.....	171
Homo sapiens, ventrikulär		VLATLGERL T ED E VE K	
Rattus norvegicus, ventrikulär		VLATLGERL T ED E VE K	
Mus musculus, ventrikulär		VLATLGERL T ED E VE K	
Gallus gallus, ventrikulär		VL R RTLGERL T EE E VD K	
Xenopus laevis, ventrikulär		VLATLGE K LQENE V E Q	
Homo sapiens, atrial		VLATLGE K MTE E AE V E Q	
Rattus norvegicus, atrial		VLATLGE K MSE E AE V E Q	
Mus musculus, atrial		VLATLGE K MSE E AE V E Q	
Homo sapiens, skelettal		VLATLGE K MKE E E E VE A	
Rattus norvegicus, skelettal		VLATLGE K MKE E E E VE A	
Mus musculus, skelettal		VLATLGE K MKE E E E VE A	
Homo sapiens, glatt		VL V TLGE K MTE E E E V E M	

Abb. 4-1 Protein-Primärstruktur der mutierten Region der humanen MLC1V

Der Vergleich der Leu164Met-Region (AS156 bis AS171) der humanen MLC1V zeigt zwischen verschiedenen Spezies und Isoformen große Homologie. Grau-schattierte Bereiche repräsentieren besonders hoch konservierte Regionen, während gelb markierte Sequenzen Veränderungen zwischen den Isoformen aufweisen. Rot hervorgehoben ist Position 164 der Proteinsequenz, welche im Falle des Indexpatienten zu einem Methionin mutiert ist.

Um eine Vorstellung zu bekommen, welchen Einfluß der Austausch der Aminosäure auf das Gesamtprotein haben könnte, wurde weiterhin (mit freundlicher Unterstützung von Dipl.-Biochemiker Bartholomeus Küttner) mit dem PyMOL-Programm gearbeitet, welches ein dreidimensionales Bild eines Moleküls berechnen kann. Ausgehend von einem Myosin V-Molekül, dessen räumliche Struktur durch Röntgenkristallographie bereits aufgeklärt ist (PDB-Eintrag 1OE9), wurde die Lage der mutierten Aminosäure in der Proteinquartärstruktur extrapoliert. Das in der PDB-Datenbank vorhandene Myosin V-Modell besteht aus der schweren Myosinkette Typ 5 des Huhnes und der skelettalen leichten Myosinkette Typ 1 des Menschen. In der Kristallstruktur dieses Moleküls liegt der mit der ventrikulären MLC1 vergleichbare Bereich in der Bindungsregion der leichten Myosinkette an die Scharnierregion der schweren Myosinkette. Die kardiale schwere Myosinkette des Menschen (β -MHC) weist im Vergleich mit der dargestellten schweren Myosinkette des Huhnes in diesem Abschnitt eine hohe Homologie auf. Theoretisch läßt sich also vermuten, daß auch beim kardialen Myosin II-Molekül des Menschen die mutierte Region der MLC1V an der Bindung zur β -MHC beteiligt ist. Mit Hilfe des PyMOL-Programms (150) wurden von uns diejenigen Aminosäuren ermittelt, welche in der schweren Kette in Bindungsreichweite zu Leu164 bzw. Met164 liegen (maximaler räumlicher Abstand von 4 Ångström): Gln775, Ile778 und Arg779. In der humanen β -MHC entspricht dies den Aminosäuren Gln789, Ser792 und Arg793. Abbildung 4-2 zeigt das räumliche Verhalten der Aminosäure 164 der humanen MLC1V zu ihren potentiellen Interaktionspartnern der schweren Kette sowohl in der natürlichen (Leu164) als auch in der mutierten (Met164) Form.

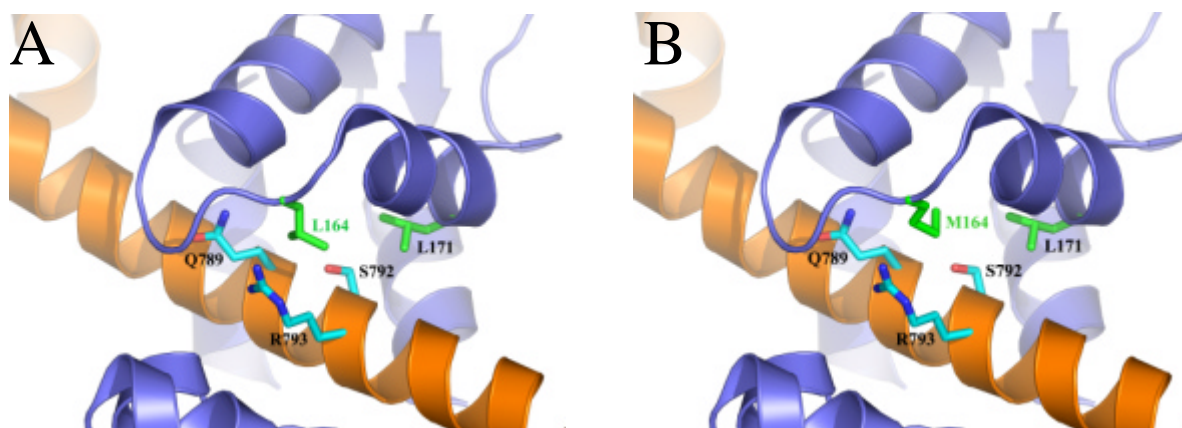


Abb. 4-2 Schematische Darstellung der Kristallstruktur des humanen Myosin II-Moleküls (Ausschnitt)

Das Modell basiert auf der Kristallstruktur des Myosin V-Moleküls aus der Proteindatenbank. Die Aminosäuren L164 und S792 wurden entsprechend dem humanen Myosin II-Molekül angepaßt.

Bild A: Wildtyp der leichten Myosinkette mit Leucin an Position 164

Bild B: Mutierte leichte Myosinkette mit Methionin an Position 164

Leichte Kette (humane MLC1V) = blau, Schwere Kette (humane β -MHC, Scharnierregion) = orange

Die Aminosäure Methionin ist in ihrer aliphatischen Seitenkette etwas größer als Leucin und könnte somit in ihrem räumlichen Verhalten zu den Aminosäuren Gln789, Ser792 und Arg793 der schweren Kette Veränderungen aufweisen. Sie führt jedoch nicht zu zusätzlich vorhandenen Ladungen. Von den Aminosäuren der leichten Kette liegt nur Leu171 in Bindungsreichweite von Leu164Met. Eine Überlegung hierzu wäre, daß Leu171 oder eine der drei Aminosäuren der schweren Kette die Funktion erfüllt, Leu164 in seiner Seitenkette zu kompensieren. Tritt aber ein Methionin an Position 164 auf, könnte es in der Bindungsregion „eng“ werden und das „größere“ Methionin würde die Bindungspartner MLC1 und β -MHC teilweise auseinanderrücken, was in einer schlechteren Bindung zwischen leichter und schwerer Kette resultieren würde. Um diese Theorie zu belegen, müßte experimentell bewiesen werden, daß es eine veränderte Bindungsaffinität zwischen schwerer Kette und mutierter leichter Kette gibt. Relativ sicher ist nur, daß das mutierte Methionin in der Bindungsregion der MLC1V mit der β -MHC liegt und so Einfluß auf die Muskelkontraktion haben könnte.

Aufgrund der Annahme, daß die Leu164Met-Mutation des IDCM-Patienten eine genetische Form der DCM darstellt, wurde eine Familienanamnese durchgeführt. Zugleich konnte von mehreren Verwandten ersten und zweiten Grades DNA aus Blut isoliert und Exon fünf der MLC1V mittels Sequenzierung untersucht werden. Die Sequenzanalyse ergab bei keinem der neun Familienmitglieder einen weiteren Fall der Leu164Met-Mutation. Jedoch zeigte die Familienanamnese, daß die Mutter des Indexpatienten im Alter von 34 Jahren an plötzlichem Herztod verstorben war. Laut Definition liegt eine familiäre DCM dann vor, wenn eines der

folgenden Kriterien erfüllt ist: Innerhalb einer Familie muß neben einem Individuum mit der Diagnose einer IDCM mindestens ein weiterer Verwandter die Diagnose einer IDCM aufweisen oder ein Verwandter ersten Grades muß in einem Alter von maximal 35 Jahren plötzlich verstorben sein (110). Die Familie des Indexpatienten erfüllt somit das Kriterium und es kann angenommen werden, daß es sich bei der Leu164Met-Mutation um eine neue, sporadisch auftretende Form einer familiären DCM handelt. Der Familienstammbaum (s. 3.2.4.) zeigt, daß die Mutation vermutlich von der Mutter an einen Sohn (Indexpatient), jedoch nicht an drei weitere Kinder weitergegeben wurde. Dies ist mit dem Mendelschen Vererbungsgesetz vereinbar. Der Indexpatient ist heterozygoter Träger dieser Mutation mit einer phänotypischen Ausprägung, welche jedoch weder dominant noch rezessiv an seinen Nachkommen weitergegeben wurde.

Im Falle der schweren Myosinkette wurden die Exons 19 und 20 (NCBI-Eintrag X52889) sequenziert, welche für die Bindungsregionen der schweren Kette mit der MLC1V (Exon 19) und der MLC2V (Exon 20) kodieren (151). In diesen Bereichen des Gens der β -MHC ließen sich keine Veränderungen der Nukleotidsequenz ermitteln. Trotz zahlreicher Mutationen, welche im Gen der β -MHC im Rahmen der hypertrophischen Kardiomyopathie identifiziert wurden (152), konnten bisher keine dieser Mutationen in den Bindungsdomänen für die leichten Myosinketten lokalisiert werden. Dieser Bereich der β -MHC erscheint somit hochkonserviert und wenig anfällig für spontane Mutationen.

Abschließend kann gesagt werden, daß Veränderungen der DNA-Sequenz der leichten Myosinketten sowie der Bindungsregionen der schweren Myosinkette in der Pathogenese der IDCM kaum einen Platz einnehmen. Alle gefundenen Sequenzveränderungen der kodierenden und nichtkodierenden Bereiche der MLC-Gene wurden mit der SNP-Datenbank des NCBI verglichen, wo sie bisher nicht aufgeführt sind. Da wir davon ausgehen, daß die Promotorregion des MLC2V-Gens sequenziert wurde, entfällt die Möglichkeit, daß die erhöhte MLC2V-Transkription durch Mutationen im regulierenden Bereich des MLC2V-Gens hervorgerufen wird. Auch im Bereich der Introns können Enhancer- oder Repressorelemente vorkommen, jedoch kann dies im vorliegenden Fall ebenfalls höchst wahrscheinlich ausgeschlossen werden, da die Intronsequenzen der MLC1V und MLC2V mit Hilfe des BIMAS-Programms auf entsprechende Motive gescannt wurden. Auch hier zeigten sich keine relevanten Ergebnisse. Durch das Einbeziehen der Exon/Intron-Grenzen in die Sequenzierung wurden auch die kurzen Konsensussequenzen überprüft, welche die Spleißstellen darstellen, und es kann damit praktisch ausgeschlossen werden, daß aufgrund veränderter Spleißsequenzen fehlerhafte Spleißprodukte neben der normalen mRNA

aufzutreten. Das Auffinden der kodierenden Mutation Leu164Met in einem von 54 IDCM-Fällen zeigt, daß es bei einer größeren Population als der hier untersuchten und besonders bei Patienten mit dem Hintergrund einer familiären Häufung von IDCM-Erkrankungen durchaus möglich ist, einzelne Fälle einer IDCM durch genetische Charakterisierung der MLC-Gene teilweise aufzuklären.

4.3. Untersuchungen zur MLC2V-Expression auf Proteinebene

Die Expression des MLC2V-Proteins wurde an endomyokardbiotisch gewonnenem Material von Patienten mit IDCM bzw. KHK sowie an explantierten Herzen von Spendern mit normaler linksventrikulärer Funktion und Patienten mit IDCM untersucht. Dabei handelte es sich bei dem Großteil der Proben um die gleichen Patienten wie für die Untersuchungen auf mRNA-Ebene. Für die Suche nach Antikörpern wurde Serum von IDCM-, KHK-Patienten und Patienten mit nichtkardialen Hintergrund verwendet.

4.3.1. Quantitative Untersuchungen

Zur spezifischen Rolle der MLC2V in den Herzmuskelzellen gibt es, im Gegensatz zur glatten Muskulatur und zur Skelettmuskulatur, nur wenige Daten. Sie ist jedoch nachgewiesenermaßen in die Regulation und Modulation der myofibrillären Kontraktion involviert. Die ATPase-Aktivität des Myosinmoleküls wird durch die Phosphorylierung der MLC2V mitbestimmt (153). In transgenen Tieren mit einem unterbrochenen Gen für die MLC2V wurde die Bedeutung dieses Proteins während der Embryonalentwicklung untersucht (154). Bei den mutierten Embryos wird die ventrikuläre durch die atriale Form ersetzt und in das Sarkomer eingebaut, was das Absterben der MLC2V-defizienten Embryos am Tag 12,5 der Embryonalentwicklung jedoch nicht verhindert. Ultrastrukturell fanden sich Defekte der Sarkomerstruktur und bezüglich des Gesamtorgans eine embryonale Form einer dilatativen Kardiomyopathie. Die MLC2V hat somit vermutlich eine essentielle Funktion in der kardialen Kontraktilität. Sie besitzt einen ventrikelspezifischen Code und ist anscheinend durch die atriale Form nicht ersetzbar. Während die Expression von MLC2V-mRNA im Myokard von Patienten mit IDCM bisher nicht beschrieben wurde, gibt es mehrere – zum Teil widersprüchliche – Arbeiten mit Fragestellungen zum Proteingehalt der MLC2V. Margossian et al. beschrieben auf der Grundlage eines quantitativen Immunblots eine 30 bis 90%-ige Reduktion des MLC2V-Proteins bei der IDCM (111). Untersuchungen mittels 2D-

Elektrophorese an linksventrikulärem Gewebe von IDCM-Patienten haben den Befund einer etwa 50%-igen Verminderung des MLC2V-Proteins im Vergleich mit KHK-Patienten und gesunden Kontrollen erbracht (109). Gleichzeitig wurde ein Proteinfragment der MLC2V bei IDCM-Patienten im Vergleich zu KHK-Patienten etwa vier- bis fünffach erhöht detektiert, was die Vermutung einer gezielten Degradation des Proteins hervorrief. Pleissner et al. fanden im rechten Atrium von Patienten mit IDCM eine dreifache Überexpression des MLC2V-Proteins (155). Dagegen konnten Morano et al. bei Patienten mit IDCM keine Änderungen im Proteinspiegel der MLC2V finden (17).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expressionsstärke des MLC2V-Proteins an 14 IDCM-Proben, 9 KHK-Proben und 5 Kontrollproben untersucht. Als Analysemethoden dienten zum einen ein semiquantitativer Immunblot und zum anderen ein ELISA. Für die durchgeführte quantitative Analyse mittels Immunblot wurden jeweils gleiche Gesamtproteinmengen einer Probe auf zwei parallele SDS-PAA-Gele aufgetragen und im Anschluß wurde eines der Gele Coomassie-gefärbt und das Parallelgel geblottet und die MLC2V mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers detektiert. Die ermittelte Intensität der MLC2V-Banden im Immunblot wurde zum angefärbten und densitometrisch bestimmten Gesamtprotein der Probe aus dem Parallelgel ins Verhältnis gesetzt. In den vorliegenden Proben konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede im Proteinspiegel der MLC2V zwischen IDCM, KHK und Kontrollen ermittelt werden. Zur Absicherung dieses Befundes wurden die Versuche mit Hilfe eines direkten ELISA wiederholt. Dafür wurde eine Mikrotiterplatte mit gleichen Mengen an Myokard-Gesamtprotein beschichtet und der MLC2V-Gehalt anhand standardisierter Proben berechnet, wobei der Verlauf der Standardkurve die Validität des Tests anzeigte. Auch mit dieser Methode zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen IDCM-, KHK- und Kontrollproben. Immunhistochemisch konnten ebenfalls keine Unterschiede in der Stärke der Expression der MLC2V ermittelt werden. Das im Vergleich zu Kontrollgewebe diffuse Bild in den IDCM-Proben deutet jedoch auf eine Destabilisierung des Sarkomers hin.

Die auf mRNA-Ebene gewonnenen Befunde korrelieren somit nicht mit einem erhöhten Proteinspiegel der MLC2V. Dies widerspricht zunächst dem in der Literatur beschriebenen Abbau des MLC2V-Proteins. Eine mögliche Erklärung wäre, daß der hier gezeigte erhöhte mRNA-Spiegel ein Ausdruck eines kompensatorischen Mechanismus ist. Durch die erhöhte Transkription des MLC2V-Gens könnte der Herzmuskel sein Bestreben zeigen, den im Verlauf einer IDCM vorkommenden Myozytenverlust auszugleichen. Durch eine sehr gute Regulation des physiologischen Proteinspiegels der MLC2V wäre es denkbar, daß

Änderungen auf mRNA-Ebene bis zu einem gewissen Grade toleriert werden. Hierauf deuten auch die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Morano et al. hin. Es ist möglich, daß der erhöhte mRNA-Spiegel ein Signal für regulatorische Proteine posttranslationaler oder posttranskriptionaler Mechanismen ist, was dazu führen könnte, daß zuviel gebildetes MLC2V-Protein abgebaut bzw. die Translation verhindert wird. Eine andere Vermutung zum Befund der unveränderten MLC2V-Proteinexpression wäre, daß der MLC2V-Proteinspiegel aus noch unbekannter Ursache verringert wird und die Myozyten dies durch eine erhöhte Transkription des MLC2V-Gens ausgleichen. Für diese Theorie würde die Existenz von entsprechenden Proteasen im Herzen sprechen. Margossian et al. beschrieben 1992 die Isolation und Aufreinigung einer aktiven Protease, welche im Herzen von Patienten mit IDCM die MLC2V spezifisch schneidet (111). Da über diese Protease kein Datenbankeintrag vorliegt, konnten Untersuchungen zum Vorhandensein der Protease in den hier verwendeten Proben weder auf RNA- noch auf Proteinebene erfolgen. Wir konnten jedoch feststellen, daß sich im Immunblot bei längerer Inkubation eine zweite MLC2V-Antikörper-spezifische Bande zeigt. Diese wurde ansequenziert und als MLC2V-Fragment identifiziert. Quantitativ unterschied sich dieses Fragment jedoch in den IDCM-, KHK- und Kontrollproben nicht. Zusätzlich wurden entsprechende Datenbanken (NiceProt View of Swiss-Prot, NetPicoRNA Prediction Server, ExPASy PeptideCutter) nach Schnittstellen von bekannten relevanten Proteasen durchsucht und mit der MLC2V-Proteinsequenz verglichen, doch hier zeigten sich keine Angriffsflächen für eine proteolytische Spaltung. Ein Protease-vermittelter Abbau wäre dennoch möglich, da der hier verwendete MLC2V-Peptidantikörper nur eine begrenzte Anzahl an Epitopen (AS 109 – 130) erkennen kann und eine Detektion von eventuellen weiteren MLC2V-Fragmenten, welche die entsprechenden Epitope nicht enthalten, damit nicht möglich war.

Daneben könnte vermutet werden, daß im Atrium von IDCM-Patienten die atriale MLC2-Isoform durch die ventrikuläre MLC2-Isoform teilweise ersetzt wird. Wie bereits beschrieben, findet sich im Myokard des rechten Vorhofes von Patienten mit IDCM eine dreifache Erhöhung des MLC2V-Proteins (155; 156). Die Überexpression der MLC2V im Herzen von transgenen Mäusen führte im Atrium zur Verdrängung der MLC2A durch die MLC2V, während die ventrikulären Spiegel des MLC2V-Proteins unverändert blieben (22; 157; 158). Da die MLC2V-Expression gewebespezifisch ist, könnte also eine höhere Transkription der MLC2V im Ventrikel initiiert werden, das resultierende Protein jedoch teilweise ins Atrium transportiert werden. Künftige Untersuchungen zum mRNA- und Proteinspiegel der MLC2V in atrialem Gewebe könnten diese Annahme bestätigen bzw. widerlegen.

Die unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen bezüglich des MLC2V-Proteinspiegels könnten auf die verschiedenen Patientenpopulationen oder auf nicht bekannte methodische Unterschiede zurückzuführen sein. Es ist nicht nachvollziehbar, ob die Patientenkollektive hinsichtlich Alter und Geschlecht mit dem hier verwendeten Patientenkollektiv vergleichbar sind, zudem treten in den veröffentlichten Daten relativ große Schwankungen auf. Da nicht alle Bereiche des insuffizienten Herzens gleich stark fibrosiert sind, ist auch nicht überall der gleiche Myozytenverlust vorzufinden. Wir waren bemüht, Gewebeproben mit geringer Fibrosierung für die Untersuchungen einzusetzen. Trotzdem müßten im Idealfall die zu untersuchenden Myokardgewebestücke nach dem Grad ihrer Fibrosierung bzw. ihrer Myozytenzellzahl miteinander verglichen werden, was jedoch weder in dieser Arbeit noch in denen anderer Arbeitsgruppen realisiert werden konnte. Eine Verminderung des MLC2V-Proteins könnte demnach, wie auch die Zerstörung der Myozyten, nur fokal auftreten und muß nicht in jedem gewonnenen Gewebestück nachweisbar sein. Dies könnte allerdings nur durch ein sehr großes Patientenkollektiv mit guter statistischer Auswertbarkeit untersucht werden.

4.3.2. Suche nach Autoantikörpern

Das Vorkommen von Autoimmunphänomenen bei der DCM sowie die in der Literatur beschriebene verminderte Nachweisbarkeit des MLC2V-Proteins führte zu der Frage, ob es einen durch Autoantikörper vermittelten Abbau des MLC2V-Proteins gibt. Dazu wurden von uns Seren von 110 IDCM-Patienten, 60 KHK-Patienten sowie 60 Kontrollen mittels Immunblot und ELISA untersucht. Es wurde bei vier IDCM-Patienten ein Antikörperpositives Signal gegen das rekombinante MLC2V-Protein detektiert. Als positiv wurden die Proben gewertet, welche im ELISA gegenüber den Kontrollen ein mindestens zweifach erhöhtes Signal aufwiesen. Zusätzlich mußte im Immunblot mit den Seren als Primärantikörper eine distinkte MLC2V-Bande nachgewiesen werden können. Durch das Mitführen derselben Positiv- und Negativseren als Standard konnte die Reproduzierbarkeit der Tests gewährleistet werden. Positive Seren wurden zudem auf ihre Kreuzreaktivität mit der skelettalen MLC2 überprüft, zeigten hier jedoch keine Bindung. Weiterhin wurden die Immunblots unter Einsatz eines kommerziellen rekombinanten MLC2V-Proteins ohne Fusionspeptid wiederholt (Ergebnisse nicht gezeigt). Da sich hier die gleichen positiven Signale zeigten, kann eine Bindung der Serum-Antikörper an den His-tag des rekombinanten MLC2V-Proteins ausgeschlossen werden. Versuche zur Detektion der natürlichen MLC2V in

einem Myokard-Proteinaufschluß durch die vermuteten anti-MLC2V-Antikörper-haltigen Seren blieben unter den gewählten denaturierenden Bedingungen negativ (Ergebnisse nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung wäre die Unfähigkeit eines gegen die native MLC2V gebildeten Autoantikörpers, sein Epitop auch an der denaturierten MLC2V und in geringeren Konzentrationen als beim Einsatz von rekombinantem MLC2V-Protein zu erkennen. Künftig soll deshalb dem Nachweis der nativen MLC2V mittels potentieller Autoantikörper-haltiger Seren durch einen Proteinaufschluß unter nichtdenaturierenden Bedingungen sowie die Auftrennung in einem nichtdenaturierenden Gel nachgegangen werden.

Unter der Voraussetzung der vermuteten spezifischen Bindung von Serum-Antikörpern an das MLC2V-Protein wiesen 4 % der untersuchten IDCM-Population im Vergleich zu 0 % in den KHK- und Kontrollproben auf das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen die MLC2V hin. Dies stellt zwar kein einheitliches Bild eines anti-MLC2V-Antikörper-vermittelten Immunprozesses dar, zeigt aber, daß eine Immunabwehr gegen körpereigenes MLC2V-Protein grundsätzlich möglich ist. Für die Bildung von Autoantikörpern gegen die MLC2V muß jedoch ein bestimmter genetischer Hintergrund, sprich ein fehlgeleitetes Immunsystem vorhanden sein, worauf sich auch die geringe Anzahl der als positiv detektierten Individuen begründen läßt. Unsere Ergebnisse sind diesbezüglich mit den Studien anderer Arbeitsgruppen vergleichbar. Portig et al. fanden bei 10 % der DCM-Patienten und 1 % der KHK-Patienten sowie Kontrollen Antikörper gegen das Streßprotein HSP60 (79). Antikörper gegen Aktin wurden in 7 % der DCM-Patienten und 3 % der Kontrollen gefunden. Auch Latif et al. fanden mehrere Antikörper gegen kontraktile Proteine, u. a. gegen MLC1V, Tropomyosin und Aktin. Die Verteilung dieser Antikörper war zwar in der DCM-Gruppe erhöht, wurde aber auch in mehreren KHK-Proben detektiert (80). Gegen die α - und die β -kardiale schwere Myosinkette wurden ebenfalls Antikörper in Seren von DCM-Patienten identifiziert (81). Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Autoimmungeschehen und der Pathogenese der DCM konnte bisher nur in wenigen Fällen aufgezeigt werden. Im Falle des Adeninnukleotid-Transporters wurde durch die Immunisierung von Meerschweinchen mit Antikörpern gegen den Transporter eine deutliche Beeinträchtigung der kardialen Funktion *in vivo* gezeigt (159). Bei DCM-Patienten mit nachweislichem Antikörperspiegel gegen den β 1-adrenergen Rezeptor konnte durch Immunglobulinadsorption eine Verbesserung des klinischen Bildes gezeigt werden (160). Für die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Antikörper gegen die MLC2V soll zur Einschätzung ihrer Bedeutung künftig ebenfalls der Frage nach einem direkten Zusammenhang zwischen der Pathophysiologie der IDCM und einem Autoimmunprozeß gegen die MLC2V nachgegangen werden. Dazu dient die Isolation

der anti-MLC2V-Antikörperfraktion aus dem Serum eines anti-MLC2V-Antikörper-positiven IDCM-Patienten durch Immuno-Affinitätschromatographie. Die konzentrierte Antikörperfraktion soll für den Nachweis der nativen MLC2V im Myokard eingesetzt werden. Eine Idee ist auch, die isolierte anti-MLC2V-Antikörperfraktion in Mäuse mit einer Coxsackievirus-induzierten Myokarditis zu injizieren und im folgenden Veränderungen auf Protein- und RNA-Ebene zu untersuchen sowie die hämodynamischen Parameter der kardialen Kontraktion zu beobachten. Ein Effekt ist jedoch nicht sicher, da der gegen die humane MLC2V gerichtete Antikörper murines MLC2V als Antigen nicht erkennen muß.

Autoantikörper könnten über drei mögliche Mechanismen zur Pathophysiologie der DCM beitragen. Zum einen könnten sie den Untergang der Kardiomyozyten initiieren. Beweise dafür wurden durch die Immunisierung von Mäusen mit anti-Myosin-Antikörpern erbracht. Dies führte bei einem bestimmten genetischen Hintergrund zu einer Autoimmun-Myokarditis (161). Andererseits könnten Antikörper durch die Interaktion mit Schlüssel-molekülen der Zelle den kardialen Metabolismus oder die Kontraktion stören und somit eine verminderte Funktion des Myokards induzieren. Als Beispiel kann hier die Identifizierung von Antikörpern gegen den β 1-adrenergen Rezeptor, welche die Kraftgenerierung der Myozyten herabsetzen, angeführt werden (83). Gleichzeitig besteht aber auch die Möglichkeit, daß Autoantikörper lediglich als Marker eines gestörten Immunsystems ohne Beteiligung an speziellen Krankheitsprozessen auftreten.

Die Frage, in welcher Weise Antikörper gegen die MLC2V in die Pathogenese der IDCM involviert sein könnten, läßt sich anhand der vorliegenden Daten nicht klar beantworten. Da Myosin ein intrazelluläres Molekül ist, wird es den Zellen des Immunsystems normalerweise nicht präsentiert. Durch das Absterben von Myozyten im Zuge der DCM ist es jedoch möglich, daß Bruchstücke freigesetzt und dem Immunsystem präsentiert werden, was in Individuen mit prädisponierendem genetischem Hintergrund eine Autoimmunantwort auslösen könnte. In der Folge kann eine örtliche Entzündungsreaktion das Absterben weiterer Myozyten auslösen. Antikörper gegen die MLC2V könnten auf diese Weise an der Progression der IDCM beteiligt sein, fungieren jedoch nicht als primärer Auslöser. Ein anderer denkbarer Mechanismus wäre die Präsentation von molekularen Mimikri durch Virusinfektionen. Im Falle von Coxsackieviren, denen eine Rolle in der DCM zugesprochen wird, wurde diese Möglichkeit bereits näher untersucht. Monoklonale Antikörper gegen Coxsackievirus B4 zeigten Kreuzreaktionen mit dem Herzmuskel (162) und konnten für einen spezifischen Antikörper gegen das VP-1-Kapsidprotein sogar als Mimikri der β -MHC identifiziert werden (163). Interessant ist in dieser Hinsicht, daß einer der von uns MLC2V-

Autoantikörper-positiv getesteten IDCM-Patienten ebenfalls Enterovirus-positiv ist. Hier könnte untersucht werden, ob Antikörper gegen dieses Virus mit der MLC2V kreuzreagieren. Allgemein betrachtet, legt das Vorhandensein spezifischer Antikörper gegen verschiedene kontraktile Proteine des Herzmuskels die Schlußfolgerung nahe, daß es keinen einheitlichen Autoimmunmechanismus geben kann, welcher zur Pathogenese einer IDCM führt. Vielmehr ist dies ein Zeichen dafür, daß eine Vielzahl von Proteinen am pathophysiologischen Prozeß der IDCM beteiligt sind. Welches Protein am Anfang einer Kette von pathogenetischen Prozessen steht, ist dabei noch unklar.

4.3.3. Qualitative Untersuchungen mittels 2D-Elektrophorese

Mit Hilfe der 2D-Elektrophorese ist es bereits gelungen, bei Patienten mit IDCM Änderungen im Proteinspiegel von G-Proteinen (164), dem β -adrenergen Rezeptor (165), Proteinen der Kalziumregulation (166; 167) und kontraktiven Proteinen (168) zu beschreiben. Mittels 2D-Elektrophorese sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob es Hinweise auf Proteinmodifikationen der MLC2V-Isoformen gibt, die bei IDCM-Herzen im Vergleich zum gesunden Herzen auf unterschiedliche Weise auftreten. Gegenüber der allgemein üblichen eindimensionalen Auftrennung nach Molekulargewicht, in welcher die MLC2V nur durch eine Bande repräsentiert wird, trennt sie sich in einem zweidimensionalen Gel, abhängig vom gewählten pH-Bereich der isoelektrischen Fokussierung, in gleicher Höhe in bis zu vier „spots“ auf. Dabei handelt es sich (vom höheren zum niedrigeren pH-Wert) um die MLC2V-b-Isoform im nichtphosphorylierten Zustand, die MLC2V-a-Isoform im nichtphosphorylierten Zustand, die phosphorylierte MLC2V-b-Isoform und die phosphorylierte MLC2V-a-Isoform (169). Durch die zweidimensionale Auftrennung können also neben Untersuchungen zu Proteinmodifikationen auch Untersuchungen zum Verhältnis der Isoformen zueinander durchgeführt werden. Die Zuordnung der Proteine zu den im Rahmen dieser Arbeit detektierten Spots erfolgte sowohl mit Hilfe von Internetdatenbanken (SWISS-2D PAGE, Heart-2D Page (155)) als auch durch massenspektroskopische Analysen (s. 3.3.5.). Dabei konnten wir, ausgehend von den Literaturdaten und den berechneten phosphorylierten Peptidmassen drei Isoformen nachweisen: die nicht phosphorylierte MLC2V-b-Isoform, die phosphorylierte MLC2V-b-Isoform und die unphosphorylierte MLC2V-a-Isoform. Der Spot für die phosphorylierte MLC2V-a-Isoform wurde aufgrund seiner schwachen Präsenz im 2D-Gel nicht massenspektroskopisch untersucht.

Am insuffizienten Herzen konnte in den letzten Jahren eine Störung des Verhältnisses zwischen phosphorylierter und dephosphorylierter MLC2V nachgewiesen werden. Durch quantitative Analysen der Spots für die phosphorylierten und nicht phosphorylierten Isoformen der MLC2V wurde von van der Velden et al. eine gegenüber gesundem Herzgewebe verminderte Phosphorylierung gefunden (169; 170). Die Phosphorylierung der MLC2V-b war dabei von 32 % auf 18 % gesunken, während die phosphorylierte MLC2V-a-Isoform keine Änderungen aufwies. Bei Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz wurde in 25 % der Fälle eine komplette Dephosphorylierung beider MLC2V-Isoformen nachgewiesen (25) und in hypertensiven Ratten wurde ein stark erniedrigter Spiegel an phosphorylierter MLC2V gefunden (171). Wurde demgegenüber der Phosphorylierungsstatus der MLC2V in Ratten untersucht, welche über lange Zeit einem Lauftraining unterlagen, war der Phosphorylierungslevel der MLC2V gegenüber nicht trainierten Tieren erhöht (172). Untersuchungen zur funktionellen Rolle der Phosphorylierung der MLC2V ergaben, daß bei einer erhöhten Phosphorylierung die Bindungsrate zwischen Aktin- und Myosinmolekül und damit auch die Ca^{2+} -Sensitivität erhöht wird (27; 28). Dies alles deutet auf einen Zusammenhang zwischen einer abnormalen (verringerten) MLC2V-Phosphorylierung und dem Bild einer myokardialen Insuffizienz hin und es wird vermutet, daß eine Erhöhung des Phosphorylierungsspiegels ein adaptiver Mechanismus zur Verbesserung der Herzmuskelleistung ist. Bei aller Vorsicht bezüglich der Interpretation der Versuchsergebnisse konnten wir keine signifikante quantitative Änderung der phosphorylierten und nicht phosphorylierten Isoformen finden. Die massenspektroskopische Analyse deutet jedoch einen Unterschied in der Anzahl der Phosphorylierungen pro MLC2V-Molekül an. Laut Literatur wird die MLC2V am Serin 14 monophosphoryliert (23), es wurden aber auch schon Diphosphorylierungen (Ser14 und Ser18) beschrieben (173). Die von uns vorgenommenen massenspektrometrischen Untersuchungen des MLC2V-Proteins nach Trypsinverdau zeigten neben den zuordenbaren Peptidmassen auch Peptide, welche anhand ihrer Massendifferenzen bestimmten Modifikationen zugeordnet werden konnten. Diese Berechnungen ergaben bei der IDCM im Vergleich zum gesunden Kontrollherzen eine Triphosphorylierung an den Aminosäureresten Ser14, Ser18 und Thr23. Diese erhöhte Phosphorylierung pro Molekül wurde bisher nicht beschrieben und könnte ein interessanter Anpassungsmechanismus sein, um trotz geringerer Molekülanzahl einen erhöhten Phosphorylierungsstatus der MLC2V zu erzielen und damit die Ca^{2+} -Sensitivität zu erhöhen und die Kontraktilität zu verbessern. Da die erhöhte Phosphorylierung bisher nur rechnerisch ermittelt wurde, muß in einem nächsten Schritt eine experimentelle Bestätigung folgen. Dafür sollen künftig Gewebeproben einer

größeren Patientenzahl wiederum zweidimensional aufgetrennt werden. Die entsprechenden Spots sollen aus dem Gel isoliert, mit Trypsin verdaut und massenspektrometrisch untersucht werden.

Neben der veränderten Phosphorylierbarkeit der MLC2V wurde auch ein Unterschied im Bereich des Molekulargewichts detektiert. Dabei handelt es sich um eine Verschiebung der MLC2V in den IDCM-Proben um circa 1,2 kDa in den höhermolekularen Bereich. Diese Verschiebung konnte visualisiert werden, indem die Proteinpopulationen jeweils eines IDCM-Patienten und einer Kontrollprobe verschieden fluoreszenzmarkiert und dann vermischt und gemeinsam in einem Gel aufgetrennt wurden. So konnte die höchste Vergleichbarkeit der gesunden und kranken Probe erzielt werden, da versuchsbedingte Abweichungen während der Behandlung und Auftrennung wegfielen. Eine Verschiebung der zuordenbaren Spots der gesunden und kranken Proteinpopulation war hierbei kein allgemeines Bild, sondern beschränkte sich auf die Isoformen der MLC2V. Eine Ladungsänderung der Proteine liegt dabei nicht vor, da es keine Verschiebung des isoelektrischen Punktes gibt. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind laut Herstellerangaben (Protein Labeling Kit Manual, Molecular Probes) neutral und haben keinen Einfluß auf das Verhalten der Proteine. Ein Fluoreszenzmolekül kann jeweils nur an eine primäre Aminosäure binden, womit die Anzahl der Fluoreszenzmoleküle pro Proteinmolekül beschränkt ist. Möglicherweise verfügt die MLC2V der IDCM-Proben über zusätzliche freie Aminogruppen, die die Bindung von mehr Fluoreszenzmolekülen pro MLC2V-Molekül erlauben. Dies würde eine Verschiebung des Molekulargewichts der MLC2V, jedoch nicht des isoelektrischen Punktes bewirken. Es wäre auch eine Erklärung dafür, daß über eine Veränderung der MLC2V in den IDCM-Proben bisher nicht berichtet wurde, da in den veröffentlichten Studien über die Expression von Proteinen bei IDCM nicht mit fluoreszenzmarkierten Proben gearbeitet wurde. Eine mögliche andere Erklärung für das veränderte Laufverhalten der MLC2V wäre eine neutrale Modifikation wie eine Acetylierung oder die Bindung von Fettsäureketten. Eine Komplexierung mit anderen Proteinen/Peptiden ist nicht möglich, da die Bindung von Proteinen untereinander durch die Versuchsbedingungen ausgeschlossen wurde. Ob ein fehlerhaftes MLC2V-Protein vorliegt und welche Modifikation unter welchen Bedingungen nachweisbar ist, soll in künftigen massenspektrometrischen Analysen weiter untersucht werden. Sollte es sich herausstellen, daß die MLC2V in den IDCM-Proben tatsächlich anders modifiziert ist, könnte dies ein neuer Ansatzpunkt für das Versagen der Myozyten im Rahmen der IDCM sein. Die Modifizierung eines Proteins kann dessen physiologische Rolle in der Zelle und die Interaktion mit anderen Proteinen stark beeinflussen, und die MLC2V könnte

durch ihre essentielle Beteiligung am exakt funktionierenden Myosinmolekül in modifizierter Form zum Versagen des Kontraktionszyklus beitragen.

Abschließend betrachtet, kann der MLC2V eine Rolle in der Pathophysiologie der IDCM zugeordnet werden. Unter den Kandidatengen der Subtraktiven Hybridisierung gelang es, mit der MLC2V ein neues Gen der Sarkomerstruktur, welches bisher nicht mit der IDCM in Zusammenhang gebracht wurde, zu identifizieren. Es wurden im Hinblick auf die MLC2V neue Ansatzpunkte gefunden, welche durch weiterführende Untersuchungen eine Rolle in der Diagnostik der IDCM einnehmen könnten. Die Veränderungen auf mRNA-Ebene lassen sich von Herzerkrankungen abgrenzen, die nicht primär kardialer Ursache sind. Zwar stellt sich kein einheitliches Bild einer Beteiligung der MLC2V an der Auslösung/Progression der Pathogenese der IDCM dar, jedoch kann dies als Zeichen eines heterogenen pathogenetischen Prozesses gedeutet werden. Es war möglich zu zeigen, daß der MLC2V durch autoimmune Vorgänge sowie der MLC1V durch Mutation zumindest in Einzelfällen eine wahrscheinliche Beteiligung an der Pathophysiologie der IDCM zugesprochen werden kann. Zudem deutet sich eine veränderte Modifizierung des MLC2V-Proteins bei der IDCM an. Ob die erhöhte MLC2V-Transkription ein Ausdruck für den Bedarf der Myozyten ist, sich an eine erhöhte Pumpleistung des Herzens anzupassen, einen initiierenden Einfluß auf den Untergang der Myozyten hat oder nur ein Epiphänomen anderer metabolischer Veränderungen darstellt, muß durch weiterführende Untersuchungen noch geklärt werden.

5. Anhang

5.1. Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	<i>Aqua destille</i> , destilliertes Wasser
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bAE3	<i>brain anion exchanger 3</i> , Anionentransporter im Gehirn
bp	Basenpaar
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoylphosphat
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinderserumalbumin
Ca ²⁺	Kalzium-Ion
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	Cholamidopropyl-Dimethylammonio-Propansulfonat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CY5	Cyanine 5
DAB	Diaminobenzidin
DCM	dilatative Kardiomyopathie
ddF	<i>dideoxy-Fingerprinting</i> , genetischer Fingerabdruck
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay</i> , Enzym-gekoppelter Immunabsorptionstest
Em	Emission (Ausstrahlung)
EST	<i>expressed sequence tags</i> , exprimierte Sequenzabschnitte
EtOH	Ethanol
Ex	Excitation (Anregung)

FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Gln	Glutamin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCM	Hypertrophische Kardiomyopathie
HF-Polymerase	<i>High Fidelity</i> -Polymerase, Polymerase mit hoher Genauigkeit
His-tag	Hexa-Histidinsequenz
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cell</i> , Nabelschnurendothelzellen des Menschen
IDCM	idiopathische dilatative Kardiomyopathie
IEF	isoelektrische Fokussierung
IP	isoelektrischer Punkt
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactosid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KHK	koronare Herzkrankheit
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i> , Hämocyanin der Schlüssellochschnecke
Leu	Leucin
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i> , Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisations-Massenspektroskopie
min	Minute
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
NBT	Nitroblautetrazolium
Ni-NTA	Nickel-Trinitrilessigsäure
NO	Stickstoffmonoxid
NTP	Nukleotidtriphosphat
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PNPP	p-Nitrophenylphosphat

PVDF	Polyvinylidifluorid
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , Einzelnukleotid- polymorphismus
T _A	<i>Annealing</i> -Temperatur (Schmelztemperatur)
TBP	Tribotylphosphan
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
u	<i>unit</i> , Einheit
UTR	<i>Untranslated Region</i> , nicht translatierte Region
UV	Ultraviolett
4-VP	4-Vinylpyridine
wE	willkürliche Einheiten
z. B.	zum Beispiel

5.2. Literaturverzeichnis

1. Betz E, Reutter K, Mecke D and Ritter H (1997). *Biologie des Menschen*. Wiesbaden, Quelle & Meyer Verlag.
2. Kleinig H and Sitte P (1999). *Zellbiologie*. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag.
3. Lodish H, Berk A, Zipursky S, P M, D B and J D (2000). *Molecular Cell Biology*. New York, Freeman and Company.
4. Tardiff JC (2004). *Myosin at the heart of the problem*. N Engl J Med 351(5): 424-6.
5. Berg JS, Powell BC and Cheney RE (2001). *A millennial myosin census*. Mol Biol Cell 12(4): 780-94.
6. Uyeda TQ, Abramson PD and Spudich JA (1996). *The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement*. Proc Natl Acad Sci U S A 93(9): 4459-64.
7. Moncrief ND, Kretsinger RH and Goodman M (1990). *Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. I. Relationships based on amino acid sequences*. J Mol Evol 30(6): 522-62.
8. Bouvagnet P, Leger J, Pons F, Dechesne C and Leger JJ (1984). *Fiber types and myosin types in human atrial and ventricular myocardium. An anatomical description*. Circ Res 55(6): 794-804.
9. Ritter O, Luther HP, Haase H, Baltas LG, Baumann G, Schulte HD and Morano I (1999). *Expression of atrial myosin light chains but not alpha-myosin heavy chains is correlated in vivo with increased ventricular function in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy*. J Mol Med 77(9): 677-85.
10. Fodor WL, Darras B, Seharaseyon J, Falkenthal S, Francke U and Vanin EF (1989). *Human ventricular/slow twitch myosin alkali light chain gene characterization, sequence, and chromosomal location*. J Biol Chem 264(4): 2143-9.
11. Seharaseyon J, Bober E, Hsieh CL, Fodor WL, Francke U, Arnold HH and Vanin EF (1990). *Human embryonic/atrial myosin alkali light chain gene: characterization, sequence, and chromosomal location*. Genomics 7(2): 289-93.
12. Macera MJ, Szabo P, Wadgaonkar R, Siddiqui MA and Verma RS (1992). *Localization of the gene coding for ventricular myosin regulatory light chain (MYL2) to human chromosome 12q23-q24.3*. Genomics 13(3): 829-31.
13. Hailstones D, Barton P, Chan-Thomas P, Sasse S, Sutherland C, Hardeman E and Gunning P (1992). *Differential regulation of the atrial isoforms of the myosin light chains during striated muscle development*. J Biol Chem 267(32): 23295-300.
14. Price KM, Littler WA and Cummins P (1980). *Human atrial and ventricular myosin light-chains subunits in the adult and during development*. Biochem J 191(2): 571-80.

15. Morano I, Hadicke K, Grom S, Koch A, Schwinger RH, Bohm M, Bartel S, Erdmann E and Krause EG (1994). *Titin, myosin light chains and C-protein in the developing and failing human heart*. J Mol Cell Cardiol 26(3): 361-8.
16. Trayer IP, Trayer HR and Levine BA (1987). *Evidence that the N-terminal region of A1-light chain of myosin interacts directly with the C-terminal region of actin. A proton magnetic resonance study*. Eur J Biochem 164(1): 259-66.
17. Morano I, Hadicke K, Haase H, Bohm M, Erdmann E and Schaub MC (1997). *Changes in essential myosin light chain isoform expression provide a molecular basis for isometric force regulation in the failing human heart*. J Mol Cell Cardiol 29(4): 1177-87.
18. Morano M, Zacharzowski U, Maier M, Lange PE, Alexi-Meskishvili V, Haase H and Morano I (1996). *Regulation of human heart contractility by essential myosin light chain isoforms*. J Clin Invest 98(2): 467-73.
19. Patel JR, Diffie GM and Moss RL (1996). *Myosin regulatory light chain modulates the Ca²⁺ dependence of the kinetics of tension development in skeletal muscle fibers*. Biophys J 70(5): 2333-40.
20. Reinach FC, Nagai K and Kendrick-Jones J (1986). *Site-directed mutagenesis of the regulatory light-chain Ca²⁺/Mg²⁺ binding site and its role in hybrid myosins*. Nature 322(6074): 80-3.
21. Gulick J, Hewett TE, Klevitsky R, Buck SH, Moss RL and Robbins J (1997). *Transgenic remodeling of the regulatory myosin light chains in the mammalian heart*. Circ Res 80(5): 655-64.
22. Pawloski-Dahm CM, Song G, Kirkpatrick DL, Palermo J, Gulick J, Dorn GW, 2nd, Robbins J and Walsh RA (1998). *Effects of total replacement of atrial myosin light chain-2 with the ventricular isoform in atrial myocytes of transgenic mice*. Circulation 97(15): 1508-13.
23. Adelstein RS and Eisenberg E (1980). *Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction*. Annu Rev Biochem 49: 921-56.
24. Sanbe A, Fewell JG, Gulick J, Osinska H, Lorenz J, Hall DG, Murray LA, Kimball TR, Witt SA and Robbins J (1999). *Abnormal cardiac structure and function in mice expressing nonphosphorylatable cardiac regulatory myosin light chain 2*. J Biol Chem 274(30): 21085-94.
25. Morano I (1992). *Effects of different expression and posttranslational modifications of myosin light chains on contractility of skinned human cardiac fibers*. Basic Res Cardiol 87 Suppl 1: 129-41.
26. Frearson N and Perry SV (1975). *Phosphorylation of the light-chain components of myosin from cardiac and red skeletal muscles*. Biochem J 151(1): 99-107.

27. Persechini A, Stull JT and Cooke R (1985). *The effect of myosin phosphorylation on the contractile properties of skinned rabbit skeletal muscle fibers*. J Biol Chem 260(13): 7951-4.
28. Morano I, Hofmann F, Zimmer M and Ruegg JC (1985). *The influence of P-light chain phosphorylation by myosin light chain kinase on the calcium sensitivity of chemically skinned heart fibres*. FEBS Lett 189(2): 221-4.
29. Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KK, Murabito JM and Vasan RS (2002). *Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure*. N Engl J Med 347(18): 1397-402.
30. Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfas I, Martin I and Nordet P (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(5): 841-2.
31. Sigusch HH, Reinhardt D and Figulla HR (1998). *[Clinical picture and differential diagnosis of cardiomyopathy and myocarditis]*. Med Klin 93(4): 236-9.
32. Manolio TA, Baughman KL, Rodeheffer R, Pearson TA, Bristow JD, Michels VV, Abelmann WH and Harlan WR (1992). *Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy (summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute workshop)*. Am J Cardiol 69(17): 1458-66.
33. Thierfelder L (1998). *[Genetics of dilated cardiomyopathy]*. Med Klin 93(4): 210-4.
34. Gillum RF (1986). *Idiopathic cardiomyopathy in the United States, 1970-1982*. Am Heart J 111(4): 752-5.
35. Sugrue DD, Rodeheffer RJ, Codd MB, Ballard DJ, Fuster V and Gersh BJ (1992). *The clinical course of idiopathic dilated cardiomyopathy. A population-based study*. Ann Intern Med 117(2): 117-23.
36. Knippers R, Phillippsen P, Schäfer K and Fanning E (1990). *Molekulare Genetik*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
37. Henning W (2002). *Genetik*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.
38. Lewin B (2002). *Molekularbiologie der Gene*. Heidelberg Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
39. Bowles KR and Bowles NE (2004). *Genetics of inherited cardiomyopathies*. Expert Rev Cardiovasc Ther 2(5): 683-97.
40. Baig MK, Goldman JH, Caforio AL, Coonar AS, Keeling PJ and McKenna WJ (1998). *Familial dilated cardiomyopathy: cardiac abnormalities are common in asymptomatic relatives and may represent early disease*. J Am Coll Cardiol 31(1): 195-201.

41. Graham RM and Owens WA (1999). *Pathogenesis of inherited forms of dilated cardiomyopathy*. N Engl J Med 341(23): 1759-62.
42. Grunig E, Tasman JA, Kucherer H, Franz W, Kubler W and Katus HA (1998). *Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy*. J Am Coll Cardiol 31(1): 186-94.
43. Michels VV, Moll PP, Miller FA, Tajik AJ, Chu JS, Driscoll DJ, Burnett JC, Rodeheffer RJ, Chesebro JH and Tazelaar HD (1992). *The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy*. N Engl J Med 326(2): 77-82.
44. Franz WM, Cremer M, Herrmann R, Grunig E, Fogel W, Scheffold T, Goebel HH, Kircheisen R, Kubler W, Voit T and et al. (1995). *X-linked dilated cardiomyopathy. Novel mutation of the dystrophin gene*. Ann N Y Acad Sci 752: 470-91.
45. Muntoni F, Cau M, Ganau A, Congiu R, Arvedi G, Mateddu A, Marrosu MG, Cianchetti C, Realdi G, Cao A and et al. (1993). *Brief report: deletion of the dystrophin muscle-promoter region associated with X-linked dilated cardiomyopathy*. N Engl J Med 329(13): 921-5.
46. Towbin JA, Hejtmancik JF, Brink P, Gelb B, Zhu XM, Chamberlain JS, McCabe ER and Swift M (1993). *X-linked dilated cardiomyopathy. Molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus*. Circulation 87(6): 1854-65.
47. Michels VV, Pastores GM, Moll PP, Driscoll DJ, Miller FA, Burnett JC, Rodeheffer RJ, Tajik JA, Beggs AH, Kunkel LM and et al. (1993). *Dystrophin analysis in idiopathic dilated cardiomyopathy*. J Med Genet 30(11): 955-7.
48. Chen J and Chien KR (1999). *Complexity in simplicity: monogenic disorders and complex cardiomyopathies*. J Clin Invest 103(11): 1483-5.
49. Nigro V, Okazaki Y, Belsito A, Piluso G, Matsuda Y, Politano L, Nigro G, Ventura C, Abbondanza C, Molinari AM, Acampora D, Nishimura M, Hayashizaki Y and Puca GA (1997). *Identification of the Syrian hamster cardiomyopathy gene*. Hum Mol Genet 6(4): 601-7.
50. Fatkin D, MacRae C, Sasaki T, Wolff MR, Porcu M, Frenneaux M, Atherton J, Vidaillet HJ, Jr., Spudich S, De Girolami U, Seidman JG, Seidman C, Muntoni F, Muehle G, Johnson W and McDonough B (1999). *Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease*. N Engl J Med 341(23): 1715-24.
51. Li D, Tapscoft T, Gonzalez O, Burch PE, Quinones MA, Zoghbi WA, Hill R, Bachinski LL, Mann DL and Roberts R (1999). *Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy*. Circulation 100(5): 461-4.
52. Maeda M, Holder E, Lowes B, Valent S and Bies RD (1997). *Dilated cardiomyopathy associated with deficiency of the cytoskeletal protein metavinculin*. Circulation 95(1): 17-20.

53. Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, Tai YS and Keating MT (1998). *Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure*. Science 280(5364): 750-2.
54. Kamisago M, Sharma SD, DePalma SR, Solomon S, Sharma P, McDonough B, Smoot L, Mullen MP, Woolf PK, Wigle ED, Seidman JG and Seidman CE (2000). *Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy*. N Engl J Med 343(23): 1688-96.
55. Ibdah JA, Bennett MJ, Rinaldo P, Zhao Y, Gibson B, Sims HF and Strauss AW (1999). *A fetal fatty-acid oxidation disorder as a cause of liver disease in pregnant women*. N Engl J Med 340(22): 1723-31.
56. Bonnet D, de Lonlay P, Gautier I, Rustin P, Rotig A, Kachaner J, Acar P, LeBidois J, Munnich A and Sidi D (1998). *Efficiency of metabolic screening in childhood cardiomyopathies*. Eur Heart J 19(5): 790-3.
57. Li YY, Maisch B, Rose ML and Hengstenberg C (1997). *Point mutations in mitochondrial DNA of patients with dilated cardiomyopathy*. J Mol Cell Cardiol 29(10): 2699-709.
58. Suomalainen A, Paetau A, Leinonen H, Majander A, Peltonen L and Somer H (1992). *Inherited idiopathic dilated cardiomyopathy with multiple deletions of mitochondrial DNA*. Lancet 340(8831): 1319-20.
59. Modrow S, Falke D and Truyen U (2002). *Molekulare Virologie*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
60. Bowles NE and Towbin JA (2000). *Molecular Aspects of Myocarditis*. Curr Infect Dis Rep 2(4): 308-314.
61. Henke A, Nain M, Stelzner A and Gemsa D (1991). *Induction of cytokine release from human monocytes by coxsackievirus infection*. Eur Heart J 12 Suppl D: 134-6.
62. Stille-Siegener M, Heim A and Figulla HR (1995). *Subclassification of dilated cardiomyopathy and interferon treatment*. Eur Heart J 16 Suppl O: 147-9.
63. Figulla HR, Stille-Siegener M, Mall G, Heim A and Kreuzer H (1995). *Myocardial enterovirus infection with left ventricular dysfunction: a benign disease compared with idiopathic dilated cardiomyopathy*. J Am Coll Cardiol 25(5): 1170-5.
64. Bowles NE, Richardson PJ, Olsen EG and Archard LC (1986). *Detection of Coxsackie-B-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy*. Lancet 1(8490): 1120-3.
65. Kandolf R, Ameis D, Kirschner P, Canu A and Hofschneider PH (1987). *In situ detection of enteroviral genomes in myocardial cells by nucleic acid hybridization: an approach to the diagnosis of viral heart disease*. Proc Natl Acad Sci U S A 84(17): 6272-6.

66. Wessely R, Henke A, Zell R, Kandolf R and Knowlton KU (1998). *Low-level expression of a mutant coxsackieviral cDNA induces a myocytopathic effect in culture: an approach to the study of enteroviral persistence in cardiac myocytes*. *Circulation* 98(5): 450-7.
67. Sasse A, Wallich M, Ding Z, Goedecke A and Schrader J (2003). *Coxsackie-and-adenovirus receptor mRNA expression in human heart failure*. *J Gene Med* 5(10): 876-82.
68. Badorff C, Lee GH, Lamphear BJ, Martone ME, Campbell KP, Rhoads RE and Knowlton KU (1999). *Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy*. *Nat Med* 5(3): 320-6.
69. Lotze U BJ, Glück B, Sigusch H, Kühnert H, Dannberg G, Stelzner A (1998). *Erniedrigte Apoptoserate bei Enterovirus-assoziiierter dilatativer Kardiomyopathie*. *Z Kardiol* 87(Suppl 1): 159.
70. Why HJ, Meany BT, Richardson PJ, Olsen EG, Bowles NE, Cunningham L, Freeke CA and Archard LC (1994). *Clinical and prognostic significance of detection of enteroviral RNA in the myocardium of patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy*. *Circulation* 89(6): 2582-9.
71. Pauschinger M, Bowles NE, Fuentes-Garcia FJ, Pham V, Kuhl U, Schwimmbeck PL, Schultheiss HP and Towbin JA (1999). *Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction*. *Circulation* 99(10): 1348-54.
72. Pankuweit S, Hufnagel G, Eckhardt H, Herrmann H, Uttecht S and Maisch B (1998). *[Cardiotropic DNA viruses and bacteria in the pathogenesis of dilated cardiomyopathy with or without inflammation]*. *Med Klin (Munich)* 93(4): 223-8.
73. Schonian U, Crombach M, Maser S and Maisch B (1995). *Cytomegalovirus-associated heart muscle disease*. *Eur Heart J* 16 Suppl O: 46-9.
74. Grumbach IM, Heim A, Pring-Akerblom P, Vonhof S, Hein WJ, Muller G and Figulla HR (1999). *Adenoviruses and enteroviruses as pathogens in myocarditis and dilated cardiomyopathy*. *Acta Cardiol* 54(2): 83-8.
75. Devaux B, Scholz D, Hirche A, Klovekorn WP and Schaper J (1997). *Upregulation of cell adhesion molecules and the presence of low grade inflammation in human chronic heart failure*. *Eur Heart J* 18(3): 470-9.
76. Kuhl U, Seeberg B, Schultheiss HP and Strauer BE (1994). *Immunohistological characterization of infiltrating lymphocytes in biopsies of patients with clinically suspected dilated cardiomyopathy*. *Eur Heart J* 15 Suppl C: 62-7.
77. Kuhl U, Noutsias M and Schultheiss HP (1995). *Immunohistochemistry in dilated cardiomyopathy*. *Eur Heart J* 16 Suppl O: 100-6.
78. Janeway C, Jr and Travers P (1996). *Immunobiology*. London, Current Biology Ltd./Garland Publishing Inc.

79. Portig I, Pankuweit S and Maisch B (1997). *Antibodies against stress proteins in sera of patients with dilated cardiomyopathy*. J Mol Cell Cardiol 29(8): 2245-51.
80. Latif N, Baker CS, Dunn MJ, Rose ML, Brady P and Yacoub MH (1993). *Frequency and specificity of antiheart antibodies in patients with dilated cardiomyopathy detected using SDS-PAGE and western blotting*. J Am Coll Cardiol 22(5): 1378-84.
81. Caforio AL, Grazzini M, Mann JM, Keeling PJ, Bottazzo GF, McKenna WJ and Schiaffino S (1992). *Identification of alpha- and beta-cardiac myosin heavy chain isoforms as major autoantigens in dilated cardiomyopathy*. Circulation 85(5): 1734-42.
82. Fu LX, Magnusson Y, Bergh CH, Liljeqvist JA, Waagstein F, Hjalmarson A and Hoebcke J (1993). *Localization of a functional autoimmune epitope on the muscarinic acetylcholine receptor-2 in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy*. J Clin Invest 91(5): 1964-8.
83. Limas CJ, Limas C, Kubo SH and Olivari MT (1990). *Anti-beta-receptor antibodies in human dilated cardiomyopathy and correlation with HLA-DR antigens*. Am J Cardiol 65(7): 483-7.
84. Wallukat G, Morwinski M, Kowal K, Forster A, Boewer V and Wollenberger A (1991). *Autoantibodies against the beta-adrenergic receptor in human myocarditis and dilated cardiomyopathy: beta-adrenergic agonism without desensitization*. Eur Heart J 12 Suppl D: 178-81.
85. Eckert R, Randall D and Augustine G (1993). *Tierphysiologie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
86. Bristow MR (1984). *The adrenergic nervous system in heart failure*. N Engl J Med 311(13): 850-1.
87. Weber KT (1997). *Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation*. Circulation 96(11): 4065-82.
88. Galatius-Jensen S, Wroblewski H, Emmeluth C, Bie P, Haunso S and Kastrup J (1996). *Plasma endothelin in congestive heart failure: a predictor of cardiac death?* J Card Fail 2(2): 71-6.
89. Cleland JG and Morgan K (1996). *Inhibition of the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure: new insights from basic clinical research*. Curr Opin Cardiol 11(3): 252-62.
90. Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJ, Jr., Michael LH, Didenko VV, Hornsby PJ, Seta Y, Oral H, Spinale FG and Mann DL (1998). *Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor-alpha promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats*. Circulation 97(14): 1382-91.
91. Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM and Shusterman NH (1996). *The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients*

- with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. N Engl J Med* 334(21): 1349-55.
92. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J and Wittes J (1999). *The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. N Engl J Med* 341(10): 709-17.
 93. Kelly RA and Smith TW (1997). *Cytokines and cardiac contractile function. Circulation* 95(4): 778-81.
 94. Ferrari R, Bachetti T, Confortini R, Opasich C, Febo O, Corti A, Cassani G and Visioli O (1995). *Tumor necrosis factor soluble receptors in patients with various degrees of congestive heart failure. Circulation* 92(6): 1479-86.
 95. Yokoyama T, Vaca L, Rossen RD, Durante W, Hazarika P and Mann DL (1993). *Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. J Clin Invest* 92(5): 2303-12.
 96. Liu S and Schreur KD (1995). *G protein-mediated suppression of L-type Ca²⁺ current by interleukin-1 beta in cultured rat ventricular myocytes. Am J Physiol* 268(2 Pt 1): C339-49.
 97. Matsushima K, Larsen CG, DuBois GC and Oppenheim JJ (1989). *Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. J Exp Med* 169(4): 1485-90.
 98. Seino Y, Ikeda U, Takahashi M, Hojo Y, Irokawa M, Kasahara T and Shimada K (1995). *Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in vascular tissue. Cytokine* 7(6): 575-9.
 99. Lehmann MH, Kuhnert H, Muller S and Sigusch HH (1998). *Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) gene expression in dilated cardiomyopathy. Cytokine* 10(10): 739-46.
 100. Reithmann C, Gierschik P, Werdan K and Jakobs KH (1991). *Tumor necrosis factor alpha up-regulates Gi alpha and G beta proteins and adenylyl cyclase responsiveness in rat cardiomyocytes. Eur J Pharmacol* 206(1): 53-60.
 101. Satoh M, Nakamura M, Tamura G, Makita S, Segawa I, Tashiro A, Satodate R and Hiramori K (1997). *Inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha in myocardium in human dilated cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol* 29(4): 716-24.
 102. Bryant D, Becker L, Richardson J, Shelton J, Franco F, Peshock R, Thompson M and Giroir B (1998). *Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor-alpha. Circulation* 97(14): 1375-81.
 103. Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, Slawson SE, Lemster BH, Koretsky AP, Demetris AJ and Feldman AM (1997). *Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha. Circ Res* 81(4): 627-35.

104. Tyagi SC, Kumar S, Voelker DJ, Reddy HK, Janicki JS and Curtis JJ (1996). *Differential gene expression of extracellular matrix components in dilated cardiomyopathy*. J Cell Biochem 63(2): 185-98.
105. Hwang DM, Dempsey AA, Wang RX, Rezvani M, Barrans JD, Dai KS, Wang HY, Ma H, Cukerman E, Liu YQ, Gu JR, Zhang JH, Tsui SK, Wayne MM, Fung KP, Lee CY and Liew CC (1997). *A genome-based resource for molecular cardiovascular medicine: toward a compendium of cardiovascular genes*. Circulation 96(12): 4146-203.
106. Flavigny J, Richard P, Isnard R, Carrier L, Charron P, Bonne G, Forissier JF, Desnos M, Dubourg O, Komajda M, Schwartz K and Hainque B (1998). *Identification of two novel mutations in the ventricular regulatory myosin light chain gene (MYL2) associated with familial and classical forms of hypertrophic cardiomyopathy*. J Mol Med 76(3-4): 208-14.
107. Poetter K, Jiang H, Hassanzadeh S, Master SR, Chang A, Dalakas MC, Rayment I, Sellers JR, Fananapazir L and Epstein ND (1996). *Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle*. Nat Genet 13(1): 63-9.
108. Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A 74(12): 5463-7.
109. Corbett JM, Why HJ, Wheeler CH, Richardson PJ, Archard LC, Yacoub MH and Dunn MJ (1998). *Cardiac protein abnormalities in dilated cardiomyopathy detected by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*. Electrophoresis 19(11): 2031-42.
110. Ku L, Feiger J, Taylor M and Mestroni L (2003). *Cardiology patient page. Familial dilated cardiomyopathy*. Circulation 108(17): e118-21.
111. Margossian SS, White HD, Caulfield JB, Norton P, Taylor S and Slayter HS (1992). *Light chain 2 profile and activity of human ventricular myosin during dilated cardiomyopathy. Identification of a causal agent for impaired myocardial function*. Circulation 85(5): 1720-33.
112. Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED and Siebert PD (1996). *Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries*. Proc Natl Acad Sci U S A 93(12): 6025-30.
113. von Stein OD, Thies WG and Hofmann M (1997). *A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes*. Nucleic Acids Res 25(13): 2598-602.
114. Sager R (1997). *Expression genetics in cancer: shifting the focus from DNA to RNA*. Proc Natl Acad Sci U S A 94(3): 952-5.
115. Morano I (1999). *Tuning the human heart molecular motors by myosin light chains*. J Mol Med 77(7): 544-55.

116. Takahashi K, Azuma M, Yamada T, Ohyabu Y, Schaffer SW and Azuma J (2003). *Taurine transporter in primary cultured neonatal rat heart cells: a comparison between cardiac myocytes and nonmyocytes*. *Biochem Pharmacol* 65(7): 1181-7.
117. Ihl-Vahl R, Marquetant R, Bremerich J and Strasser RH (1995). *Regulation of beta-adrenergic receptors in acute myocardial ischemia: subtype-selective increase of mRNA specific for beta 1-adrenergic receptors*. *J Mol Cell Cardiol* 27(1): 437-52.
118. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G and Watson R (1993). *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*. *Biotechnology (N Y)* 11(9): 1026-30.
119. Morrison TB, Weis JJ and Wittwer CT (1998). *Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification*. *Biotechniques* 24(6): 954-8, 960, 962.
120. Wickenden C, Malcolm AD, Byrne M, Smith C, Anderson MC and Coleman DV (1987). *Prevalence of HPV DNA and viral copy numbers in cervical scrapes from women with normal and abnormal cervixes*. *J Pathol* 153(2): 127-35.
121. Yan Y, Mahotka C, Heikaus S, Shibata T, Wethkamp N, Liebmann J, Suschek CV, Guo Y, Gabbert HE, Gerharz CD and Ramp U (2004). *Disturbed balance of expression between XIAP and Smac/DIABLO during tumour progression in renal cell carcinomas*. *Br J Cancer*.
122. Mühlhardt C (2002). *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Heidelberg Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
123. Schena M, Shalon D, Davis RW and Brown PO (1995). *Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray*. *Science* 270(5235): 467-70.
124. Shalon D, Smith SJ and Brown PO (1996). *A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization*. *Genome Res* 6(7): 639-45.
125. Jougasaki M, Yasue H, Okumura K, Mukoyama M, Saito Y, Nakao K and Takahashi K (1989). *Atrial natriuretic peptide in the ventricles of patients with dilated cardiomyopathy and human fetuses*. *Histochem J* 21(12): 715-20.
126. Saito Y, Nakao K, Arai H, Sugawara A, Morii N, Yamada T, Itoh H, Shiono S, Mukoyama M, Obata K and et al. (1987). *Atrial natriuretic polypeptide (ANP) in human ventricle. Increased gene expression of ANP in dilated cardiomyopathy*. *Biochem Biophys Res Commun* 148(1): 211-7.
127. Ramachandruni S, Handberg E and Sheps DS (2004). *Acute and chronic psychological stress in coronary disease*. *Curr Opin Cardiol* 19(5): 494-9.
128. Liu X, Shao Q and Dhalla NS (1995). *Myosin light chain phosphorylation in cardiac hypertrophy and failure due to myocardial infarction*. *J Mol Cell Cardiol* 27(12): 2613-21.

129. Kopp SJ and Barany M (1979). *Phosphorylation of the 19,000-dalton light chain of myosin in perfused rat heart under the influence of negative and positive inotropic agents*. J Biol Chem 254(23): 1207-12.
130. Henderson SA, Spencer M, Sen A, Kumar C, Siddiqui MA and Chien KR (1989). *Structure, organization, and expression of the rat cardiac myosin light chain-2 gene. Identification of a 250-base pair fragment which confers cardiac-specific expression*. J Biol Chem 264(30): 18142-8.
131. Ross J, Jr. (2002). *Dilated cardiomyopathy: concepts derived from gene deficient and transgenic animal models*. Circ J 66(3): 219-24.
132. Ritter O, Haase H, Schulte HD, Lange PE and Morano I (1999). *Remodeling of the hypertrophied human myocardium by cardiac bHLH transcription factors*. J Cell Biochem 74(4): 551-61.
133. Olson TM, Karst ML, Whitby FG and Driscoll DJ (2002). *Myosin light chain mutation causes autosomal recessive cardiomyopathy with mid-cavitary hypertrophy and restrictive physiology*. Circulation 105(20): 2337-40.
134. Lee W, Hwang TH, Kimura A, Park SW, Satoh M, Nishi H, Harada H, Toyama J and Park JE (2001). *Different expressivity of a ventricular essential myosin light chain gene Ala57Gly mutation in familial hypertrophic cardiomyopathy*. Am Heart J 141(2): 184-9.
135. Sanbe A, Nelson D, Gulick J, Setser E, Osinska H, Wang X, Hewett TE, Klevitsky R, Hayes E, Warshaw DM and Robbins J (2000). *In vivo analysis of an essential myosin light chain mutation linked to familial hypertrophic cardiomyopathy*. Circ Res 87(4): 296-302.
136. Kabaeva ZT, Perrot A, Wolter B, Dietz R, Cardim N, Correia JM, Schulte HD, Aldashev AA, Mirrakhimov MM and Osterziel KJ (2002). *Systematic analysis of the regulatory and essential myosin light chain genes: genetic variants and mutations in hypertrophic cardiomyopathy*. Eur J Hum Genet 10(11): 741-8.
137. Roopnarine O (2003). *Mechanical defects of muscle fibers with myosin light chain mutants that cause cardiomyopathy*. Biophys J 84(4): 2440-9.
138. Morner S, Richard P, Kazzam E, Hellman U, Hainque B, Schwartz K and Waldenstrom A (2003). *Identification of the genotypes causing hypertrophic cardiomyopathy in northern Sweden*. J Mol Cell Cardiol 35(7): 841-9.
139. Szczesna-Cordary D, Guzman G, Ng SS and Zhao J (2004). *Familial hypertrophic cardiomyopathy-linked alterations in Ca²⁺ binding of human cardiac myosin regulatory light chain affect cardiac muscle contraction*. J Biol Chem 279(5): 3535-42.
140. Jaaskelainen P, Miettinen R, Karkkainen P, Toivonen L, Laakso M and Kuusisto J (2004). *Genetics of hypertrophic cardiomyopathy in eastern Finland: few founder mutations with benign or intermediary phenotypes*. Ann Med 36(1): 23-32.

141. Epstein ND, Cohn GM, Cyran F and Fananapazir L (1992). *Differences in clinical expression of hypertrophic cardiomyopathy associated with two distinct mutations in the beta-myosin heavy chain gene. A 908Leu----Val mutation and a 403Arg----Gln mutation.* Circulation 86(2): 345-52.
142. Cuda G, Fananapazir L, Zhu WS, Sellers JR and Epstein ND (1993). *Skeletal muscle expression and abnormal function of beta-myosin in hypertrophic cardiomyopathy.* J Clin Invest 91(6): 2861-5.
143. Enjuto M, Francino A, Navarro-Lopez F, Viles D, Pare JC and Ballesta AM (2000). *Malignant hypertrophic cardiomyopathy caused by the Arg723Gly mutation in beta-myosin heavy chain gene.* J Mol Cell Cardiol 32(12): 2307-13.
144. Pesole G, Grillo G, Larizza A and Liuni S (2000). *The untranslated regions of eukaryotic mRNAs: structure, function, evolution and bioinformatic tools for their analysis.* Brief Bioinform 1(3): 236-49.
145. Guhaniyogi J and Brewer G (2001). *Regulation of mRNA stability in mammalian cells.* Gene 265(1-2): 11-23.
146. Pesole G, Liuni S, Grillo G, Licciulli F, Mignone F, Gissi C and Saccone C (2002). *UTRdb and UTRsite: specialized databases of sequences and functional elements of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNAs. Update 2002.* Nucleic Acids Res 30(1): 335-40.
147. Alba M and Salvatori R (2004). *Familial Growth Hormone Deficiency and Mutations in the GHRH Receptor Gene.* Vitam Horm 69: 209-20.
148. Osato M (2004). *Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: another actor in RUNX leukemia.* Oncogene 23(24): 4284-96.
149. Barton PJ and Buckingham ME (1985). *The myosin alkali light chain proteins and their genes.* Biochem J 231(2): 249-61.
150. DeLano WL (2002). *The PyMOL Molecular Graphics System.*
151. Weiss A, Schiaffino S and Leinwand LA (1999). *Comparative sequence analysis of the complete human sarcomeric myosin heavy chain family: implications for functional diversity.* J Mol Biol 290(1): 61-75.
152. Lankford EB, Epstein ND, Fananapazir L and Sweeney HL (1995). *Abnormal contractile properties of muscle fibers expressing beta-myosin heavy chain gene mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy.* J Clin Invest 95(3): 1409-14.
153. Margossian SS (1985). *Reversible dissociation of dog cardiac myosin regulatory light chain 2 and its influence on ATP hydrolysis.* J Biol Chem 260(25): 13747-54.
154. Chen J, Kubalak SW, Minamisawa S, Price RL, Becker KD, Hickey R, Ross J, Jr. and Chien KR (1998). *Selective requirement of myosin light chain 2v in embryonic heart function.* J Biol Chem 273(2): 1252-6.

155. Pleissner KP, Soding P, Sander S, Oswald H, Neuss M, Regitz-Zagrosek V and Fleck E (1997). *Dilated cardiomyopathy-associated proteins and their presentation in a WWW-accessible two-dimensional gel protein database*. Electrophoresis 18(5): 802-8.
156. Pleissner KP, Regitz-Zagrosek V, Weise C, Neuss M, Krudewagen B, Soding P, Buchner K, Hucho F, Hildebrandt A and Fleck E (1995). *Chamber-specific expression of human myocardial proteins detected by two-dimensional gel electrophoresis*. Electrophoresis 16(5): 841-50.
157. Fewell JG, Osinska H, Klevitsky R, Ng W, Sfyris G, Bahrehmand F and Robbins J (1997). *A treadmill exercise regimen for identifying cardiovascular phenotypes in transgenic mice*. Am J Physiol 273(3 Pt 2): H1595-605.
158. Palermo J, Gulick J, Colbert M, Fewell J and Robbins J (1996). *Transgenic remodeling of the contractile apparatus in the mammalian heart*. Circ Res 78(3): 504-9.
159. Schulze K, Becker BF, Schauer R and Schultheiss HP (1990). *Antibodies to ADP-ATP carrier--an autoantigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy--impair cardiac function*. Circulation 81(3): 959-69.
160. Muller J, Wallukat G, Dandel M, Bieda H, Brandes K, Spiegelsberger S, Nissen E, Kunze R and Hetzer R (2000). *Immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy*. Circulation 101(4): 385-91.
161. Neu N, Craig SW, Rose NR, Alvarez F and Beisel KW (1987). *Coxsackievirus induced myocarditis in mice: cardiac myosin autoantibodies do not cross-react with the virus*. Clin Exp Immunol 69(3): 566-74.
162. Srinivasappa J, Saegusa J, Prabhakar BS, Gentry MK, Buchmeier MJ, Wiktor TJ, Koprowski H, Oldstone MB and Notkins AL (1986). *Molecular mimicry: frequency of reactivity of monoclonal antiviral antibodies with normal tissues*. J Virol 57(1): 397-401.
163. Beisel KW, Srinivasappa J, Olsen MR, Stiff AC, Essani K and Prabhakar BS (1990). *A neutralizing monoclonal antibody against Coxsackievirus B4 cross-reacts with contractile muscle proteins*. Microb Pathog 8(2): 151-6.
164. Bohm M, Gierschik P, Jakobs KH, Pieske B, Schnabel P, Ungerer M and Erdmann E (1990). *Increase of Gi alpha in human hearts with dilated but not ischemic cardiomyopathy*. Circulation 82(4): 1249-65.
165. Steinfath M, Lavicky J, Schmitz W, Scholz H, Doring V and Kalmar P (1992). *Regional distribution of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the failing and nonfailing human heart*. Eur J Clin Pharmacol 42(6): 607-11.
166. Arai M, Alpert NR, MacLennan DH, Barton P and Periasamy M (1993). *Alterations in sarcoplasmic reticulum gene expression in human heart failure. A possible mechanism for alterations in systolic and diastolic properties of the failing myocardium*. Circ Res 72(2): 463-9.

167. Rasmussen RP, Minobe W and Bristow MR (1990). *Calcium antagonist binding sites in failing and nonfailing human ventricular myocardium*. *Biochem Pharmacol* 39(4): 691-6.
168. Schaub MC and Hirzel HO (1987). *Atrial and ventricular isomyosin composition in patients with different forms of cardiac hypertrophy*. *Basic Res Cardiol* 82 Suppl 2: 357-67.
169. van der Velden J, Papp Z, Zaremba R, Boontje NM, de Jong JW, Owen VJ, Burton PB, Goldmann P, Jaquet K and Stienen GJ (2003). *Increased Ca²⁺-sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins*. *Cardiovasc Res* 57(1): 37-47.
170. van der Velden J, Papp Z, Boontje NM, Zaremba R, de Jong JW, Janssen PM, Hasenfuss G and Stienen GJ (2003). *Myosin light chain composition in non-failing donor and end-stage failing human ventricular myocardium*. *Adv Exp Med Biol* 538: 3-15.
171. Bing OH, Brooks WW, Conrad CH, Sen S, Perreault CL and Morgan JP (1991). *Intracellular calcium transients in myocardium from spontaneously hypertensive rats during the transition to heart failure*. *Circ Res* 68(5): 1390-400.
172. Fitzsimons DP BP, Badwin KM (1990). *Myocardial function correlates of cardiac myosin light chain 2 phosphorylation*. *J Appl Physiol* 68: 2426-2433.
173. Davis JS, Hassanzadeh S, Winitsky S, Lin H, Satorius C, Vemuri R, Aletras AH, Wen H and Epstein ND (2001). *The overall pattern of cardiac contraction depends on a spatial gradient of myosin regulatory light chain phosphorylation*. *Cell* 107(5): 631-41.

5.3. Oligonukleotide

Leichte Myosinkette Typ 1, ventrikulär, human, mRNA, NCBI-Acc: NM_000258	
MLC1V-F	5'-AAA AAG CCA GAG CCC AAG AAG-3'
MLC1V-R	5'-ACA AGC TGC TGT CAC AGG TA-3'
Leichte Myosinkette Typ 1, ventrikulär, human, Gen, NCBI-Acc: NT_005825	
MLC1-E1-F	5'-CCC CAA AAT AGC CCC TAA GCC-3'
MLC1-E1-R	5'-CCA CCA CCC AGC TTC CAT ACC-3'
MLC1-E2-F	5'-GGC AGG AGG GCG TCA AGA T-3'
MLC1-E2-R	5'-GCC TAC CCC ACT CCC CAC ACC-3'
MLC1-E3-F	5'-CCT GGG AGT CTG TGG CTC AC-3'
MLC1-E3-R	5'-CTC TCG GGC AGG TGC ACT AC-3'
MLC1-E4-F	5'-CCC AGC CTT AGA CCC T-3'
MLC1-E4-R	5'-TTT CTG TTG TCT GCC ATT GAG-3'
MLC1-E5-F	5'-CCC CCA CCC CAT CAT GCC TCT-3'
MLC1-E5-R	5'-CAC TCC CCT CCC AGA AGA CCC-3'
MLC1-E6-F	5'-GTT GCA CTC CTG CCA CTC A-3'
MLC1-E6-R	5'-TGA GAG CAA AGG CAG TGC AG-3'
MLC1-E7-F	5'-AGG GAA GGC TGT GCA GGG AC-3'
MLC1-E7-R	5'-TCA GAA AGG AAG GCC GCA AGA A-3'
Leichte Myosinkette Typ 2, ventrikulär, human, mRNA, NCBI-Acc: X66141	
MLC2V-Exp1-F	5'-AAA GCA AAG AAG AGA GCC-3'
MLC2V-Exp1-R	5'-GTG ACC AAA TAC ACG ACC-3'
MLC2V-Exp2-F	5'-CAC CAT GGC ACC TAA GAA AGC-3'
MLC2V-Exp2-R	5'-GTC CTT CTC TTC TCC GTG GGT-3'
MLC2-pQE9-F	5'-CGC GGA TCC GCA CCT AAG AAA GCA AAG-3'
MLC2-pQE9-R	5'-CCC AAG CTT GTC CTT CTC TTC TCC GTG GGT-3'
MLC2Vb-F	5'-CCC TTG GGC GAG TGA ACG TGA-3'
MLC2Vb-R	5'-CGG CGA ACA TCT GGT CAA CCT-3'
MLC2V-K-F	5'-AAG TGT TTG ACC CTG AAG GC-3'
MLC2V-K-R	5'-ATT GGA CCC GGA GCC TCC TTG-3'
MLC2V-S-F	5'-GGC TCC GGG TCC AAT TAA CT-3'
MLC2V-S-R	5'-GGC GAA CAT CTG GTC AAC CT-3'
Leichte Myosinkette Typ 2, ventrikulär, human, Gen, NCBI-Acc: Z15030	
MLC2-5'UTR1-F	5'-GAG CCG TGC GAT GAC TG-3'
MLC2-5'UTR1-R	5'-GCC CAG GAA CAA TAA ATA CTT-3'
MLC2-5'UTR2-F	5'-GGG ACT GCC TCA CGC T-3'
MLC2-5'UTR2-R	5'-GCA CCT GTG TCC CTC TAC CTG-3'
MLC2-5'UTR3-F	5'-CTG GGC AGC TCA CTT CG-3'
MLC2-5'UTR3-R	5'-AAA TAA TAC AGC CAC GCA CCT-3'

MLC2-E1-F MLC2-E1-R	5'-CTC TCC CCG TGA CCA TGA CC-3' 5'-GCT TTT TCC ACA AGG GGC TG-3'
MLC2-E2-F MLC2-E2-R	5'-TGA TGC TGT ACC ACA TTC ACA G-3' 5'-GGG ATT GTT TGG AGG ATA GAG G-3'
MLC2-E3-F MLC2-E3-R	5'-TGC CAA TCA CTT CCC TTC C-3' 5'-AGT TGT GGC GAG TTG TTT CTT TG-3'
MLC2-E4-F MLC2-E4-R	5'-GGA ATC CCA GGA GCC ATT G-3' 5'-CCC CCG AAG AAA CAT AGA CAC A-3'
MLC2-E5-F MLC2-E5-R	5'-CCC TGT GTT CCG TTT C-3' 5'-GCA GGT GTT GGT GTC AGT TGT-3'
MLC2-E6-F MLC2-E6-R	5'-CTG AAG GCT GAT TAG TAA GTG-3' 5'-GGT GCT TTA GAC GAG AGG-3'
MLC2-E7-F MLC2-E7-R	5'-GTC TCA GTT CCC CTC CCC TC-3' 5'-GCT CAT CTG CCT TTG CCT TC-3'
Schwere Myosinkette, Beta-Isoform, kardial, human, Gen, NCBI-Acc: X52889	
MYH7-E19-F MYH7-E19-R	5'-CCA CAT CTC TTT CCT CGT ACC-3' 5'-GGC CTC TGA CCC TGT GAC T-3'
MYH7-E20-F MYH7-E20-R	5'-GCT CAG CAC TCC TTT CAA TGG-3' 5'-CCT CGG ACT TCT CTA GCG-3'
Leichte Myosinkette Typ 2, ventrikulär, Rattus norvegicus, mRNA, NCBI-Acc: NM_012605	
rMLC2-F rMLC2-R	5'-AGG AGG CTT TCA CTG TAA TTG-3' 5'-TCC TGG GAA AAT CGG T-3'
rMLC2-S-F rMLC2-S-R	5'-AGC CAA GAA GAG GTT AGA GGG-3' 5'-GAA GGC GTT GAG AAT GGT C-3'
Glyceraldehyd-3-Phosphodehydrogenase (GAPDH), human, mRNA, NCBI-Acc: M33197	
GAPDH-CT-F GAPDH-CT-R	5'-TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GTC-3' 5'-CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'
GAPDHa-F GAPDHa-R	5'-GGG AAG GTG AAG GTC GG-3' 5'-TGG ACT CCA CGA CGT ACT CAG-3'
Glyceraldehyd-3-Phosphodehydrogenase (GAPDH), Rattus norvegicus, mRNA, NCBI-Acc: AB017801	
rGAPDH-F rGAPDH-R	5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3' 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'
pQE9-Vektor, QIAGEN	
pQE9-F pQE9-R	5'-CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG-3' 5'-CCA GTA ATG ACC TCA GAA C-3'

5.4. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht und mich bei ihrer Ausführung unterstützt haben. An erster Stelle danke ich Dr. med. habil. Holger Sigusch, der das Thema bereitstellte und mich über die Jahre hinweg mit allen Höhen und Tiefen betreute und unterstützte. Er vermittelte mir den nötigen medizinischen Hintergrund zur Bearbeitung dieses Themas und hatte stets einen optimistischen Blick auf die Ergebnisse.

Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Frank Große bedanken, der es mir als betreuender Hochschullehrer ermöglichte, diese Arbeit in einer klinischen Arbeitsgruppe anzufertigen, sowie bei Herrn Prof. Dr. med. H.-R. Figulla für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in der Arbeitsgruppe „Herzinsuffizienz experimentell“ zu bearbeiten.

Ein großer Dank gilt natürlich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Herzinsuffizienz experimentell“ für das stets sehr gute Arbeitsklima, die Hilfsbereitschaft sowie die Geduld in schlechteren Zeiten. Im besonderen Enrico Jandt danke ich für seine kritischen und hilfreichen Diskussionen und die Durchsicht des Manuskripts, Martin Czolbe für die vielen Hilfestellungen in Computerfragen sowie Dirk Reinhardt für viele anregende Gespräche. Ein besonderer Dank gilt auch Ulla-Brigitte Köhler und Martina Lätz.

Weiterhin danke ich Dr. rer. nat. habil. Andreas Henke für die Möglichkeit der Sequenzierung am Institut für Virologie sowie Dr. rer. nat. Bernhard Schlott für seine Zusammenarbeit in Fragen der 2D-Elektrophorese und die massenspektrometrischen Daten.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und meiner Schwester für ihre moralische Unterstützung und die Förderung meines Studiums, ohne die ich nicht so weit gekommen wäre.

Herzlichen Dank!

5.5. Lebenslauf

Name: Haase

Vorname: Daniela

Geburtsdatum: 18.03.1973

Geburtsort: Karl-Marx-Stadt

Familienstand: ledig

September 1979 – Juli 1989 Besuch der POS Siegmars in Karl-Marx-Stadt

September 1989 – Juni 1992 Besuch der Kaufmännischen Berufsschule Chemnitz,
Abschluß als Kauffrau für Groß- und Außenhandel

September 1991 – Juli 1994 Besuch des Abendgymnasiums Chemnitz,
Abschluß Abitur

Oktober 1994 Beginn des Studiums der Biologie an der
Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU Jena

Oktober 1998 – September 1999 .. Anfertigung der Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe
„Herzinsuffizienz experimentell“
am Klinikum der FSU Jena

Oktober 1999 Exmatrikulation nach Beendigung des Studiums,
Abschluß mit dem Diplom als Diplom-Biologin

seit November 1999 Doktorand in der Arbeitsgruppe „Herzinsuffizienz
experimentell“ am Klinikum der FSU Jena

5.6. Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena, den 13.01.2005

Daniela Haase

5.7. Erklärung zur Bewerbung

Hiermit erkläre ich, daß ich mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad Doctor rerum naturalium beworben habe und daß ich weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb des oben genannten akademischen Grades an einer anderen Hochschule beantragt habe. Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU Jena ist mir bekannt.

Jena, den 13.01.2005

Daniela Haase