

Aus der Abteilung Kardiologie und Pneumologie
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Modifikation des Hypertrophie-Phänotyps der
Myosin-Bindungs-Protein-C-defizienten Maus
durch Muscle-LIM-Protein**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von **Martin Braach**

aus **Reutlingen**

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. G. Hasenfuß

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Herzinsuffizienz – Definition, Epidemiologie und Prognose.....	1
1.2	Zelluläre Grundlagen der Herzaktion und elektromechanische Kopplung	2
1.3	Physiologische Regulationsmechanismen der Herz- funktion und ihre Veränderung bei Herzinsuffizienz ..	5
1.3.1	Frank-Starling-Mechanismus	5
1.3.2	Kraft-Frequenz-Beziehung	6
1.3.3	Post-Pausen-Potenzierung	7
1.3.4	Regulation durch adrenerge Stimulation	7
1.3.5	Herzmuskelhypertrophie und Remodeling	9
1.4	Kardiomyopathien	10
1.4.1	Aufbau des Sarkomers.....	10
1.4.2	Dilatative Kardiomyopathie.....	11
1.4.3	Hypertrophische Kardiomyopathie	12
1.5	Studien am Mausmodell	13
1.6	Untersuchte Proteine.....	14
1.6.1	Muscle-LIM-Protein – Lokalisation und Struktur.....	14
1.6.2	Muscle-LIM-Protein – Funktion und Studienlage	16
1.6.3	Cardiac-Myosin-Binding-Protein-C – Lokalisation und Struktur.....	17
1.6.4	Cardiac-Myosin-Binding-Protein-C – Funktion und Studienlage	17
1.7	Fragestellung dieser Arbeit	19

2	Material und Methoden.....	21
2.1	Lösungen	21
2.1.1	Experimentierlösungen Muskelstreifenexperimente.....	21
2.1.1.1	Krebs-Henseleit-Lösung.....	21
2.1.1.2	Dissektionslösung	22
2.1.2	Experimentierlösungen für Skinned Fibers	22
2.1.2.1	Skinning-Lösung	22
2.2	Beschreibung des Mausmodells	24
2.3	Echokardiographie der Mäuse	25
2.4	Muskelstreifenexperimente – Versuchsaufbau	26
2.4.1	Aufbau der Versuche mit intakten multizellulären Muskelstreifen	26
2.4.1.1	Organbad	26
2.4.1.2	Lösungszirkulation	26
2.4.1.3	Kraftaufnahme und Übertragung.....	27
2.4.1.4	Datenakquisition und Evaluation	28
2.4.2	Aufbau der Skinned-Fibers-Experimente	29
2.5	Muskelstreifenexperimente – Versuchsdurchführung.....	29
2.5.1	Intakte multizelluläre Herzmuskelstreifen.....	29
2.5.1.1	Probengewinnung	29
2.5.1.2	Präparation der intakten multizellulären Herzmuskelstreifen	30
2.5.1.3	Einspannen	31
2.5.1.4	Versuchsablauf	31
2.5.2	Skelettmuskelstreifen aus dem Zwerchfell	33
2.5.2.1	Probengewinnung	33
2.5.2.2	Präparation.....	33
2.5.2.3	Einhängen	34
2.5.2.4	Versuchsablauf	35

Inhaltsverzeichnis

2.5.3	Skinned-Fibers-Experimente	36
2.5.3.1	Probengewinnung	36
2.5.3.2	Präparation.....	36
2.5.3.3	Einhängen	37
2.5.3.4	Versuchsablauf	37
2.6	Histologie	38
2.6.1	Gewebebegewinnung	38
2.6.2	Herstellung der Gewebeschnitte	38
2.6.2.1	Picrosiriusrot-Färbung	38
2.6.2.2	Weizenkeim-Agglutinin-Färbung	39
2.6.3	Auswertung der histologischen Präparate.....	39
2.7	Proteindiagnostik am Herzgewebe.....	40
2.7.1	Lösungen für Protein-Analysen	40
2.7.1.1	TBE-Puffer	40
2.7.2	Lösungen zur Proteinaufbereitung	41
2.7.2.1	HEPES-Stammlösung	41
2.7.2.2	CLAP-Stammlösung.....	41
2.7.2.3	Homogenisierungspuffer	41
2.7.2.4	Lämmli-Puffer	42
2.7.3	Lösungen für die Natriumdodecylsulfat (SDS)- Gelelektrophorese	43
2.7.4	Lösungen für Coomassie-Färbungen.....	44
2.7.5	Gewebebegewinnung	45
2.7.6	Aufbereitung des Herzgewebes	45
2.7.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	47
2.7.7.1	Herstellung des Gels	47
2.7.7.2	Auftragen der Proteinproben	48
2.7.7.3	Coomassie-Färbung der Gele	48
2.7.7.4	Auswertung und Dokumentation	48
2.8	Mathematische Methoden	49

3	Ergebnisse	50
3.1	Echokardiographie-Charakterisierung der Mausgenotypen in vivo	50
3.2	Herzentnahme und Präparation – Auffälligkeiten	55
3.3	Versuche mit intakten multizellulären Herzmuskelstreifen	58
3.3.1	Kraft-Frequenz-Beziehung (FFR).....	59
3.3.2	Post-Pausen-Verhalten (PPV).....	61
3.3.3	Isoprenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Iso-KWK)	63
3.4	Versuche mit permeabilisierten Herzmuskelstreifen (Skinned Fibers)	64
3.4.1	Calcium-Aktivierungs-Kurve	65
3.4.2	Ruhe-Dehnungs-Kurve	69
3.5	Histologische Untersuchungen.....	70
3.5.1	Myozytenquerschnittsfläche	70
3.5.2	Fibroseanteil am Gesamtgewebe.....	71
3.6	Ergebnisse der Protein-Expressions- untersuchungen	72
3.7	Versuche mit Skelettmuskelstreifen aus dem Zwerchfell.....	74
3.7.1	Tetanisierung der Skelettmuskelstreifen	74
3.7.2	Ermüdungsresistenz der Skelettmuskelstreifen	75

4	Diskussion	77
4.1	Allgemeines	77
4.2	Tiermodell	78
4.3	Beurteilung und Diskussion der Ergebnisse	80
4.3.1	Echokardiographie und makroskopische Auffälligkeiten	80
4.3.2	Intakte multizelluläre Muskelstreifen	81
4.3.2.1	Kraft-Frequenz-Beziehung	81
4.3.2.2	Post-Pausen-Verhalten	83
4.3.2.3	Isoprenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurve	84
4.3.3	Permeabilisierte Herzmuskelstreifen (Skinned Fibers)	85
4.3.3.1	Calcium-Aktivierung	85
4.3.3.2	Ruhe-Dehnungs-Kurve	86
4.3.4	Histologische und immunhistologische Untersuchungen	87
4.3.5	Proteinuntersuchungen	88
4.3.6	Diaphragmale Skelettmuskelstreifen	89
4.4	Schlussfolgerungen und Ausblick	90
5	Zusammenfassung	92
6	Literaturverzeichnis	93

Abkürzungs- und Stichwortverzeichnis

α -AR	α -adrenerger Rezeptor
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ADH	Anti-Diuretisches Hormon
ANF	Atrialer natriuretischer Faktor
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARVC	Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
ATP	Adenosintriphosphat
β -AR	β -adrenerger Rezeptor
β -ARK	β -Adrenorezeptor-Kinase
BCA	Bicinchoninsäure
BDM	2,3-Butan-Dion-Monoxim
β -MHC	schwere β -Myosin-Kette
BNP	Brain-Natriuretic-Peptide
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Kalziumion
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRP	Cystein-reiches Protein
cTnI	Kardiales Troponin I
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
d.h.	das heißt
DHET	doppelt-heterozygote Maus, d.h. Genotyp MLP ^{+/-} und MyBPc ^{+/-}
DKO	Doppel-Knock-Out-Maus, d.h. Genotyp MLP ^{-/-} und MyBPc ^{-/-}
DTT	Dithiothreitol
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure
Fa.	Firma

Abkürzungs- und Stichwortverzeichnis

FFR	„Force-Frequency-Relationship“, Kraft-Frequenz-Beziehung
FHC	Familiäre Hypertrophische Kardiomyopathie
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FS	„Fractional shortening“, Verkürzungsfraktion
g	Gramm
G _s -Protein	Stimulatorisches GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HCM	Hypertrophische Kardiomyopathie
HEPES	N-Hydroxyethyl-Piperazin-N-Ethansulfonsäure
Hz	Hertz
HZV	Herzzeitvolumen
ICM	Ischämische Kardiomyopathie
I.E.	Internationale Einheiten
IPA	Isopropylalkohol
Iso-KWK	Isoprenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurve
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
KWK	Konzentrations-Wirkungs-Kurve
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVESD	linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser
M	Stoffmengenkonzentration in Mol pro Liter
mA	Milliampere
MCIP	Modulatorisches-Calcineurin-Interagierendes-Protein
MDa	Megadalton
MHC	schwere Myosin-Kette
ml	Milliliter
MLP	Muscle-LIM-Protein
MLPHET	MLP-heterozygote Maus, d.h. Genotyp MLP ^{+/-} und MyBPC ^{-/-}
mm	Millimeter

Abkürzungs- und Stichwortverzeichnis

mM	Millimolar
mN	Millinewton
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
msec	Millisekunden
MyBPc	Kardiales Myosin-Bindungs-Protein-C
N	Äquivalentkonzentration
Na ⁺	Natriumion
NCX	Natrium-Kalzium-Austauscher
O ₂	Sauerstoff
pCa ²⁺	negativer dekadischer Logarithmus der Calciumionenkonzentration
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase (Protein-Kinase A)
PLN	Phospholamban
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPP	Post-Pausen-Potenzierung
PW	„Posterior wall“, Hinterwand
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RCM	Restriktive Kardiomyopathie
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler der Mittelwerte
SERCA	Sarkoplasmatisches-Retikulum-Kalzium-ATPase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SW	„Septum wall“, interventrikuläres Septum
Tab.	Tabelle
TAC	Transversale Aortenkonstriktion
T-Cap	auch genannt Telethonin
Tdev	Entwickelte Kraft

Abkürzungs- und Stichwortverzeichnis

TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tnl	Troponin I
V	Volt
Vol	Volumen

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz - Definition, Epidemiologie und Prognose

Herzinsuffizienz bedeutet die Unfähigkeit des Herzens, die Organe mit ausreichend Blut und damit mit genügend Sauerstoff zu versorgen. Je nach Schweregrad kann es dabei zu einer Mangelversorgung der Organe unter Belastung (Belastungsinsuffizienz) oder bereits in Ruhe (Ruheinsuffizienz) kommen.

Typische Symptome der Herzinsuffizienz sind daher Leistungsminderung, Schwächegefühl (beim Vorwärtsversagen mit niedrigem Auswurf) sowie Dyspnoe, Lungenödem und Zyanose (beim Rückwärtsversagen mit Lungenstauung). Ist auch das rechte Herz von der Insuffizienz betroffen, kommt es zur Rückstauung in den großen Kreislauf mit Ödemen in den abhängigen Körperpartien, zu Jugularisvenenstauung und zu Aszites (Hoppe et al. 1998).

Die Herzinsuffizienz ist ein weltweites Problem. Allein in den Vereinigten Staaten von Amerika betrifft es 4,7 Millionen Patienten, verursacht pro Jahr mehr als eine Million Krankenhauseinweisungen und fordert 300 000 Tote (Cohn et al. 1997). Mit einer Prävalenz von 1,9 Millionen betroffenen Menschen in den alten Bundesländern, was 3% der Bevölkerung entspricht, ist sie auch in Deutschland eine der häufigsten Krankheiten (Eriksson 1995).

Die Prävalenz und Inzidenz der Herzinsuffizienz ist altersabhängig. Während im Alter zwischen 45-55 Jahren weniger als 1% der Bevölkerung an einer Herzinsuffizienz leidet, sind es im Alter zwischen 65-75 Jahren bereits 2-5% und bei über 80-Jährigen sogar fast 10% (McMurray und Stewart 2000).

Als Ursache liegt bei jedem zweiten Patienten der Herzinsuffizienz eine ischämische Kardiomyopathie (ICM) auf Basis einer Koronaren Herzkrankheit (KHK) zu Grunde. (Cowie et al. 1997). Weiterhin können Volumen- oder Druckbelastungen des Ventrikels, beispielsweise durch Klappenvitien, Hypertonus oder Shunts eine Herzinsuffizienz verursachen. Wird keine Ursache gefunden, so spricht man von idiopathischer Herzinsuffizienz.

In den letzten zwei Jahrzehnten wuchs die Erkenntnis, dass ein großer Anteil der „idiopathischen“ Herzinsuffizienz familiär und damit genetisch bedingt ist. Meist liegt diesen Fällen eine Erkrankung des Herzmuskels, also eine Kardiomyopathie, zu Grunde.

1. Einleitung

Zwar reichen Berichte über familiär bedingte Herzvergrößerungen bis ins Jahr 1948 zurück (Evans 1948). Dennoch erschien erst 1992 eine Studie mit dem Ergebnis, dass bei etwa 20% der Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie ein Verwandter ersten Grades ebenfalls von der Erkrankung betroffen war (Michels et al. 1992). Mittlerweile sind sowohl die Vererbungsmodi autosomal (dominant oder rezessiv), X-chromosomal oder mitochondrial als auch viele der verursachenden Gene bekannt.

Die Prognose der Herzinsuffizienz ist schlecht: Im ersten Jahr nach Diagnosestellung sterben 19%-24% der Patienten (Gustafsson et al. 2003). Laut Framinghamstudie liegt die 5-Jahres-Mortalität nach Diagnosestellung zwischen 62% und 75% bei Männern und zwischen 38% und 42% bei Frauen (Ho et al. 1993).

Hauptprobleme der Herzinsuffizienz sind zum einen eine progrediente Abnahme der kontraktilen Funktion des Herzens bis zum Pumpversagen bei chronischem Verlauf, zum anderen der akute Verlauf bei Myokardinfarkt und Myokarditis sowie der plötzliche Herztod durch Arrhythmien.

Unabhängig von der Ursache führt die Erkrankung zu einem Vorwärtsversagen mit vermindertem systolischem Auswurf oder einem Rückwärtsversagen mit den oben angeführten Symptomen.

1.2 Zelluläre Grundlagen der Herzaktion und elektromechanische Kopplung

Der Begriff Elektromechanische Kopplung beschreibt den Prozess von der elektrischen Erregung des einzelnen Myozyten bis zur Kontraktion des gesamten Herzens. Da die Kardiomyozyten untereinander über für Ionen permeable Kanäle, die so genannten „gap junctions“, in Verbindung stehen, kann sich das Aktionspotential auf benachbarte Zellen ausbreiten (Rozenal et al. 2000). Während des Aktionspotentials kommt es zum Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} über die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ (Bers 2001) sowie über den „reverse mode“ des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX) (Gaughan et al. 1999).

Die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, auch Dihydropyridinrezeptoren genannt, liegen im Bereich der transversalen Tubuli in direkter Nachbarschaft zu den Ca^{2+} -Freisetzungskanälen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), auch Ryanodinrezeptoren (RyR) genannt (Scriven et al. 2000). Der Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} führt zur Aktivierung der Ca^{2+} -sensitiven Ryanodinrezeptoren und damit zur Ausschüttung von Ca^{2+} aus dem SR („CICR“ für „Calcium-induced Calcium release“). Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -

1. Einleitung

Konzentration führt im Sinne einer positiven Rückkopplung zur weiteren Aktivierung von Ryanodinrezeptoren. Erst ab einer intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von etwa 10^{-6} mol/l wird dieser Effekt im Sinne einer negativen Rückkopplung gehemmt.

Die Ca^{2+} -Ionen binden an die Untereinheit Troponin C des Troponin/Tropomyosin-Komplexes (Gulati et al. 1988). Die dabei entstehende Konformationsänderung wird über die Untereinheiten Troponin I und T auf das Tropomyosinmolekül, das in der Furche des F-Aktins liegt, weitergeleitet. Tropomyosin gibt daraufhin die Myosinbindungsstellen am Aktinfilament frei.

Die Interaktion zwischen Myosin- und Aktinfilamenten ist nun möglich. Unter ATP-Verbrauch gleiten die beiden kontraktile Proteine unter wiederholter Querbrückenbildung des beweglichen Teils von Myosin aneinander vorbei. Dadurch verkürzt sich die Myofibrille (Löffler und Petrides 1998).

In der anschließenden Diastole erfolgt die Dissoziation des Ca^{2+} vom Troponin C und die Elimination des Ca^{2+} aus dem Zytosol. An der Elimination sind spezieabhängig in unterschiedlichem Ausmaß (siehe auch Abschnitt 1.5 Studien am Mausmodell) vor allem die SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA), gefolgt vom $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, beteiligt (Bassani et al. 1994).

Das Absinken der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration hat die Erschlaffung der Myofibrillen zur Folge. Nach der Relaxation kann ein neuer Kontraktionszyklus beginnen.

1. Einleitung

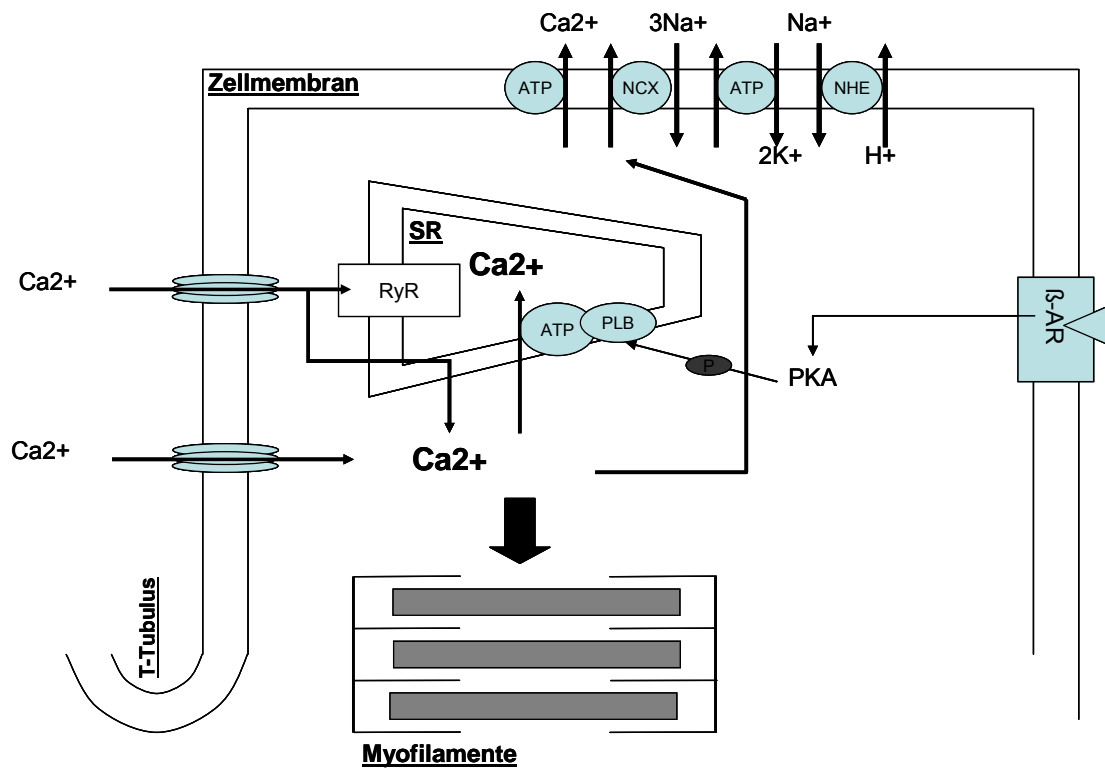


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der zellulären Komponenten, die hauptsächlich für die elektromechanische Kopplung verantwortlich sind. (Abbildung modifiziert nach Bers (2000), Seite 276)

1.3 Physiologische Regulationsmechanismen der Herzfunktion und ihre Veränderung bei Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz hat eine Reihe von systemischen Kompensationsmechanismen zur Folge, mit denen das Herzzeitvolumen (HZV) und der Blutdruck wieder angehoben werden sollen: Über einen erhöhten Sympathikotonus mit vermehrter Katecholamin-freisetzung wird der periphere Widerstand erhöht und die Herzfrequenz gesteigert. Es kommt zu einer Drosselung der Durchblutung von Skelettmuskel (Symptom Müdigkeit), Haut (Symptom Blässe) und weniger ausgeprägt auch der Niere und des Intestinalsystems zu Gunsten der zentralen Organe (Zentralisation).

Die Minderdurchblutung der Niere hat wiederum eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und eine vermehrte Ausschüttung von Anti-Diuretischem Hormon (ADH) zur Folge (Packer 1988). Dadurch steigt die Wasser- und Salzresorption mit der Folge einer noch stärkeren Volumen- und Druckbelastung und einer erhöhten Ödembildung (Klinke und Silbernagel 2000).

Neben den genannten systemischen Mechanismen gibt es auf zellulärer Ebene die Möglichkeit, durch Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration oder der Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente die kontraktile Funktion der Herzmuskulatur zu beeinflussen. Diese Regulation kann sowohl durch lokale als auch systemische Einflüsse stattfinden. Im folgenden Teil werden die für diese Arbeit wichtigsten Mechanismen erklärt.

1.3.1 Frank-Starling-Mechanismus

Eine Erhöhung der Ruhedehnung des Myokards (z. B. durch gesteigerte Vorlast) führt zu einer Zunahme der Kontraktionskraft. Dieser Mechanismus wurde bereits 1895 von Frank an Froschherzen beschrieben (Frank 1895). Als Ursache wurde eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität der kontraktilen Proteine festgestellt (Allen und Kentish 1985, Pieske et al. 1997).

Unter vermindertem Auswurf bei Herzinsuffizienz bei gleich bleibendem venösem Rückfluss steigt zunächst das enddiastolische Volumen im Herzen. Dies führt zu einer erhöhten Vorlast mit entsprechender Vordehnung des Myokards und damit zu einer

1. Einleitung

Erhöhung der Kontraktionskraft. Über diesen Mechanismus kann vorübergehend der systolische Auswurf aufrechterhalten werden.

Über die Existenz dieses Mechanismus im insuffizienten Herzen existieren widersprüchliche Veröffentlichungen, die für menschliches Myokard keinen (Schwinger et al. 1994) oder einen komplett erhaltenen Frank-Starling Mechanismus postulieren (Holubarsch et al. 1996, Pieske et al. 1997, Vahl et al. 1998, Weil et al. 1998).

Neueste Veröffentlichungen über die MLP-knock-out-Maus, die auch in dieser Arbeit zur Zucht verwendet wurde, beschreiben zumindest eine vorübergehende Kompensation der Herzinsuffizienz durch den Frank-Starling-Mechanismus (Costandi et al. 2006).

1.3.2 Kraft-Frequenz-Beziehung

Eine Steigerung der Herzfrequenz führt im gesunden Herzen zu einer Zunahme der Inotropie, dem so genannten Bowditch-Effekt. Während dieser Effekt für den Menschen sowie für einige weitere Spezies nachgewiesen ist (Buckley et al. 1972, Mulieri et al. 1992, Hasenfuss et al. 1994a, Pieske et al. 1995), liegen für die Maus unterschiedliche Studienergebnisse vor. Berichte über die Kraft-Frequenz-Beziehung (FFR für Force-Frequency-Relationship) reichen bei der Maus von stark positiven FFRs (Gao et al. 1998) bis zu negativen FFRs (Redel et al. 2002), abhängig von Faktoren wie der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration oder der Temperatur.

Die Steigerung der Stimulationsfrequenz führt zu einem Anstieg der offenkundigen Wahrscheinlichkeit von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen (Piot et al. 1996) sowie zu einer Steigerung der intrazellulären Na^{+} -Konzentration (Harrison et al. 1992, Maier et al. 1997). Durch diese erhöhte intrazelluläre Na^{+} -Konzentration wird die Funktion des $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers in Richtung „reverse mode“ verschoben. Hierüber kommt es zu einem zusätzlich erhöhten Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle (Despa et al. 2002).

Durch den erhöhten Ca^{2+} -Einstrom nimmt das SR vermehrt Ca^{2+} auf. Die stärkere Beladung des SRs führt bei Kontraktion zu einer erhöhten Freisetzung von Ca^{2+} mit der Folge der Inotropie-Zunahme.

Bei Herzinsuffizienz konnte sowohl in vitro als auch in vivo in verschiedenen Studien an humanem Myokard eine flache oder gar negative Kraft-Frequenz-Beziehung belegt werden (Feldman et al. 1988, Mulieri et al. 1992, Hasenfuss et al. 1994b). Als Grund für diese Veränderung wird eine Störung in der intrazellulären Calciumhomöostase angenommen. In Studien konnte eine verminderte SERCA-Expression unter

1. Einleitung

Herzinsuffizienz (Hasenfuss et al. 1994b, Meyer et al. 1995) sowie zusätzlich eine verminderte Calciumkapazität des SR (Pieske et al. 1995, Schwinger et al. 1995, Lindner et al. 1998) gezeigt werden.

1.3.3 Post-Pausen-Potenzierung

Eine Stimulations- beziehungsweise Erregungspause führt – regelrechte Funktion der SERCA vorausgesetzt – im Myokard zur vermehrten Ca^{2+} -Aufnahme ins SR. Daher kann bei der nächsten Erregung mehr Ca^{2+} aus dem SR freigesetzt werden, und es kommt zu einem Anstieg der Kontraktilität, der als Post-Pausen-Potenzierung bezeichnet wird (Bers 1985, Bers et al. 1993). Beim gesunden Herz wird eine Zunahme der Dauer der Pause von einem weiteren Anstieg der Kontraktilität nach der Pause begleitet (Pieske et al. 1996).

1.3.4 Regulation durch adrenerge Stimulation

Im Myokard liegen neben β -adrenergen Rezeptoren (β -AR) auch α_1 -adrenerge Rezeptoren (α_1 -AR) vor (Govier 1968), wobei die Stimulation sowohl der β - als auch der α_1 -AR am Herzen eine Zunahme der Inotropie verursacht. Alle AR bestehen aus sieben Transmembrandomänen und leiten ihre Stimulation über GTP bindende trimere Proteine (G-Proteine) in das Zytosol weiter.

Die β -AR werden in drei Subtypen unterteilt, wobei der β_1 -AR am menschlichen Myokard etwa 75-80% aller β -AR ausmacht (Bristow et al. 1986). Der Anteil der α_1 -AR im Vergleich zu den β -AR liegt bei 15% (Bristow et al. 1988), somit entfällt der größte Teil der positiv inotropen Regulation durch adrenerge Stimulation auf die Funktion der β_1 -AR.

Unabhängig vom Subtyp führt die Stimulation der β -AR, beispielsweise durch das aus dem Nebennierenmark freigesetzte und systemisch zirkulierende Adrenalin, zur Dissoziation der stimulatorischen G-Proteine (G_s -Proteine) in deren Untereinheiten α , β und γ . Die katalytische α -Untereinheit aktiviert die Adenylatzyklase, die wiederum ATP in den second messenger cAMP umwandelt (Drummond und Severson 1979, Bristow et al. 1989).

Im Zytosol bindet cAMP an die regulatorischen Untereinheiten (R-Einheiten) der Proteinkinase A (PKA), deren katalytische C-Einheiten dadurch aktiviert werden und

1. Einleitung

abdissoziieren. Die aktivierte PKA phosphoryliert verschiedene Funktionsproteine: Die Phosphorylierung von Troponin I (TnI) bewirkt eine Abnahme der Ca^{2+} -Sensitivität der kontraktilen Proteine (Kajiwara et al. 2000) und damit eine beschleunigte Relaxation (positiv lusitroper Effekt) (Kentish et al. 2001). Die Phosphorylierung der Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ führt zum erhöhten transsarkolemmalen Ca^{2+} -Einstrom (Imoto et al. 1988, Brown und Birnbaumer 1990). Darüber hinaus phosphoryliert die PKA Phospholamban (PLN) (James P et al. 1989). Dieses Protein ist in unphosphoryliertem Zustand mit der SERCA assoziiert, hemmt diese in ihrer Aktivität und reduziert damit die Speicherung von Ca^{2+} im SR. Die Phosphorylierung führt zur Abdissoziation von PLN, damit fällt dieser inhibitorische Effekt weg (Sham et al. 1991).

Die Phosphorylierung der Ca^{2+} -sensitiven Ryanodinrezeptoren (RyR) (Hain et al. 1995, Reiken et al. 2003) durch die PKA führt zu einer erhöhten Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR (Vinogradova et al. 2002). Gesamtkonsequenz der PKA-Aktivierung ist also eine Zunahme der intrazellulären Verfügbarkeit von Ca^{2+} und dadurch eine Zunahme der Inotropie (Kontraktionskraft), Chronotropie (Kontraktionsfrequenz) und Dromotropie (Überleitungsgeschwindigkeit) sowie über die Phosphorylierung von TnI eine Zunahme der Lusitropie (Relaxationsgeschwindigkeit).

In der Herzinsuffizienz ist die Sympathikusaktivität selbst bei milden Formen dieser Erkrankung erhöht (Cohn et al. 1984, Rundqvist et al. 1997). Gleichzeitig kommt es, insbesondere bei einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM), zu einer Abnahme der β_1 -AR (Bristow et al. 1986, Böhm et al. 1988, Bristow et al. 1989, Pitschner et al. 1993) und damit zu einer relativen Zunahme der β_2 -AR (Bristow et al. 1986) und α_1 -AR (Bristow et al. 1988). Zusätzlich werden vermehrt inhibitorische G_i -Proteine gebildet (Böhm et al. 1994), wodurch weniger cAMP in der Zelle entsteht (Danielsen et al. 1989). Über diesen Signalweg kommt es zu einer verminderten Aktivierung von Proteinkinase A und daher zu einer verminderten Phosphorylierung von Phospholamban. Folge ist eine verminderte Enthemmung der SERCA mit verminderter Ca^{2+} -Speicherung im SR. Während der Systole steht damit weniger Ca^{2+} zur Verfügung, die Kontraktionskraft ist geringer. Bei Erhöhung der Stimulationsfrequenz kommt es vor allem zu einer Verkürzung der Diastole, sodass die Ca^{2+} -Aufnahme ins SR zusätzlich eingeschränkt ist. Diese Veränderungen führen zu gestörter Calciumhomöostase und kontraktile Dysfunktion.

Die geschilderten Mechanismen können in in-vivo-Studien zu einem verminderten Ansprechen des Myokards auf adrenerge Reize, beispielsweise auf den β -Agonisten Isoprenalin, führen.

1. Einleitung

1.3.5 Herzmuskelhypertrophie und Remodeling

Bei Druck- oder Volumenbelastung des Herzens kommt es, neben den kurz- und mittelfristigen oben genannten Veränderungen, zu einer Hypertrophie der Herzmuskelzellen. Nach dem Gesetz von LaPlace ist in einem näherungsweise kugelförmigen Hohlraum wie dem Herzen die Wandspannung (K) proportional zum Radius (r) und Innendruck (P) des Hohlraums sowie umgekehrt proportional zur Wanddicke (d): $K=r \cdot P/d$. Da also mit steigender Wanddicke die Wandspannung abnimmt und dadurch unter anderem die Myokardperfusion verbessert wird, kann eine Herzmuskelhypertrophie zunächst einen positiven Effekt auf die Herzfunktion bewirken. Wird jedoch das „kritische Herzgewicht“, beim Menschen ca. 500 g, dauerhaft überschritten, kommt es durch die Verlängerung der Diffusionsstrecke zwischen Kapillaren und Herzmuskelzellen im Endstromgebiet zu ischämischen Schädigungen im Herzmuskel.

Im weiteren Verlauf kann dieser Prozess zu einer Gefügedilatation führen, die zu einer deutlichen Erhöhung des Organdurchmessers und damit der Wandspannung führt.

Über die Hypertrophie hinaus kommt es bei der Herzinsuffizienz zu einem als Remodeling bezeichneten Prozess, der neben einem Untergang der Herzmuskelzellen und einer quantitativen und qualitativen Veränderung der extrazellulären Matrix von charakteristischen Veränderungen in der Genexpression begleitet ist (Colucci 1997). Auffällig dabei ist die Reaktivierung eines fetalen Genprogrammes, infolgedessen es zu einem Anstieg des atrialen natriuretischen Faktors (ANF) und des Brain-Natriuretic Peptides (BNP) kommt (Yoshimura et al. 1993). Zusätzlich findet ein Wechsel in den synthetisierten Isoformen der schweren Myosin-Kette (MHC) von der α - zur β -Isoform sowie der Aktin-Isoformen von der herzspezifischen zur skelettmuskelspezifischen Form statt (Chien et al. 1993). Darüber hinaus kommt es zu einer Abnahme der SERCA bei gleichzeitiger, vermutlich kompensatorischer, Zunahme des NCX (Hasenfuss et al. 1994b, Studer et al. 1994, Currie 1999). Auch die Menge des SERCA-Inhibitors Phospholamban (PLN) nimmt bei Herzinsuffizienz ab (Hasenfuss et al. 1997). Dahingegen ist der Calcineurin-Inhibitor Modulatorisches Calcineurin-Interagierendes Protein (MCIP) bei Hypertrophie erhöht. MCIP wirkt laut Rothermel et al. (2001) und Lemmens et al. (2007) hemmend auf eine weitere Hypertrophie des Myokards.

1.4 Kardiomyopathien

Kardiomyopathien sind Erkrankungen des Herzmuskels, die nicht durch vorausgegangene Erkrankungen (beispielsweise der Herzklappen) zu erklären sind. Sie werden nach Ätiologie in primär und sekundär unterteilt, wobei primären Kardiomyopathien eine Störung im Bereich des Herzmuskelgewebes zu Grunde liegt. In den Bereich der sekundären Kardiomyopathien fallen beispielsweise durch ischämische Prozesse und toxische oder endokrine Veränderungen verursachte Herzmuskel-erkrankungen.

Eine andere Einteilung der Kardiomyopathien erfolgt, unabhängig von ihrer Ursache, nach morphologischen Gesichtspunkten in

- Dilatative Kardiomyopathie (DCM)
- Hypertrophische Kardiomyopathie (HCM)
- Restriktive Kardiomyopathie (RCM)
- Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit genetisch bedingten primären Kardiomyopathien.

Im Folgenden wird eine grobe Übersicht über das Sarkomer mit den für diese Arbeit relevanten Strukturen gegeben, dann werden die beiden in dieser Arbeit behandelten Kardiomyopathie-Formen DCM und HCM genauer beschrieben. Sie stellen die häufigsten Formen der Kardiomyopathie dar.

1.4.1 Aufbau des Sarkomers

Das Sarkomer stellt die kleinste kontraktile Untereinheit des Muskels dar und ist aufgebaut durch ein hochgradig organisiertes Netz spezialisierter Proteine. Durch seinen sehr regelmäßigen Aufbau erscheint es unter dem Mikroskop gestreift; das dunkler erscheinende A-Band wechselt mit dem helleren I-Band. Im Bereich des A-Bandes liegen vornehmlich die dicken, hauptsächlich aus Myosin bestehenden Filamente, während im Bereich des I-Bands hauptsächlich die dünnen Filamente, aufgebaut aus F-Aktin, lokalisiert sind (Frey et al. 2006). An die Aktinfilamente angelagert ist der Troponin-Tropomyosinkomplex, dessen Calcium-abhängige Konformationsänderung die Bindungsstellen des Aktins freigibt und damit, wie in Abschnitt 1.2 beschrieben, eine Kontraktion zulässt.

1. Einleitung

Beidseits begrenzt wird jedes Sarkomer durch die Z-Scheiben, die eine Schlüsselfunktion bei der Mechanotransduktion zwischen dem kontraktilem Apparat und dem Zytoskelett einnehmen. Sowohl die Aktinfilamente als auch Titin, das mit 3,3 MDa größte menschliche Protein, sind hier verankert. Titin erstreckt sich über das halbe Sarkomer bis in die Mitte der A-Bande, wo es sich mit den Titinfilamenten der Gegenseite in der M-Linie überlappt. Zum einen sorgt Titin für die passive Rückstellkraft in mechanisch gedehnten Herzmuskelzellen, zum anderen scheint es über seine Interaktion mit Proteinen der Z-Scheibe, insbesondere Telethonin (auch T-Cap genannt), Signalfunktionen für Dehnungsreize wahrzunehmen (Granzier und Labeit 2004). Telethonin wiederum interagiert im Bereich der Z-Scheibe mit dem in dieser Arbeit behandelten Muscle-LIM-Protein (Knöll et al. 2002).

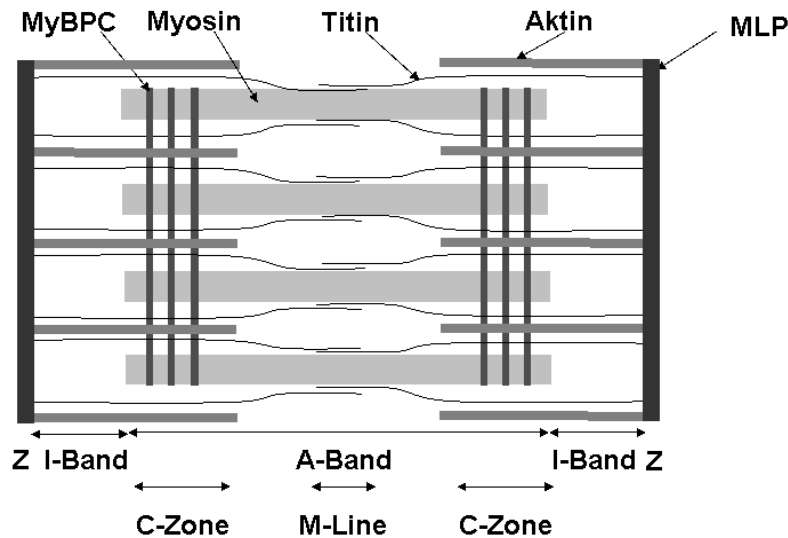


Abb. 1.2: Schematischer Aufbau des Sarkomers, zur besseren Übersicht auf die für diese Arbeit wesentlichen Proteine beschränkt.

1.4.2 Dilatative Kardiomyopathie

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist definiert durch vergrößerte systolische und diastolische Herzkammerdimensionen bei gleichzeitig eingeschränkter kontraktilem Funktion. Nach Ausschluss einer sekundären Kardiomyopathie auf Grund von koronarer Herzkrankheit, chronischem Alkoholabusus, Schilddrüsenerkrankungen oder viralen Infektionen wird oft die Diagnose einer idiopathischen DCM gestellt.

1. Einleitung

Die Prävalenz der DCM liegt bei 36,5/100 000 Einwohner (Codd et al. 1989). Damit ist die DCM die häufigste Ursache für eine chronische Pumpschwäche des Herzens (Congestive Heart Failure). Das klinische Erscheinungsbild der DCM ist in erster Linie eine Herzinsuffizienz, dazu kommen häufig Herzrhythmusstörungen.

Familienstudien der letzten zehn Jahre mit echokardiographischen Kontrollen von Verwandten betroffener Patienten zeigten, dass etwa 25-30% der idiopathischen DCM durch eine vererbte Genmutation entstehen (Grunig et al. 1998). Meist liegt dabei ein autosomal-dominanter Erbgang vor.

Eine DCM kann zum einen bei Störungen in der Kraftübertragung vom Sarkomer auf die extrazelluläre Matrix, zum Beispiel bei muskulären Dystrophien mit Mutationen in den Genen für Dystrophin und anderen Sarkoglykanen (Straub und Campbell 1997), entstehen. Zum anderen kann sie eine Folge der Störung der Kraftentwicklung, zum Beispiel bei Mutationen von Proteinen des Sarkomers wie der schweren β -Myosin-Kette (β -MHC) und Troponin T, sein. (Kamisago 2000)

Mutationen im Muscle-LIM-Protein (MLP) können ebenfalls zu einer DCM führen. MLP ist ein Strukturprotein, welches im Bereich der Z-Scheibe des Sarkomers lokalisiert ist.

1.4.3 Hypertrophische Kardiomyopathie

Die hypertrophische Kardiomyopathie (HCM) ist definiert als Herzerkrankung mit verdicktem, jedoch nicht erweitertem linken Ventrikel nach Ausschluss von kausalen Ursachen wie zum Beispiel Hypertension oder Aortenklappenstenose (Maron 1997). Typisch sind ein verdicktes interventrikuläres Septum und eine verdickte Hinterwand des linken Ventrikels, häufig begleitet von einer hyperkontraktilen systolischen Dysfunktion (Towbin und Bowles 2002).

Die Prävalenz der HCM liegt bei 0,2% der Bevölkerung (Maron 1997). Viele Patienten mit HCM sind asymptomatisch oder haben nur geringe Beschwerden. Allerdings haben sie ein besonders hohes Risiko für tachykarde Herzrhythmusstörungen und Synkopen. Bei jungen Menschen ist die HCM sogar die häufigste Ursache für den plötzlichen Herztod (Maron et al. 1996). Ebenso wie die DCM führt die HCM zu einer fortschreitenden Herzinsuffizienz.

Die zu Grunde liegenden Defekte betreffen meist Proteine des Sarkomers wie β -MHC und Troponin T, α -Tropomyosin oder Myosin-Binding-Protein C (MyBPc) (Maron 1997). Jeweils etwa 40% der familiären HCM werden durch Mutationen in der β -MHC beziehungsweise im MyBPc verursacht (Richard et al. 2003).

1.5 Studien am Mausmodell

Die Maus ist die Säugetierart der Wahl für genetisch manipulierte Studienmodelle. Unter physiologischen Bedingungen schlägt das Herz einer Maus mit einer Frequenz von 500-600 Schlägen pro Minute. In kleinen Säugetieren wie der Maus liegt dabei die maximale Herzfrequenz etwa 50-70% über der Herzfrequenz in Ruhe, während bei grossen Säugetieren wie dem Menschen eine Steigerung der Herzfrequenz um das 2-3 fache der Herzfrequenz in Ruhe möglich ist (Vornanen 1992).

Die Freisetzung von Calcium in Mausmyozyten ist laut Bridge et al. (1999) mit der in anderen Säugetierspezies, und damit auch der im menschlichen Myokard, vergleichbar. Jedoch gibt es hinsichtlich der in die diastolische Relaxation involvierten Ca^{2+} -Transportprozesse Unterschiede zwischen Mensch und Maus: Beim Menschen werden ähnlich wie beim Kaninchen 70% des intrazellulären Ca^{2+} vom SR aufgenommen (Bers 2001), während der NCX etwa 28% zur Ca^{2+} -Elimination aus der Zelle beiträgt. Dagegen werden bei der Maus ähnlich wie bei der Ratte 92% des intrazellulären Ca^{2+} vom SR aufgenommen (Li et al. 1998), und der NCX trägt nur etwa 7% zur Ca^{2+} -Elimination bei. Die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase und der mitochondriale Ca^{2+} -Uniporter haben weder beim Menschen noch bei der Maus eine quantitative funktionelle Bedeutung bei der Elimination des zytosolischen Ca^{2+} .

Eine Herzinsuffizienz führt beim Menschen zu einer verminderten Expression der SR Ca^{2+} -ATPase und einer vermehrten Expression des NCX (Hasenfuss 1998), so dass der Anteil des vom NCX aus der Zelle transportierten Ca^{2+} steigt.

Die von Arber 1997 beschriebene MLP-knock-out-Maus (Arber et al. 1997) war eines der ersten Tiermodelle für DCM, bei dem die Tiere neben einer Kardiomyopathie auch eine Hypertrophie mit Herzinsuffizienz entwickelten. Als erste Tiermodelle für die HCM erschienen Veröffentlichungen über die MyBPC-knock-out-Maus von Harris et al. (2002) sowie von Carrier et al. (2004).

1.6 Untersuchte Proteine

1.6.1 Muscle-LIM-Protein – Lokalisation und Struktur

Das Muscle-LIM-Protein (MLP) kommt in allen quergestreiften Muskelgeweben vor, also sowohl im Herz- wie auch im Skelettmuskel. MLP besteht aus 194 Aminosäuren, die zwei so genannte LIM-Zink-Finger-Regionen bilden, gefolgt von jeweils einer Glycin-reichen Region (Schallus et al. 2009). Die LIM-Zink-Finger-Regionen sind durch ein Zwischenstück mit einer Länge von 58 Aminosäuren voneinander getrennt (Wang et al. 1992, Arber et al. 1994). LIM steht dabei als Akronym für eine Proteinfamilie, deren zuerst entdeckte Vertreter von den Genen mit dem Namen Lin-11 (aus *Caenorhabditis elegans*), Isl-1 (aus Ratten) und Mec-3 (ebenfalls aus *Caenorhabditis elegans*) kodiert wurden (Way und Chalfie 1988, Freyd et al. 1990, Karlsson et al. 1990). In seinem Aufbau ist es dem Cystein-reichen Protein (CSRP), einem vor allem in Fibroblasten der Lunge exprimierten Protein, sehr ähnlich (Wang et al. 1992), weshalb MLP in der Literatur auch unter dem Namen CSRP3 beschrieben wird. Da jedoch die Mehrzahl der Autoren den Begriff MLP verwendet, wird die einheitliche Bezeichnung des Proteins in der vorliegenden Arbeit ebenfalls MLP lauten.

Das LIM-Motiv ist häufig Teil von Proteinen, die regulatorische Funktionen in der Zelldifferenzierung und im Zellzyklus ausüben. Bei der Differenzierung der Herzmuskelzellen ist MLP als essentieller positiver Regulator bekannt. Dabei ist MLP in der Phase der Differenzierung myogener Zellen (Arber et al. 1994) und bei rechtsventrikulärer Hypertrophie durch chronische Druckbelastung (Ecarnot-Laubriet et al. 2000) vermehrt im Nukleus lokalisiert. Dabei liegt MLP im Sarkolemm und im Bereich des Zytoskeletts als Oligomer vor, während es im Nukleus nur als Monomer existiert; ein nukleo-zytoplasmatischer Austausch von MLP konnte nachgewiesen werden (Boateng et al. 2009).

Für eine zentrale regulatorische Rolle spricht auch die hohe Homologie von MLP über verschiedene Spezies hinweg: Das MLP von Ratte und Huhn ist zu 93% identisch (Arber et al. 1994).

1. Einleitung

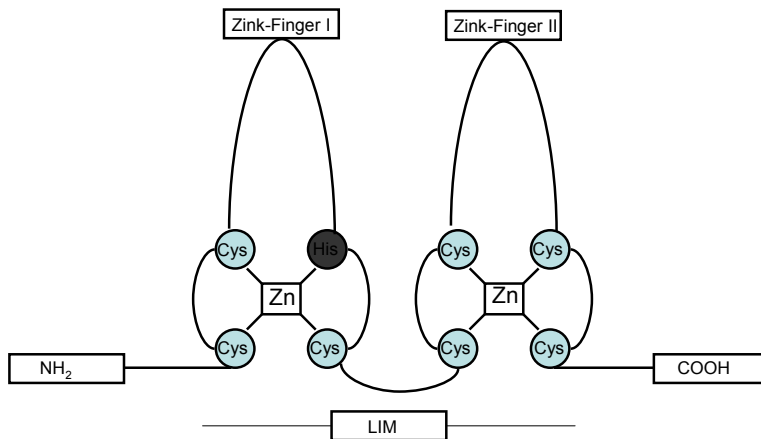


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der charakteristischen Zink-bindenden LIM-Domäne (modifizierte Darstellung aus Geier et al. 2003, Seite 1392)

MLP wurde unter physiologischen Bedingungen in der reifen Muskelzelle zunächst an der Z-Scheibe des Sarkomers lokalisiert (Arber et al. 1997). Die Z-Scheibe ist ein aus vielen verschiedenen Proteinen aufgebauter Komplex an der Schnittstelle zwischen kontraktilem Apparat, Zytoskelett und Sarkolemm. MLP ist über seine Interaktionspartner α -Aktinin (Louis et al. 1997) mit der Z-Scheibe sowie über Telethonin (T-Cap) (Knöll et al. 2002) mit Titin verbunden (Gregorio et al. 1998) und könnte als Gerüstprotein für die richtige Anordnung der interagierenden Proteine entlang des Aktinskeletts sorgen. Dabei ist vor allem das erste LIM-Motiv (M1) für die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Myo D notwendig (Kong et al. 1997), während das zweite LIM-Motiv (M2) mit dem Aktingerüst interagiert (Arber und Caroni 1996).

Weitere Untersuchungen zeigen, dass MLP auch in anderen Zellkompartimenten zu finden ist, so zum Beispiel im Bereich von Zell-Zell-Verbindungen wie den Costameren, wo es mit beta-I-Spektrin interagiert (Flick und Konieczny 2000) oder an den Fasciae adhaerentes, wo es mit N-RAP interagiert (Ehler et al. 2001).

1. Einleitung

1.6.2 Muscle-LIM-Protein – Funktion und Studienlage

Das Muscle-LIM-Protein wurde im Jahre 1994 zum ersten Mal im Zusammenhang mit der Regulation der Myogenese in der Fachliteratur beschrieben. Entdeckt wurde es in quergestreiftem Muskelgewebe von Vertebraten, wo es nach Denervierung in erhöhtem Maße vorkam (Arber et al. 1994).

Es wird vermutet, dass MLP eine zentrale Aufgabe als Sensor für mechanischen Stress einnimmt (Knöll et al. 2002), der dann wiederum zur Reaktivierung eines fetalen Genprogramms führt (Clark et al. 1993). Daneben scheint es auch in die Übertragung von humoralen Wachstumssignalen in Herzmuskelzellen involviert zu sein (Arber et al. 1994, Heineke et al. 2003).

Die im Jahre 1997 von Arber et al. (1997) beschriebene MLP-Knock-Out-Maus entwickelte eine DCM mit Herzinsuffizienz unter Beteiligung aller Herzkammern. Etwa 50-70% der MLP-defizienten Mäuse entwickelten bereits in der ersten Lebenswoche körperliche Symptome und verstarben innerhalb von 20-30 Stunden nach Auftreten der Symptome (Früher Phänotyp). Die restlichen Mäuse erreichten das Erwachsenenalter, entwickelten aber dennoch eine DCM. Zusätzlich fanden die Autoren eine strukturelle Störung der Kardiomyozyten sowie ein Dekrement bei hochfrequenter Stimulation der Gliedergürtelmuskulatur (Arber et al. 1997, Knöll et al. 2002).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass der DCM der MLP-Knock-Out-Mäuse eine diastolische Dysfunktion und abnorme Eigenschaften der passiven Kraftentwicklung vorausgehen (Omens et al. 2002, Lorenzen-Schmidt et al. 2005). Auf zellulärer Ebene wurde eine Störung der elektromechanischen Kopplung mit erniedrigten Calcium-Transienten und verminderter Sensitivität der kontraktilen Elemente für Calcium beschrieben (Esposito et al. 2000). Dabei konnte durch Blockade der β -Adrenorezeptor-Kinase (β -ARK) (Esposito et al. 2000) oder durch gentechnische Elimination von Phospholamban (PLN) als Inhibitor der SERCA (Minamisawa et al. 1999) eine normale Funktion der elektromechanischen Kopplung in MLP-Knock-Out-Mäusen wieder hergestellt werden.

Eine Missense-Mutation im menschlichen MLP-Gen, die zum Austausch des Tryptophan in Position 4 durch Arginin führt, wurde im Zusammenhang mit einer DCM beschrieben (Knöll et al. 2002). Das mutierte MLP zeigte in in-vitro-Experimenten eine abgeschwächte Interaktion mit dem Z-Scheiben-Protein Telethonin (T-Cap), und transgene Mäuse, die anstelle des Wildtyp-MLP ein solcherart mutiertes MLP exprimieren, entwickelten eine HCM (Knöll et al. 2010). Geier et al. (2003) identifizierten eine MLP-Mutation, die beim

1. Einleitung

Menschen mit einer HCM einher geht. Darüber hinaus wurden verminderte MLP- Mengen bei chronischer Herzinsuffizienz beschrieben (Zolk et al. 2000).

1.6.3 Cardiac-Myosin-Binding-Protein-C – Lokalisation und Struktur

Das Cardiac-Myosin-Binding-Protein-C (MyBPc) wurde im Jahre 1973 zum ersten Mal als Kontaminierung bei der Myosin-Aufreinigung in der Fachliteratur beschrieben (Offer et al. 1973).

Die herzspezifische Isoform des MyBPc besteht aus 1173 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von rund 137 kDa. Das Protein wird durch insgesamt 10 Exons kodiert. Das Interesse an der Funktion und Struktur dieses Proteins ist in den letzten zehn Jahren immens gestiegen. Grund dafür ist die Entdeckung, dass Mutationen im MyBPc die Ursache bei einer großen Zahl von Patienten mit Familiärer Hypertrophischer Kardiomyopathie (FHC) sind (Bonne et al. 1998, Redwood et al. 1999).

Im Bereich des N-Terminus besitzt MyBPc drei Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase A, die wiederum durch adrenerge Stimulation aktiviert wird (Kögler 2006), siehe auch (Jeacocke und England 1980). Zusätzlich zu diesen gibt es eine Phosphorylierungsstelle für die Calcium-Calmodulin-Kinase (Gautel et al. 1995).

Lokalisiert ist MyBPc in der A-Bande des Sarkomers, wo es mit Myosin (Moos et al. 1975), Aktin (Moos et al. 1978, Yamamoto 1986) und Titin (Koretz et al. 1993, Soteriou et al. 1993) interagiert.

1.6.4 Cardiac-Myosin-Binding-Protein-C – Funktion und Studienlage

Im Jahre 2002 beschrieben Harris et al. eine MyBPc-Knock-Out-Maus, bei der die Exons 3 bis 10 deletiert waren. Die Knock Out-Tiere zeigten eine HCM mit eingeschränkter systolischer und diastolischer Funktion sowie eine verminderte Calcium-Sensitivität der permeabilisierten Kardiomyozyten, während die MyBPc-heterozygoten Tiere keine Auffälligkeiten zeigten (Harris et al. 2002).

Die im Jahre 2004 von Carrier et al beschriebene MyBPc-Knock-Out-Maus wurde durch die Deletion der Exons 1 und 2 des MyBPc-Gens hergestellt, die die Initiationsstelle für

1. Einleitung

die Transkription enthalten. Daher werden weder intakte noch unvollständige Formen von MyBPC synthetisiert. Die Tiere entwickelten innerhalb der ersten vier Lebensmonate eine exzentrische Hypertrophie des linken Ventrikels mit einer verminderten Verkürzungsfraction der Herzmuskulatur. Nach neun Lebensmonaten wurde bei gleichzeitigen Strukturunregelmäßigkeiten des Myokards und einem Anstieg der interstitiellen Fibrose eine deutlich eingeschränkte Relaxation festgestellt. Mäuse, bei denen nur ein Allel des MyBPC-Gens vorhanden war, entwickelten eine asymmetrische Hypertrophie des Kammerseptums, kombiniert mit einer Fibrosierung des Myokards nach elf Lebensmonaten. Eine Beeinträchtigung der Funktion des linken Ventrikels konnte jedoch nicht festgestellt werden (Carrier et al. 2004).

Weitere Untersuchungen zeigten eine erhöhte Calcium-Sensitivität der permeabilisierten MyBPC-Knock-Out-Kardiomyozyten bei einer Sarkomerlänge von 1,9 μm . Laut dieser Studie ist die bereits in anderen Studien beschriebene Abnahme der Calcium-Sensitivität unter PKA-Aktivität von der Anwesenheit des MyBPC abhängig (Cazorla et al. 2006).

Dieser Aussage stehen Studien gegenüber, bei denen die Abnahme der Calcium-Sensitivität unter PKA-Aktivität von der Anwesenheit des herzspezifischen Proteins Troponin I abhängig ist (Pena und Wolska 2004, Kögler 2006).

Eine erhöhte Calcium-Sensitivität durch verminderte MyBPC-Konzentrationen in Herzmuskelzellen von Ratten sowie in Skelettmuskelfasern von Kaninchen wurde bereits 1991 beschrieben (Hofmann et al. 1991).

In einer Screening-Studie an Patientenkollektiven wurde festgestellt, dass etwa 40% der familiären HCM durch Mutationen im MyBPC-Gen verursacht sind (Richard et al. 2003). Ein zugrunde liegender molekularer Mechanismus für die Entstehung der HCM ist noch nicht entdeckt. Es existiert die Vermutung, dass die durch Mutation in ihrer Struktur veränderten Proteine als „poison peptides“ zu Funktionsstörungen der Zelle führen (Schwartz 1995, Sarikas et al. 2005).

1. Einleitung

1.7 Fragestellung dieser Arbeit

Wie in Abschnitt 1.6.2 beschrieben, führt der Verlust von MLP in Mäusen zu einer DCM. MLP scheint dabei eine zentrale Aufgabe in der Umwandlung von Dehnungssignalen zu Hypertrophieanreizen einzunehmen. Im Gegensatz dazu führt der Verlust von MyBPc in Mäusen zu einer HCM, wie in 1.6.4 beschrieben. Beide Mausmodelle sind hinsichtlich der zeitlichen Entwicklung und der Form und physiologischen Auffälligkeiten ihrer Kardiomyopathien hinreichend beschrieben. Weiterhin wurden Mausmodelle beschrieben, in denen der zusätzliche Ausfall von Phospholamban (PLN) (Minamisawa et al. 1999) oder die Blockade der β -Adrenorezeptor-Kinase (β -ARK) (Esposito et al. 2000) zu einer weitgehenden Normalisierung des Phänotyps der MLP-Knock-out-Maus geführt haben.

In der vorliegenden Arbeit werden folgende drei Genotypen untersucht:

- Kombiniert MLP $^{-/-}$ und MyBPc $^{-/-}$, bezeichnet als Doppel-Knock-Out (DKO)
- MLP $^{+/-}$ und MyBPc $^{-/-}$, bezeichnet als MLP-HETerozygote (MLPHET)
- MLP $^{+/-}$ und MyBPc $^{+/-}$, bezeichnet als Doppel-HETerozygote (DHET).

Dabei dienen die DHET-Mäuse als normale Kontrolle, da so ein direkter Vergleich zwischen Geschwistertieren aus dem selben Wurf möglich ist und unspezifisierbare genetische Unterschiede, wie sie bei Verwendung von entfernt verwandten Wildtypen aufgetreten wären, minimiert werden können. In Voruntersuchungen haben die DHET-Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen desselben genetischen Hintergrundstammes vernachlässigbare kardiale Auffälligkeiten gezeigt (siehe auch 4.2).

Die Tiere der MLPHET-Gruppe repräsentieren in der vorliegenden Arbeit den Einfach-Knockout von MyBPc, da das Vorliegen eines heterozygoten MLP-Allels zu kaum verminderten MLP-Konzentrationen führt (R. Knöll, persönliche Kommunikation).

Folgende Fragestellungen werden im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet:

1. Welchen kardialen Phänotyp weist eine MLP/MyBP-C-Doppel-KO-Maus im Vergleich zur MLP-heterozygoten Maus und im Vergleich zu einer Maus auf, bei der sowohl das Gen für MLP als auch für MyBPC zumindest heterozygot vorliegen?

1. Einleitung

2. Liegt bei den Mäusen eine Kardiomyopathie vor, und wenn ja: Welche Form (hypertrophisch vs. dilatativ) dominiert?
3. Führt der doppelte Gen-Knock-Out zu einer sich addierenden Beeinträchtigung der Herzfunktion oder aber führt die MLP-Defizienz zu einer Abschwächung des MyBP-C-Knock-Out-Phänotyps durch ein Ausbleiben der pathologischen Hypertrophie-Wachstumssignal-Kaskade?
4. Ist die adrenerge Stimulierbarkeit in einer der Mausgruppen als Folge der Herzinsuffizienz verändert?
5. Gibt es Anzeichen für eine Beeinträchtigung der Calcium-Homöostase und/oder gibt es Veränderungen in der myofilamentären Ansprechbarkeit für Calcium?
6. Zeigen die verschiedenen Mausgruppen Unterschiede in der Histologie in Bezug auf die Ausprägung der Fibrose oder Hypertrophie der Kardiomyozyten?
7. Gibt es Anzeichen für eine Beeinträchtigung der Skelettmuskulatur in Abhängigkeit vom Verlust des MLP-Gens, wie 1997 von Arber et al. beschrieben?
8. Beinhaltet die Hypertrophie im Rahmen der Herzinsuffizienz auch veränderte Proteinisoformen im Sinne der Reaktivierung eines fetalen Gen-Expressionsprogrammes?

2 Material und Methoden

2.1 Lösungen

2.1.1 Experimentierlösungen Muskelstreifenexperimente

2.1.1.1 Krebs-Henseleit-Lösung

Die Krebs-Henseleit-Lösung stellte die Basislösung dar, mit der die intakten Muskelstreifen während des Experiments kontinuierlich perfundiert wurden. Zunächst wurde eine Stammlösung in zehnfacher Konzentration ohne Glucose, Kalziumchlorid und Natriumhydrogencarbonat hergestellt. Diese wurde maximal sechs Wochen lang verwendet.

Am Gebrauchstag wurden dann Glucose, Kalziumchlorid und Natriumhydrogencarbonat eingewogen und zu der auf einfache Konzentration verdünnten Lösung gegeben.

Bezeichnung	Summenformel	Molare Masse in g/mol	Konzentration
Natriumchlorid	NaCl	58,44	116,0 mM
Kaliumchlorid	KCl	74,55	5,0 mM
Magnesiumchlorid	MgCl ₂	95,21	1,2 mM
Natriumsulfat	Na ₂ SO ₄	142,04	1,2 mM
Natrium-di-Hydrogenphosphat	NaH ₂ PO ₄	119,98	2,0 mM
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,16	10,0 mM
Kalziumchlorid*	CaCl ₂	110,99	1,25 mM
Natriumhydrogen-carbonat	NaHCO ₃	84,01	20,0 mM

*Dissektionslösung nur mit 0.25 mM Kalziumchlorid

Tab. 2.1: Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung; angegeben ist hier die Konzentration der fertigen Versuchslösung

2. Material und Methoden

Durch Begasung der Lösung mit Carbogen, welches zu 95% aus O₂ und zu 5% aus CO₂ besteht, wurde der pH-Wert konstant bei 7,40 gehalten. Das in der Lösung enthaltene Hydrogencarbonat bildet mit Carbogen zusammen ein offenes Puffersystem.

2.1.1.2 Dissektionslösung

Zur Herstellung der Dissektionslösung wurde die Krebs-Henseleit-Lösung mit 20,0 mM 2,3-Butan-Dion-Monoxim (BDM; Summenformel C₄H₇NO₂) supplementiert. Um eine Kontraktur des Myokards zu verhindern, wurde darüber hinaus eine verminderte Kalziumchlorid-Konzentration (0,25 mM) eingesetzt.

Direkt nach der Entnahme wurden die Präparate zum Schutz des Myokards in diese 2,3-Butan-Dion-Monoxim-haltige Dissektionslösung gegeben (Mulieri et al. 1989). BDM blockiert die Interaktion zwischen Aktin und Myosin. Dadurch wird die elektromechanische Kopplung inhibiert. Auf diese Weise werden mögliche Kontraktionen unterbunden und der Sauerstoffbedarf des Gewebes herabgesetzt. Die anschließende Präparation wurde ebenfalls in Dissektionslösung durchgeführt. Der pH-Wert wurde durch Begasung der Dissektionslösung mit Carbogen konstant gehalten.

2.1.2 Experimentierlösungen für Skinned Fibers

2.1.2.1 Skinning-Lösung

Die Skinning-Lösung setzte sich aus der in Tab. 2.2 beschriebenen Relaxationslösung zusammen. Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure (EGTA) gehört zu den Chelatoren und bildet mit zweiwertigen Metallionen, in diesem Fall Calcium, Chelatkomplexe.

Durch Zugabe des nicht-ionischen Detergens Triton X-100 in einer Konzentration von 1% (Vol/Vol) wurde bei ständiger Durchmischung über 24 Stunden die Entmembranisierung des Muskelstreifens herbeigeführt. Die Zugabe des Fettlösers Triton führt zur Bildung von Mizellen und damit zur Auflösung der Zellmembranen.

2. Material und Methoden

Bezeichnung	Summenformel	Molare Masse in g/mol	Konzentration
Imidazol	$C_3H_4N_2$	68,08	20 mM
Adenosintriphosphat (ATP)	$C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$	605,2	10 mM
Creatinphosphat	$C_4H_9N_3O_5P$	210,11	10 mM
Natriumazid	NaN_3	65,01	5 mM
Ethylenglykol- bis(aminoethylether)- N,N'-Tetraessigsäure (EGTA)	$C_{14}H_{24}N_2 O_{10}$	380,35	5 mM
Magnesiumchlorid	$MgCl_2$	95,21	12,5 mM
Kalziumchlorid*	$CaCl_2$	110,99	5 mM

*Relaxationslösung ohne Kalziumchlorid; Aktivierungslösung mit Kalziumchlorid

Tab. 2.2: Zusammensetzung der Aktivierungs- bzw. Relaxationslösung

2. Material und Methoden

Basierend auf dieser Stammlösung wurden folgende elf Lösungen mit ansteigender Kalziumkonzentration hergestellt.

Bezeichnung	Kalziumkonzentration	pCa ²⁺
Relaxationslösung	2,99 x 10E-11	10,52
10	1,66 x 10E-7	6,78
20	3,73 x 10E-7	6,43
30	6,4 x 10E-7	6,19
40	9,94 x 10E-7	6
50	1,49 x 10E-6	5,83
60	2,23 x 10E-6	5,65
70	3,46 x 10E-6	5,46
80	5,87 x 10E-6	5,23
90	1,25 x 10E-5	4,9
Aktivierungslösung	5,15 x 10E-5	4,29

Tab. 2.3: Darstellung des Kalzium- Gehalts der Versuchslösungen für die Kalzium-Aktivierungsreihe

2.2 Beschreibung des Mausmodells

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines Kooperationsprojekts mit der Arbeitsgruppe kardiovaskuläre Molekulargenetik, Prof. Dr. med. Ralph Knöll, Herzzentrum Göttingen, durchgeführt. Die Mäuse wurden dankenswerterweise von deren Leiter Prof. Dr. med. Ralph Knöll zur Verfügung gestellt. Sowohl Zucht als auch Genotypisierung der Tiere fand ebenfalls in dieser Abteilung statt.

Alle Untersuchungen wurden verblindet vorgenommen, das heißt jedes Tier war durch eine Nummer codiert. Die Gruppenzugehörigkeit der Tiere wurde erst nach Abschluss der experimentellen Datenerhebung offengelegt.

2. Material und Methoden

Für die Durchführung der Versuche wurden sowohl weibliche als auch männliche ausgewachsene Mäuse verwendet. Dabei ergaben sich folgende Tierzahlen:

Genotyp	Anzahl der Tiere; Anzahl der weiblichen Tiere in Klammern
MLP ^{-/-} und MyBPc ^{-/-} (DKO)	9 (4)
MLP ^{+/-} und MyBPc ^{-/-} (MLPHET)	14 (7)
MLP ^{+/-} und MyBPc ^{+/-} (DHET)	5 (3)

Tab. 2.4: Darstellung der Genotypen, Anzahl der verwendeten Versuchstiere je Gruppe

2.3 Echokardiographie der Mäuse

Die Echokardiographie der Mäuse wurde dankenswerterweise von Dr. Albrecht Schmidt, Abteilung Kardiologie und Pneumologie, Herzzentrum Göttingen, durchgeführt.

Die echokardiographische Untersuchung der Mäuse erfolgte verblindet unter Avertin-Narkose. Gegenüber anderen Anästhetika hat Avertin (2,2,2-Tribromethanol) die Vorteile einer schnell einsetzenden Wirkung bei kurzer Halbwertszeit und minimaler kardiodepressiver Wirkung (Roth et al. 2002). Die Avertin-Dosierung erfolgte gewichtsadaptiert mit 0,25 mg pro kg Körpergewicht; die Injektion erfolgte intraperitoneal.

Anhand dreier aufeinander folgender Kontraktionszyklen des Herzens wurde der Durchmesser des linken Ventrikels in Diastole (LVEDD für linksventrikulärer enddiastolischer Diameter) und Systole (LVESD für linksventrikulärer endsystolischer Diameter) vermessen. Aus diesen beiden Parametern wurde über folgende Formel die Verkürzungsfraction (FS für fractional shortening) berechnet:

$$FS(\%) = \frac{(LVEDD - LVESD)}{LVEDD} * 100$$

Darüber hinaus wurden die Dicke des interventrikulären Septums (IVS oder SW für septum wall) und die Dicke der Hinterwand des linken Ventrikels (PW für posterior wall) jeweils zum Ende der Diastole bestimmt. Die Vermessungen erfolgten gemäß den Richtlinien der American Association of Echocardiography (Sahn et al 1978).

2.4 Muskelstreifenexperimente – Versuchsaufbau

2.4.1 Aufbau der Versuche mit intakten multizellulären Muskelstreifen

2.4.1.1 Organbad

Das Organbad wurde aus einem Flüssigkeitsreservoir über einen geschlossenen Flüssigkeitskreislauf mittels einer in den Kreislauf geschalteten Pumpe mit Krebs-Henseleit-Lösung versorgt. Ein kontinuierlicher Austausch der Lösung wurde durch den an den entgegen gesetzten Enden des Beckens gelegenen Zu- und Ablauf gewährleistet.

Über einen zweiten geschlossenen Flüssigkeitskreislauf, der an eine Heizung angeschlossen war, wurden sowohl das doppelwandige Flüssigkeitsreservoir als auch das zum Organbad führende doppelwandige Schlauchsystem mit warmem Wasser perfundiert. Auf diese Weise wurde im Organbad eine Temperatur der Krebs-Henseleit Lösung von 37°C gewährleistet.

Das Organbad selbst bestand aus einer in Plexiglas gefrästen Nut.

Auf einer Seite diente als Aufhängung ein aus dünnem Draht gebogener spitzer Haken. Dieser war in einer Mikrometerschraube fixiert, über die die Position des Hakens in der Längsrichtung des Beckens verändert werden konnte.

Auf der gegenüber liegenden Seite des Beckens befand sich der Kraftaufnehmer mit einer ebenfalls aus dünnem Draht gefertigten Öse.

An den Seiten der Nut eingelassen befanden sich Kontaktdrähte, die an einen Stimulator (Firma Scientific Instruments, Heidelberg) angeschlossen waren. Über diese Kontaktdrähte wurde der elektrische Impuls auf die Lösung als Feldstimulation zum im Organbad befindlichen Muskelstreifen geleitet.

Der Muskelstreifen war durch Haken und Öse fixiert; die Dynamik der Kontraktionen konnte auf diese Weise vom Kraftaufnehmer detektiert werden.

2.4.1.2 Lösungszirkulation

Im beheizten Flüssigkeitsreservoir befanden sich 100 ml Krebs-Henseleit-Lösung. Über das ebenfalls partiell beheizte Schlauchsystem wurde die Lösung zum Organbad geleitet.

2. Material und Methoden

Von hier führte ein zweiter Schlauch die Lösung über die Pumpe in das Flüssigkeitsreservoir zurück. Zum Ablassen der Lösung oder Ausspülen von BDM wurde der Schlauch aus dem Reservoir genommen, wodurch der Kreislauf geöffnet wurde.

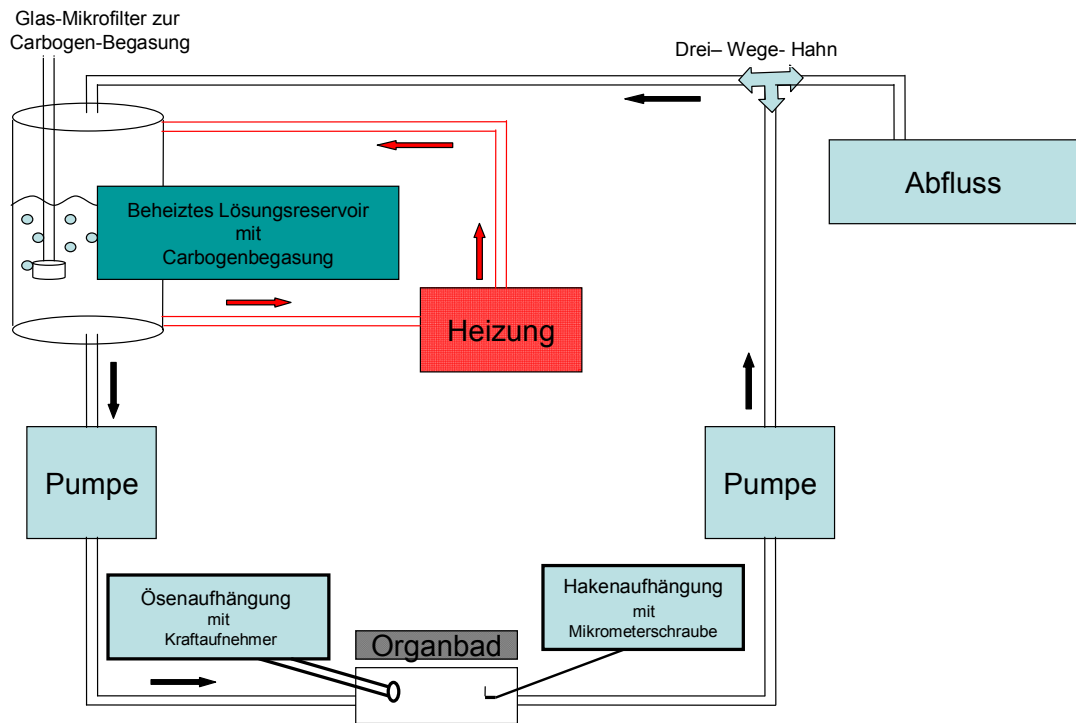


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für intakte Muskelstreifen

2.4.1.3 Kraftaufnahme und Übertragung

Die Drahtöse, in die der Muskelstreifen gehängt wurde, war an einem Kraftaufnehmer (Firma Scientific Instruments, Heidelberg, Typ KG3) fixiert. Die Kontraktionen des Muskelstreifens führten zu einer minimalen Auslenkung des Kraftaufnehmers (quasi-isometrische Kontraktion). Diese wurden über einen Brückenverstärker (Firma Scientific Instruments, Heidelberg) in ein der Zugspannung proportionales analoges Spannungssignal umgewandelt. Dieses Signal wurde wiederum an die analog/digitale Wandlerkarte (Firma National Instruments, Typ PCI 1200) des Messcomputers weitergeleitet.

2. Material und Methoden

2.4.1.4 Datenakquisition und Evaluation

Die Datenaufzeichnung erfolgte mittels eines in der Softwareumgebung LabView (Firma National Instruments) erstellten Programms. Durch den Stimulator getriggert zeichnete es jeweils 900 Datenpunkte im Abstand einer Millisekunde auf. Am Bildschirm erschien dann eine Darstellung der Spannungswerte über die Zeit.

Von den aufgezeichneten Daten wurden zwei Dateien angelegt: Zum einen eine Chartdatei, in der fortlaufend der während jedes Triggerzyklus registrierte Minimalwert (diastolischer Wert, Ruhespannung) mit dem Maximalwert der entwickelten Kraft verbunden aufgetragen wurde. Anhand dieser Datei konnte man den Ablauf des gesamten Experiments im Überblick darstellen.

Zum anderen wurde für die genaue Analyse der relevanten Messparameter eine Averagedatei angelegt. Per Tastendruck konnten hier fünf Einzelzuckungen gemittelt und abgespeichert werden.

Die Datenaufzeichnung basierte auf einem im Rahmen einer Kalibrierung von Kraftaufnehmer und Kraftmessbrücke gewonnenen Eichfaktor. Über diesen Eichfaktor und nach Eingabe von Breite und Dicke des Streifenpräparates wurde die elektrische Spannung in Zugspannung (mN/mm^2) umgerechnet. Zur Identifikation der einzelnen Average-Werte konnten in einem separaten Textfeld Kommentare zu den Messungen abgespeichert werden.

Folgende Parameter wurden bei der Auswertung automatisch berechnet: Entwickelte Zugspannung, Zeit bis zum Kraftmaximum, diastolische Zugspannung, maximale Kontraktionsgeschwindigkeit und maximale Relaxationsgeschwindigkeit, beide zusätzlich normalisiert angegeben, indem sie durch die entwickelte Kraft dividiert wurden. Des Weiteren die Zeit bis zu 90% Relaxation, die Zeit bis zu 50% Relaxation, 90% der Relaxationszeit und 50% der Relaxationszeit. Die jeweiligen Werte wurden in einem Dateiformat abgespeichert, das die Extraktion in ein Tabellenkalkulationsprogramm zur weiteren Verarbeitung erlaubte (Microsoft Excel).

2. Material und Methoden

2.4.2 Aufbau der Skinned-Fibers-Experimente

Das Organbad, in dem die Skinned-Fibers-Versuche vorgenommen wurden, glich dem für die Muskelstreifenexperimente. Auch hier bestand das Organbad aus einer in Kunststoff gefrästen Nut. Auf der einen Seite diente ein aus dünnem Draht gebogener Haken, der an einer Mikrometerschraube fixiert war, als Aufhängung. Auf der gegenüberliegenden Seite war ein aus dünnem Draht gefertigter Haken direkt mit dem Kraftaufnehmer verbunden.

Im Gegensatz zu den Experimenten mit frischen Muskelstreifen wurden die Skinned-Fibers-Versuche bei Raumtemperatur (22°C) durchgeführt, das Organbad wurde nicht beheizt. Der Mediumaustausch wurde mit Pipetten vorgenommen. Zur Aufhängung des entmembranisierten Muskelstreifens dienten T-förmig zurechtgeschnittene Aluminiumplättchen.

2.5 Muskelstreifenexperimente - Versuchsdurchführung

2.5.1 Intakte multizelluläre Herzmuskelstreifen

2.5.1.1 Probengewinnung

Die Tötung der Tiere zur Entnahme von Geweben für wissenschaftliche Zwecke wurde gemäß § 4 Abs. 3 TierSchG unter Aktenzeichen T 8.02 der Bezirksregierung in Braunschweig angezeigt.

Die Mäuse wurden zur Narkotisierung in eine mit Isofluran gefüllte Kammer gelegt und bis zum Atemstillstand dort belassen. Anschließend wurde durch Genickbruch der Tod herbeigeführt. Dabei wurde stets darauf geachtet, durch extreme Dorsalextension der Halswirbelsäule das Rückenmark sofort zu durchtrennen.

Nun wurden die Mäuse gewogen.

Nach dem Eröffnen der Bauchdecke erfolgte die Durchtrennung des Zwerchfells. Durch zwei seitliche thorakale Schnitte wurde zusätzlich ausreichend Platz für die Herzentnahme geschaffen. Um das Zwerchfell für die weiteren Untersuchungen zu schützen, wurde direkt nach der Eröffnung 4°C kalte BDM-Lösung in den Brustkorb infundiert.

2. Material und Methoden

Nach Eröffnung des Herzbeutels wurden, um eine Blutgerinnung zu vermeiden, 250 I.E. Heparin in die linke Herzkammer (=Ventrikel) injiziert. Anschließend wurde das Herz auf Höhe der abgehenden Gefäße abgesetzt. Die direkt darauf folgende retrograde, luftfreie Injektion von Dissektionslösung in die Aorta sorgte für die erwünschte Kardioplegie und das Freispülen der Koronarien.

Nach der Bestimmung des Herzgewichts wurde die Präparation vorgenommen. Zusätzlich wurden das Gewicht von Leber und Lunge sowie die Schienbeinlänge bestimmt.

2.5.1.2 Präparation der intakten multizellulären Herzmuskelstreifen

In einer mit Dissektionslösung gefüllten Schale wurde das Herz mit einer Nadel fixiert. Durch ein Binocular wurde die optische Vergrößerung des Präparats ermöglicht.

Von der Herzentnahme bis zum Einspannen des Muskelstreifens wurde mit größter Sorgfalt darauf geachtet, die Trabekel weder zu dehnen noch durch Berührung im Mittelteil zu verletzen.

Zunächst wurde die Herzspitze für die histologischen Untersuchungen abgetrennt, wobei darauf geachtet wurde, sowohl Teile des rechten als auch des linken Ventrikels zu erfassen.

Anschließend wurde der rechte Ventrikel entlang des Septums mit feiner Pinzette und Schere eröffnet. Um eine bessere Übersicht über die Architektur der Trabekel zu erlangen, wurde zusätzlich über das rechte Herzohr der Vorhof eröffnet. Die für die Experimente vorgesehenen Trabekel wurden zunächst großflächig aus der Wand herauspräpariert, um möglichst schnell Herzpräparate für die Protein-Expressions-Untersuchungen zu konservieren. Dazu wurden möglichst große Anteile des rechten und linken Ventrikels jeweils in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und weiter bei -84°C gelagert (siehe auch 2.7.5).

Für die Experimente mit intakten Muskelstreifen wurden ausschließlich Trabekel und Papillarmuskeln aus dem rechten Ventrikel verwendet. Nach Möglichkeit wurden unverwachsene Trabekel und Papillarmuskeln verwendet, um die Gefahr einer Arrhythmie durch Präparationsverletzung des Streifens zu minimieren. Auch wurde bei der Auswahl der Präparate auf eine gleichmäßig rosige Farbe entsprechend eines hohen Myoglobin- und Myofibrillengehalts geachtet, da dies eine hohe Kontraktilität des Muskels versprach. Die gewonnenen Präparate hatten eine Länge von 400-1200 μm und eine Breite und Tiefe von 150-400 μm .

2. Material und Methoden

Die Muskelstreifen wurden an einem Ende mit rechteckigem Muskelblock präpariert, der als Aufhängung in der Drahtöse diente. Auf der gegenüberliegenden Seite wurde im Falle von Trabekeln idealerweise ein kleiner Teil der Ventrikelwand in Hantelform belassen, der als Befestigung am Haken diente. Im Falle von Papillarmuskeln diente ein Teil der Trikuspidalklappe als Befestigungspunkt am Haken.

Die Muskelstreifen wurden noch in der Präparierschale mit Hilfe der in das Binocular integrierten Skala in drei Dimensionen vermessen. Anschließend wurden aus dem linken Ventrikel Papillarmuskeln für die Skinned-Fibers-Experimente entnommen.

2.5.1.3 Einspannen

Die präparierten Muskelstreifen wurden mit Hilfe einer Pasteur-Pipette in einigen Millilitern Dissektionslösung in das Organbad überführt. Hier wurde das dünnere, hantelförmige Ende bzw. der Segelklappenanteil durch die Drahtöse geführt, um anschließend dieses Ende an dem Haken zu befestigen. Der Muskelstreifen wurde zunächst schlaff aufgehängt.

Nach Starten der Datenaufzeichnung erfolgte zunächst die Eingabe der Dimensionen Länge, Breite und Tiefe des Muskelstreifens. Anhand dieser Parameter war es dem Programm möglich, die entwickelte Kraft des Muskelstreifens auf seinen Querschnitt zu normalisieren. Dadurch war eine bessere Vergleichbarkeit der entwickelten Kräfte zwischen den einzelnen Experimenten möglich.

Um die im Organbad befindlichen BDM-Reste zu eliminieren, wurden 50 ml Lösung ausgespült und verworfen.

2.5.1.4 Versuchsablauf

Nach dem Spülen mit 50 ml Lösung verblieben noch 100 ml Lösung im Kreislauf. Bereits während des Spülens startete die Stimulation mit biphasischen Rechteck-Spannungsimpulsen mit einer Amplitude von 5 V und 5 ms Dauer.

Der Muskelstreifen wurde zunächst bei 2 Hz und einer Kalziumkonzentration von 0,25 mM für 30 Minuten stimuliert. Diese Einschlagphase ermöglichte dem Muskelstreifen die Adaptation an die neue Umgebung. Dann erst wurde, um eine Irritation des Muskelstreifens durch zu schnelle Erhöhung des Kalziums zu verhindern, die

2. Material und Methoden

Kalziumkonzentration alle drei Minuten um 0,25 mM bis zu einer Endkonzentration von 1,25 mM (entspricht der Konzentration des physiologisch freien Kalziums im Plasma) erhöht. Es folgte eine weitere Einschlagphase von 21 Minuten.

Nach dieser insgesamt 60 Minuten dauernden Äquilibrationsphase wurde der Streifen nochmals komplett entdehnt und an der Kraftmessbrücke die Nulllinie eingestellt. Anschließend wurde der Muskelstreifen auf diejenige Länge gedehnt, bei der die entwickelte Kraft der Einzelzuckungen maximal war (Gipfel der Frank-Starling-Beziehung).

Das anschließende Messprotokoll bestand aus folgenden Teilen:

- einer Bestimmung der Kraftantwort auf unterschiedliche Stimulationsfrequenzen, der so genannten Kraft-Frequenz-Beziehung (FFR für Force-Frequency-Relationship)
- der Bestimmung des Post-Pausen-Verhaltens (PPP für Post-Pausen-Potenzierung)
- der Bestimmung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit dem β -adrenergen Agonisten Isoprenalin (Iso-KWK).

Zur Bestimmung der Kraft-Frequenz-Beziehung wurde die Stimulationsfrequenz ausgehend von einer Grundstimulation von 4 Hz auf 6 und 8 Hz gesteigert und in denselben Schritten vermindert. Zum Messen der entwickelten Kraft wurde jeweils der stabile Zustand (steady state) der Zuckung abgewartet.

Daran anschließend folgte die Bestimmung des Post-Pausen-Verhaltens, wobei ausgehend von einer Grundstimulation von 6 Hz Pausendauern von 1, 2 und 4 sec untersucht wurden.

Schließlich wurde, ebenfalls bei einer Grundstimulation von 6 Hz, eine kumulative Konzentrations-Wirkungs-Beziehung in halblogarithmischen Intervallen mit dem β -adrenergen Agonisten Isoprenalin erhoben, wobei die maximale Konzentration 10^{-6} M betrug.

In die Analyse einbezogen wurden nur Streifen, die das gesamte Versuchsprotokoll ohne funktionelle oder morphologische Anzeichen für eine Schädigung überstanden.

2.5.2 Skelettmuskelstreifen aus dem Zwerchfell

2.5.2.1 Probengewinnung

Direkt nach der Herzentnahme erfolgte die Präparation des Zwerchfells. Zunächst wurden Lunge und Leber entnommen, um möglichst viel Platz für die Präparation zu schaffen. Anschließend wurde das Zwerchfell im Bereich der zentralen Sehnenplatte durch einen Schnitt getrennt. Nun konnte man durch beidseitige Durchtrennung der Rippen nahe der Wirbelsäule das in zwei Hälften aufgeteilte Zwerchfell samt Rippen entnehmen. Bis zur weiteren Präparation wurde es bei 4°C in Dissektionslösung gelagert.

2.5.2.2 Präparation

Nach der Präparation der intakten multizellulären Herzmuskelstreifen, die bei den Experimenten oberste Priorität hatten, erfolgte die Präparation der Skelettmuskelstreifen ebenfalls in der mit Dissektionslösung gefüllten Schale unter dem Binocular.

Vom Centrum tendineum ausgehend wurde parallel zum Muskelfaserverlauf ein noch an der Rippe verankerter, etwa 1 bis 1,5 mm breiter Streifen präpariert. Anschließend wurde diese Rippe separiert und umliegendes Weichteilgewebe vorsichtig entfernt. Zuletzt wurde der Streifen auf eine Breite von 800 bis 1200 µm verjüngt und die Rippe an der Ansatzstelle auf 2 bis 3 mm Länge verkürzt.

Dieses Rippenstück diente als Widerlager an der Öse, während die Reste des Centrum tendineums als Aufhängung auf den Haken im Organbad dienten.

2. Material und Methoden

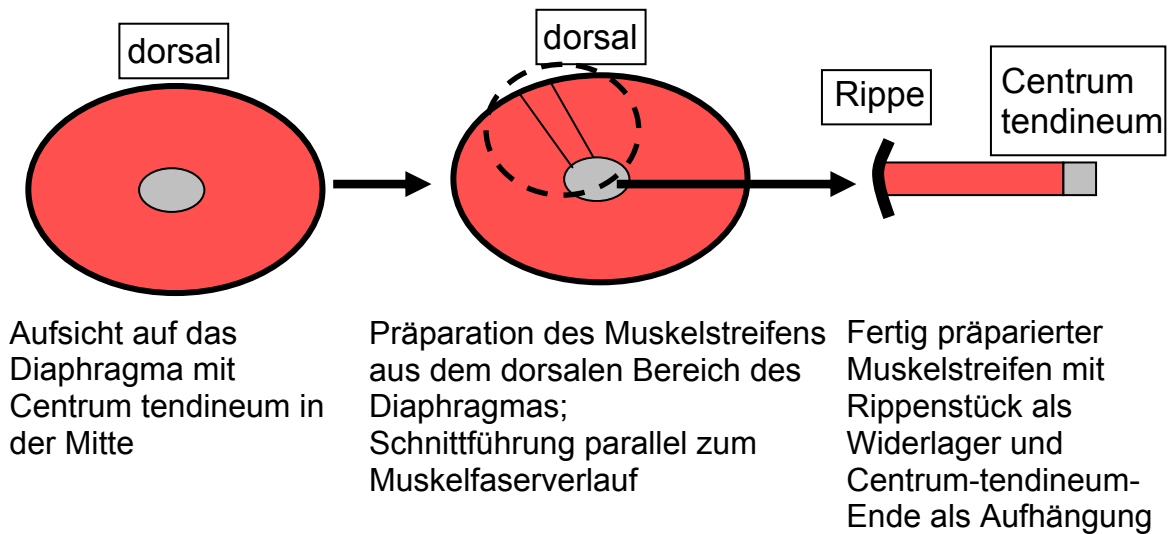


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Muskelstreifenpräparation aus dem Diaphragma

2.5.2.3 Einhängen

Die präparierten Muskelstreifen wurden mit Hilfe einer Pasteur-Pipette in einigen Millilitern Dissektionslösung in das Organbad überführt. Hier wurde das dünnere Ende durch die Drahtöse geführt, um anschließend die Sehnenanteile des Centrum tendineums an dem Haken zu befestigen. Das Rippenstück bildete in der Öse das Widerlager. Der Muskelstreifen wurde zunächst schlaff aufgehängt.

Ähnlich der Experimente mit frischen multizellulären Herzmuskelstreifen erfolgte nach Starten des LabView Programms zunächst die Eingabe der Dimensionen Länge, Breite und Tiefe des Muskelstreifens, um die entwickelte Kraft des Muskelstreifens auf seinen Querschnitt zu normalisieren. Dadurch war eine bessere Vergleichbarkeit der entwickelten Kräfte zwischen den einzelnen Experimenten möglich.

Um die im Organbad befindlichen BDM-Reste zu eliminieren, wurden 50 ml Lösung ausgespült und verworfen.

2. Material und Methoden

2.5.2.4 Versuchsablauf

Nach dem Spülen mit 50 ml Lösung verblieben noch 100 ml Lösung im Kreislauf. Bereits während des Spülens startete die Stimulation mit biphasischen Rechteck-Spannungsimpulsen mit einer Amplitude von 5 V und 5 ms Dauer. Im Gegensatz zu den Herzmuskelstreifenpräparaten wurden die Skelettmuskelstreifen mit einer Frequenz von 1 Hz stimuliert.

Nach einer Einschlagphase von 15 Minuten Dauer bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 0,25 mM, in der der Streifen sich an das Milieu adaptieren konnte, erfolgte die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration auf 1,25 mM in einem Schritt. Nach einer weiteren Einschlagphase von 5 Minuten wurde die Nulllinie an der Kraftmessbrücke eingestellt.

Anschließend wurde der Skelettmuskelstreifen auf eine passive Spannung in Ruhe von 1 mN/ mm² gedehnt.

Das nun folgende Protokoll umfasste eine Tetanisierungsreihe und eine Bestimmung der Ermüdungsresistenz.

Zur Durchführung der Tetanisierungsreihe wurde der Skelettmuskelstreifen in Abständen von einer Minute für jeweils drei Sekunden stimuliert. Die Stimulationsfrequenz wurde dabei in Schritten von 10 Hz von anfänglichen 10 Hz auf 100 Hz erhöht. Weitere Stimulationen erfolgten mit 120 Hz und 150 Hz. Ausgewertet wurde sowohl die maximal entwickelte Kraft als auch die zur Tetanisierung nötige Frequenz.

Es folgte eine mehrminütige Erholung des Muskelstreifens nach der Tetanisierungsreihe. Nach Erreichen des stabilen Zustandes und der Nachdehnung des während der Tetanisierungsreihe üblicher Weise etwas entdehten Streifens auf 1 mN/ mm² folgte die Bestimmung der Ermüdungsresistenz.

Die Stimulationsfrequenz betrug nun durchgehend 100 Hz bei einer Stimulationsdauer von 250 msec und einer Stimulationspause von 750 msec. Dieser Stimulationsmodus wurde über 100 sec durchgeführt und der dabei erfolgende, ermüdungsbedingte Abfall der aktiven Kraft sowie der passive Kraftanstieg des Skelettmuskelstreifens bestimmt.

2.5.3 Skinned-Fibers-Experimente

2.5.3.1 Probengewinnung

Die Probengewinnung der Muskelstreifen erfolgte ebenfalls aus den frisch entnommenen Mäuseherzen. Im Gegensatz zu den Experimenten mit frischen Muskelstreifen wurden die verwendeten Papillarmuskeln jedoch ausschließlich aus dem linken Ventrikel gewonnen.

Hierzu wurde der linke Ventrikel entlang des Septums eröffnet. Die entnommenen Papillarmuskeln wurden sofort in 1% Triton-Relaxationslösung überführt und anschließend für 24 Stunden bei 4°C und ständiger Bewegung inkubiert.

Triton X-100 zerstört als nichtionisches Detergens die Lipiddoppelschicht der Kardiomyozyten, sodass Zytoplasma und Zellorganellen austreten (siehe auch Abschnitt 2.1.2.1). Erhalten bleibt lediglich das Zytoskelett, das den Myofilamentapparat mit seinen assoziierten Proteinen enthält.

Durch Auflösung der Zellmembranen können die in der Umgebungslösung enthaltenen Ionen frei zu den Myofilamenten diffundieren; die Ionenkonzentration der Umgebungslösung entspricht also der Ionenkonzentration an den Myofilamenten.

2.5.3.2 Präparation

Auf eine Präparierplatte aus geschwärztem Glas wurde ein Silikonring aufgebracht. Den fertig inkubierten permeabilisierten Muskelstreifen injizierte man mit etwas Inkubationslösung in diesen Ring. Auch hier fand die Präparation unter dem Binocular und mit Hilfe von Federschere und Mikropinzetten statt.

Aus dem entmembranisierten Papillarmuskel wurde durch Auftrennung in Faserverlaufsrichtung ein im Durchmesser 200-350 µm dickes Faserbündel präpariert.

Nach der Vermessung von Breite und Tiefe wurde das Präparat mit den Enden in T-förmige Aluminiumclips eingeklemmt. Diese Vorgehensweise ist nötig, da der „Skinned Fiber“ fast ausschließlich aus Myofilamenten besteht und sich daher nicht wie ein intaktes Streifenpräparat auf Haken aufhängen lässt.

Die Aluminium-T-Clips hatten eine Größe von ca. 1,5 x 1,5 mm und enthielten im Längsbalken ein Loch, welches der Aufhängung auf den Haken diente.

2. Material und Methoden

Zunächst wurden die beiden Enden des Querbalkens in einem Winkel von 90° nach oben gebogen. In die dadurch entstehende Rinne wurde nun ein Ende des präparierten Muskelstreifens eingelegt und schließlich durch das Übereinanderlegen der Querbalkenenden im Clip fixiert. Mit der anderen Seite des Präparates wurde ebenso verfahren. Hierbei war zu beachten, dass die Filamente unverdreht und im geraden Verlauf eingeklemmt wurden.

2.5.3.3 Einhängen

Das in den T-Streifen fixierte Präparat wurde nun in das mit Relaxationslösung gefüllte Organbad überführt. Hier wurden die Aluminiumaufhängungen an den Haken zu beiden Seiten des Organbads aufgehängt. Straff, aber nicht gedehnt erfolgte eine kurze Adaption des Streifens an die Lösungskonditionen.

2.5.3.4 Versuchsablauf

Nach dem Starten des Programms LabView erfolgte die Eingabe der Dimensionen, um die entwickelte Kraft auf die Querschnittsfläche zu normalisieren. Anschließend erfolgte die Einstellung der Nulllinie.

Das Experiment begann mit zwei Vollaktivierungen, um den Zustand des Präparats abschätzen zu können. Daran anschließend erfolgte eine Ca^{2+} -Aktivierung, bei der in 10 Schritten Lösungen steigender Ca^{2+} -Konzentration (siehe Tab. 2.3.) die Kontraktilität des „Skinned Fibers“ evaluiert wurde. Nach jedem Lösungswechsel wurde der Steady State abgewartet.

Es folgte eine Relaxationsphase, in der der Streifen komplett entspannt wurde. Gleichzeitig wurde die Länge des Streifens bestimmt.

Der zweite Teil des Experimentes war eine Dehnungsreihe, bei der das Präparat jede Minute um 5% seiner Gesamtlänge gedehnt wurde. Endpunkt war nach zehn Schritten die Dehnung um 50% der Gesamtlänge.

Anschließend folgte in denselben Schritten die Entdehnung des Streifens zurück zum Nullpunkt.

2.6 Histologie

2.6.1 Gewebegewinnung

Direkt nach der Herzentnahme wurde die Herzspitze, die sowohl Teile des linken als auch des rechten Ventrikel umfasste, in Tissue Tek (Sakura) eingebettet und, nach Entfernung aller Luftblasen, in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die weitere Aufbewahrung erfolgte bei -84°C.

2.6.2 Herstellung der Gewebeschnitte

Später wurden am Mikrotom (Jung Frigocut 2800 N) bei -25°C Schnitte von 5 µm Dicke hergestellt und auf Objektträgern eine Stunde lang in Raumluft getrocknet.

2.6.2.1 Picrosiriusrot-Färbung

Die Färbung mit Picrosiriusrot wurde zur Bestimmung des Fibroseanteils der Herzen durchgeführt. Während Herzmuskelzellen in der Picrosiriusfärbung rot erscheinen, sind bindegewebige Anteile grünlich gefärbt.

Für die Färbung mit Picrosiriusrot wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für zehn Minuten in gepuffertem Formalin (Sigma Aldrich, Accustain Formalin Solution 10% neutral buffered) fixiert. Nach Spülen mit einfach destilliertem Wasser wurden die Schnitte dann für 30 Minuten mit Picrosiriusrot (Sigma, Direct Red 80), 0,1 g angesetzt in 100 ml gesättigter Picrinsäure (Fluka, Pure Picric Acid), bedeckt. Nach erneutem Spülen mit einfach destilliertem Wasser wurden die Schnitte für zwei Minuten in 0,01 N Salzsäure belassen.

Die darauf folgende Entwässerung wurde mit einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentration durchgeführt: jeweils zwei Minuten in 96% Ethanol und 100% Ethanol, schließlich vier Minuten in Xylol (J.T. Becker).

Abschließend erfolgte die Eindeckung der Schnitte mit Aquatex.

2. Material und Methoden

2.6.2.2 Weizenkeim-Agglutinin-Färbung

Weizenkeim-Agglutinin bindet selektiv an N-Acetylglucosamin und N-Acetylneuramin-Essigsäure, zwei zellmembranspezifische Kohlenhydratderivate (Wright 1984). Durch Konjugation mit einem fluoreszierenden Farbstoff können so die Zellmembranen spezifisch gefärbt und der Zelldurchmesser bestimmt werden.

Für die Färbung mit Weizenkeim-Agglutinin (Molecular Probes, Alexa Fluor 488) wurden die Schnitte in auf -20°C gekühltem Methanol (99,9%; Merck) für zehn Minuten fixiert.

Zur Blockade der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte in einem 1:100-Gemisch aus H₂O₂ und Methanol (99,9%) für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Spülen mit 1x PBS-Puffer (pH 7,4) wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation in 5% Rinderserum (=BSA) blockiert. Für die anschließende Färbung wurden die Schnitte in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht mit Weizenkeim-Agglutinin in einer PBS Verdünnung von 1: 500 bedeckt. Nach erneutem Spülen mit PBS erfolgte die Eindeckung der Schnitte mit Vecta Shield.

2.6.3 Auswertung der histologischen Präparate

Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgte am Durchlichtmikroskop (Olympus BX 51) mit Hilfe des Bildanalyse-Programmes Image Pro (Media Cybernetics).

Im Falle der mit Weizenkeim-Agglutinin gefärbten Schnitte wurde eine Quecksilberlichtquelle (Olympus U-RFL-T) und ein Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-Filter (490 nm Exzitation; 520 nm Emission) zur Auswertung benutzt.

Die mit Picosiriusrot gefärbten Schnitte wurden zur Bestimmung des Fibroseanteils des Herzgewebes verwendet. Die Auswertung der Picosiriusrot-gefärbten Schnitte erfolgte verblindet, indem die Schnitte mit Nummerncodes versehen waren, deren Zuordnung zur jeweiligen Maus erst nach Abschluss der Untersuchung offen gelegt wurde.

Hierbei wurden zehn zufällige Gesichtsfelder pro Versuchstier bei einer 20-fachen Vergrößerung eingestellt, und diese mit Hilfe der Farbspektrumsanalyse des Programmes hinsichtlich des Fibroseanteils ausgewertet. Die Fibroseanteile der Gesichtsfelder wurden in der jeweiligen Genotypengruppe gemittelt.

Die mit Weizenkeim-Agglutinin gefärbten Schnitte wurden zur Bestimmung des Myozytenquerschnittes verwendet. Auch hier waren die Schnitte mit Nummerncodes

2. Material und Methoden

versehen, deren Zuordnung zur jeweiligen Maus erst nach Abschluss der Untersuchung offen gelegt wurde.

Es wurden zwei Gesichtsfelder pro Versuchstier bei einer 40-fachen Vergrößerung eingestellt, auf denen die Myozyten quer geschnitten waren. In diesen Gesichtsfeldern wurden mit Hilfe des Bildanalyseprogramms insgesamt 30 Myozyten manuell markiert und vermessen.

Auch hier wurden die Myozytendurchmesser in der jeweiligen Genotypengruppe gemittelt. Zwischen den Gruppen war der Anteil der Geschlechter gleich verteilt, um eventuelle geschlechtsspezifische Einflüsse auf Unterschiede hinsichtlich des Fibroseanteils und des Myozytenquerschnittes zu minimieren.

2.7 Proteindiagnostik am Herzgewebe

2.7.1 Lösungen für Protein-Analysen

2.7.1.1 TBE-Puffer

Der TBE-Puffer war die Grundlage für die Herstellung der Agarose-Gele. Alle Zutaten wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

Bezeichnung	Menge auf 1 Liter Aqua bidest
Tris Base pH 8,0	54 g
Borsäure	27,5 g
EDTA	3,72 g

Tab. 2.5: Zusammensetzung für 5x TBE-Puffer

2.7.2 Lösungen zur Proteinaufbereitung

2.7.2.1 HEPES-Stammlösung

Die HEPES (N-Hydroxyethyl-piperazin-N-ethansulfonsäure)-Stammlösung stellte die Grundlage für die zur Proteindiagnostik benutzten Lösungen dar.

Bezeichnung	Summenformel	Molekulargewicht in g/mol	Konzentration
HEPES	$C_8H_{18}N_2O_4S$	238,31	50 mM
Kaliumchlorid	KCl	74,55	50 mM
Benzamidin	$C_7H_8N_2$	156,62	1 mM

Tab. 2.6: Zusammensetzung der HEPES-Stammlösung

2.7.2.2 CLAP-Stammlösung

Unter dem Akronym CLAP wurden die vier Proteinaseinhibitoren Chymostatin, Leupeptin, Antipain und Pepstatin zusammengefasst. Zur Herstellung der Stammlösung wurde je 1 mg der Proteinaseinhibitoren in 1ml Aqua bidest aufgelöst.

Die CLAP-Proteinaseinhibitoren wurden von der Firma Peptide Institute Inc. bezogen.

2.7.2.3 Homogenisierungspuffer

Der Homogenisierungspuffer bestand neben der HEPES-Stammlösung aus dem Chelatbildner Ethylenglykol-Tetra-Essigsäure (EGTA), dem Redoxreagenz Dithiothreitol (DTT) sowie den Proteinaseinhibitoren Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Chymostatin, Leupeptin, Antipain und Pepstatin.

HEPES, EGTA, DTT und PMSF wurden von der Firma Sigma bezogen.

2. Material und Methoden

Bezeichnung	Summenformel	Molekulargewicht in g/mol	Konzentration
HEPES-Stammlösung	s.o.	s.o.	s.o.
Ethylenglykol-Tetra- Essigsäure (EGTA)	$C_{14}H_{24}N_2O_{10}$	380,35	10 mM
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	$C_7H_7FO_2S$	174,19	100 mM
Dithiothreitol (DTT)	$C_4H_{10}O_2S_2$	154,25	100 mM
CLAP- Stammlösung	s.o.	s.o.	s.o.

Tab. 2.7: Zusammensetzung des Homogenisierungspuffers

2.7.2.4 Lämmli-Puffer

Bei der Vorbereitung der Proteinproben für die Gelelektrophorese wurden diese mit Lämmli-Puffer versetzt. Das enthaltene Bromphenolblau zeigte den Fortlauf der Elektrophorese an, währende Glycerin als weiterer Bestandteil durch seine hohe Dichte für einen einfachen Auftrag auf das Gel sorgte.

Bezeichnung	Menge pro 100 ml
1M Tris HCl pH 6,8	3,785 g
10% SDS	10 g
Dithiothreitol (DTT)	2,313 g
Bromphenolblau 0,09%	2,5 g
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0,5 M	1 ml
Glycerol 50%	50 ml

Tab. 2.8: Zusammensetzung des Lämmli-Puffers

2.7.3 Lösungen für die Natriumdodecylsulfat (SDS)- Gelelektrophorese

Mit der Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren und Proteine aufgetrennt werden. Dabei wandern die Moleküle in einem elektrischen Feld durch eine Gelmatrix, die aus einem Gemisch von Acrylamid und Bisacrylamid gebildet wird.

Acrylamid bildet in Anwesenheit freier Radikale in einer Kettenreaktion lange Polymere, die von Bisacrylamid vernetzt werden. Als Katalysator für die Polymerisation wird N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) eingesetzt. Als Radikalbildner wird Ammoniumperoxodisulfat (APS) eingesetzt.

Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich an die Proteine an und denaturiert diese. Durch die Sulfatgruppen erhalten die resultierenden Komplexe eine gleichmäßig verteilte negative Ladung. Somit ist die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel weitestgehend unabhängig von der Netto-Ladung im Nativzustand des Proteins und hängt nur noch von der relativen Molekülmasse ab.

Um eine schärfere Bandentrennung zu erreichen, wird über das Trenngel ein Sammelgel gegossen. Die Matrix dieses Sammelgels besitzt größere Poren und einen anderen pH-Wert. Dadurch laufen die Proteine in dieser Matrix schneller und erreichen ohne Auftrennung das Trenngel.

Bezeichnung	Menge in g/l
Tris Base pH 8,8 (Roth)	182
Natriumdodecylsulfat (SDS)	4

Tab. 2.9: Zusammensetzung der Lösung A für das Trenngel

Bezeichnung	Menge in g/l
Tris Base pH 6,8 (Roth)	60,5
Natriumdodecylsulfat (SDS)	4

Tab. 2.10: Zusammensetzung der Lösung B für das Sammelgel

Bezeichnung	Menge in g/l
Acrylamid (AA)	300
Bis-Acrylamid (Bis-AA)	8

Tab. 2.11: Zusammensetzung der Lösung C sowohl für Trenn- als auch Sammelgel

2. Material und Methoden

Für die Gelelektrophorese wurde das zwischen den Glasplatten befindliche Gel in einen Laufpuffer eingebettet, der durch die fünffache Verdünnung der Stammlösung mit Aqua bidest hergestellt wurde. Dieser hat die Aufgabe, den pH in der Laufkammer konstant zu halten. Zusätzlich werden durch den SDS-Gehalt des Puffers Proteine weiter mit SDS abgesättigt.

Bezeichnung	Menge in g/l
Tris Base pH 8,3	15,1
Glycin	72
Natriumdodecylsulfat (SDS)	10

Tab. 2.12: Zusammensetzung der 5x Stammlösung des Laufpuffers für SDS-Gele

2.7.4 Lösungen für Coomassie-Färbungen

Zur Anfärbung der Proteine im SDS-Gel wurde eine Färbung mit Coomassie-Blau verwendet. Dieser Farbstoff koppelt sich an spezifische Aminosäuren der Proteine und erlaubt somit nach Entfärbung des Gels die Visualisierung der Proteine als Proteinbanden.

Bezeichnung	Menge in ml
Coomassie Brilliant Blue R 250 0,1% (Firma BIORAD)	5
Aqua bidest	5
Methanol 50% (Firma Roth)	10
Essigsäure 96% (Firma Roth)	2

Tab. 2.13: Zusammensetzung der Coomassie Färbelösung

Zur Entfärbung des Hintergrundes wurden die Gele im Anschluss zunächst in die Entfärberlösung 1 gelegt.

Bezeichnung	Menge in ml
Methanol 96% (Firma Roth)	50
Essigsäure 96% (Firma Roth)	10
Aqua bidest	40

Tab. 2.14: Zusammensetzung der Entfärberlösung 1

2. Material und Methoden

Nach ausreichender Entfärbung des Hintergrundes wurden die Gele in die Entfärberlösung 2 gelegt. In dieser Lösung konnten die Gele auch mehrere Tage aufbewahrt werden.

Bezeichnung	Menge in ml
Methanol 96% (Roth)	10
Essigsäure 96% (Roth)	5
Aqua bidest	85

Tab. 2.15: Zusammensetzung der Entfärberlösung 2

2.7.5 Gewebegewinnung

Direkt nach Eröffnung des Herzens und großflächiger Entnahme der Trabekel wurden sowohl aus dem linken wie auch dem rechten Ventrikel Proben für die Protein-Expressionsanalyse in autoklavierte Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Gewebeproben wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschliessend bei -84°C bis zur Aufbereitung verwahrt.

2.7.6 Aufbereitung des Herzgewebes

Die zu analysierenden Proben wurden in flüssigem Stickstoff zum Arbeitsplatz überführt. Dort wurde das Gewebe in Alufolie, die zuvor in flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, eingeschlagen und mit dem Hammer zerkleinert. Ein ausreichend großes Gewebestück wurde in das bereitstehende, mit 100 μl Homogenisierungspuffer (siehe 2.7.2.3, S. 41) gefüllte Eppendorfgefäß (2 ml) gegeben. Das restliche Gewebe wurde sofort wieder für weitere Untersuchungen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Mit Hilfe des Homogenisators (Standbohrmaschine der Firma Bosch mit speziellem Bohrsatz) wurde das Gewebe nun zerkleinert, bis keine Gewebestücke mehr zu erkennen waren. Um einer wärmebedingten Denaturierung der Proteine vorzubeugen, wurde das Eppendorfgefäß zwischenzeitlich mehrfach in flüssigem Stickstoff gekühlt.

Nach der Homogenisierung wurden die Proben kurz abzentrifugiert und der Überstand in neue Eppendorfgefäße auf Eis überführt.

2. Material und Methoden

Nun folgte die Proteingehaltsbestimmung mit Hilfe der BCA-Reaktion (BCA Protein Assay Kit; Firma Pierce). Protein bildet zunächst mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischem Milieu einen Komplex (Biuret-Reaktion). Die Cu^{2+} -Ionen werden zu Cu^+ -Ionen reduziert und bilden in dieser Form mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex. Die Entwicklung des Farbkomplexes ist in einem grossen Messbereich der Konzentration des enthaltenen Proteins proportional (Smith et al. 1985).

Dazu wurden 1,25 μl der homogenisierten Proben zunächst mit HEPES-Stammlösung auf ein Verhältnis von 1:20 verdünnt. Anschließend wurden 500 μl des BCA-Gemischs, das nach Anleitung hergestellt wurde, zur verdünnten Probe gegeben.

Nach einer Inkubation bei 37°C über 30 Minuten wurde die optische Dichte jeder Probe bei 562 nm Wellenlänge am kalibrierten Photometer (Eppendorf, Biophotometer) bestimmt.

Um Pipettierfehler zu erkennen und eine größere Messgenauigkeit zu erreichen, wurde jede Probe doppelt angesetzt, bei Abweichungen von mehr als 10% des Proteingehalts wurde die Probe verworfen.

Durch die Bestimmung des Proteingehalts der Probe konnten die Homogenisate nach folgender Formel auf eine Proteinkonzentration von 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt werden: (V hier für Volumen, C für Konzentration)

$$V_{\text{probe}}(\mu\text{l}) = \frac{C_{\text{soll}}(2\mu\text{g} / \mu\text{l}) \times V_{\text{soll}}(100\mu\text{l})}{C_{\text{ist}}} = L_{\text{ysat}}(\mu\text{l})$$

Dabei wurde in jede Probe 20 μl des fünffach konzentrierten Lämmli-Puffers gegeben, weiterhin fehlendes Volumen wurde durch HEPES- Stammlösung aufgefüllt.

2.7.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.7.7.1 Herstellung des Gels

In diesem Fall wurden für die Gelelektrophorese 5%ige SDS-Gele verwendet, deren Zusammensetzung folgendermaßen war:

Bezeichnung	Menge
Lösung B (Sammelgel) bzw. A (Trenngel)	2,5 ml
Lösung C	1,66 ml
Aqua bidest	5,63 ml
10% Natriumdodecylsulfat (SDS)	100µl
10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)	100µl
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	10µl

Tab. 2.16: Pipettierschema für 5% SDS-Gel, Gesamtvolumen 10 ml

Die Zusammensetzung von Lösung A, B und C ist in den Tab. 2.9 bis 2.11, S. 43, dargestellt.

Die Zutaten für das Trenngel wurden in einem Kolben gemischt und nach Zugabe von APS und TEMED vorsichtig geschüttelt.

Die Gelkammern, bestehend aus zwei Glasplatten, wurden zuvor mit Wasser und Ethanol mehrfach gereinigt und nach Trocknen in die vorgesehenen Aufhängungen eingespannt. Eine der beiden Glasplatten trug seitliche Spacer von 1,5 mm Höhe, die die Geldicke bestimmten.

Das Trenngel wurde nun bis etwa 1,5 cm unterhalb des später einzusetzenden Kammes zwischen die Glasplatten gegossen. Gegen die Entstehung und den Einschluss von Luftblasen wurde das Gel mit 200 µl Isopropylalkohol (IPA) überschichtet.

Nach Aushärten des Trenngels wurde der IPA mit doppelt destilliertem Wasser mehrfach ausgewaschen und die verbleibende Flüssigkeit mit Filterpapier entfernt.

Mit den in der Zwischenzeit in einem weiteren Kolben gemischten Zutaten für das Sammelgel wurde nun der verbleibende Raum zwischen den Glasplatten aufgefüllt. Direkt im Anschluss wurden die Kämme in das Sammelgel gesteckt.

2. Material und Methoden

Alle Apparate, die zur SDS-Gelelektrophorese verwendet wurden, wurden von der Firma BIORAD hergestellt.

2.7.7.2 Auftragen der Proteinproben

Das Gel wurde nach dem Aushärten in die Elektrophoresekammer gespannt und mit Laufpuffer überschichtet.

Anschließend wurden die Käbme entfernt und die Taschen des Gels mit den homogenisierten Proteinproben des rechten Ventrikels befüllt.

Für den Nachweis von MyBPc wurden jeweils 20 µg, für den Nachweis von β-Myosin Heavy Chain (β-MHC) jeweils 7 µg aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurden Precision Plus Protein™ All Blue Standards 250 kDa der Firma BIORAD verwendet. Frei bleibende Geltaschen wurden mit Lämmli-Puffer befüllt.

Nun wurde die Elektrophorese mit 20 mA und 200 V über etwa sechs Stunden durchgeführt, bis die Lauffront etwa einen Zentimeter vom Ende des Gels entfernt war.

2.7.7.3 Coomassie-Färbung der Gele

Nach Beenden der Gelelektrophorese wurde das Gel vorsichtig aus den Glasplatten herausgelöst und für eine Stunde in die Coomassie Färbelösung (Zusammensetzung siehe S. 44) gegeben. Um eine gleichmäßige Färbung zu gewährleisten wurde das Gel während dieser Zeit auf dem Wiegetisch gelagert.

Anschließend folgte die Entfärbung des Hintergrundes mit der Entfärberlösung 1 (Zusammensetzung siehe S. 44) für etwa sechs Stunden. Nach ausreichender Entfärbung wurde das Gel in die Entfärberlösung 2 überführt, wo es für mehrere Tage aufbewahrt werden konnte.

2.7.7.4 Auswertung und Dokumentation

Das entfärbte Gel wurde fotografiert und mit Hilfe des Programms Chemilmager densitometrisch ausgewertet.

2.8 Mathematische Methoden

Um die Vergleichbarkeit von Muskelstreifen unterschiedlicher Dicke zu gewährleisten, wurden die Kraftdaten nach der jeweiligen Messung auf die Querschnittsfläche des entsprechenden Präparates normalisiert. Zunächst wurden Quer- und Tiefendurchmesser des Muskelstreifens im gedehnten Zustand vor Beginn des jeweiligen Versuchsprotokolls erhoben. Anschließend wurde unter Annahme einer Ellipsenform die Querschnittsfläche des Muskelstreifens nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Fläche A} = \frac{\pi \times d_1 \times d_2}{4}$$

Die Daten wurden mit dem Datenakquisitionsprogramm LabView der Firma National Instruments gesammelt und ausgewertet. Aus den Ca^{2+} -Aktivierungs-Daten der Skinned-Fibers-Experimente wurden zur quantitativen Beurteilung der Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente unter Verwendung des Programms Microcal Origin entsprechend der Hill-Gleichung sigmoidale Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Ca^{2+} gefittet.

$$\text{Hill-Gleichung: } F_x - F_{\min} = (F_{\max} - F_{\min}) \times [\text{Ca}_x]^n / [(\text{Ca}_{50})^n + [\text{Ca}_x]^n]$$

Dabei steht F_x für die aktuelle Kraft, F_{\min} für die minimale Kraft, F_{\max} für die maximal durch Calcium-Aktivierung entwickelte Kraft, Ca_x für die aktuelle Calciumkonzentration, Ca_{50} für die Ca^{2+} -Konzentration bei halbmaximaler Kraft (entspricht der EC_{50}); n ist der Hill-Koeffizient. Als Maß für die Ca^{2+} -Sensitivität wurde der negative dekadische Logarithmus der EC_{50} berechnet (pCa_{50}). Dieser entspricht der Ca^{2+} -Konzentration, bei der es zur halbmaximalen Aktivierung der Myofilamente kommt.

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte (SEM) dargestellt. Für die Auswertung der Experimente mit intakten Muskelstreifen wurde als statistischer Test eine zweifaktorielle Varianzanalyse (Two-Way-ANOVA) nach Genotypen durchgeführt.

Für alle anderen in dieser Arbeit dargestellten Daten wurde als statistischer Test ein Students-t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Echokardiographie – Charakterisierung der Mausgenotypen in vivo

Um Unterschiede zwischen den drei Mausgenotypen hinsichtlich der Herzfunktion in vivo zu untersuchen, wurde an allen Mäusen eine Echokardiographie vorgenommen.

Im Vergleich zu den als Kontrollgruppe eingesetzten DHET-Tieren (mit dem Genotyp MLP^{+/-} und MyBPc^{+/-}; n=10) zeigten die MLPHET-Tiere (mit dem Genotyp MLP^{+/-} und MyBPc^{-/-}; n=17) in der Echokardiographie deutliche Zeichen einer Erweiterung der Herzhöhlen und einer Herzwandverdickung:

Der linksventrikuläre end-diastolische Durchmesser (LVEDD) betrug in DHET-Mäusen $3,58 \pm 0,05$ mm und war in MLPHET-Mäusen signifikant auf im Mittel $4,12 \pm 0,11$ mm gesteigert ($p < 0,0004$; Abb. 3.1). Die Dicke der Hinterwand (PW für posterior wall) war in MLPHET-Tieren signifikant gesteigert: Während sie in DHET-Mäusen $0,84 \pm 0,03$ mm betrug, war die Hinterwand der MLPHET-Mäuse im Mittel $1,22 \pm 0,06$ mm dick, was einer Zunahme um 45% entspricht ($p < 0,0005$; Abb. 3.2). Auch die Septumdicke war mit $1,15 \pm 0,04$ mm (MLPHET) gegenüber $0,89 \pm 0,04$ mm (DHET) signifikant um 29% gesteigert ($P = 0,0001$; Abb. 3.3).

3. Ergebnisse

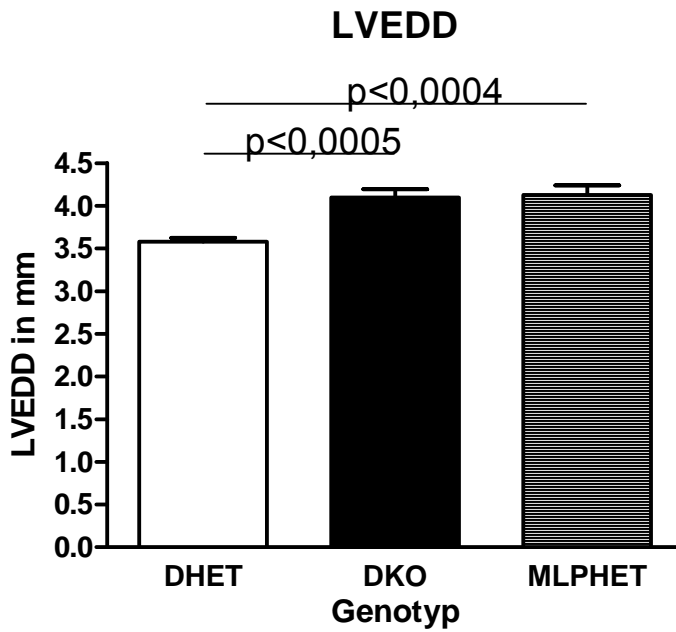


Abb. 3.1: Vergleich der in der Echokardiographie ermittelten linksventrikulären end-diastolischen Durchmesser(LVEDD).

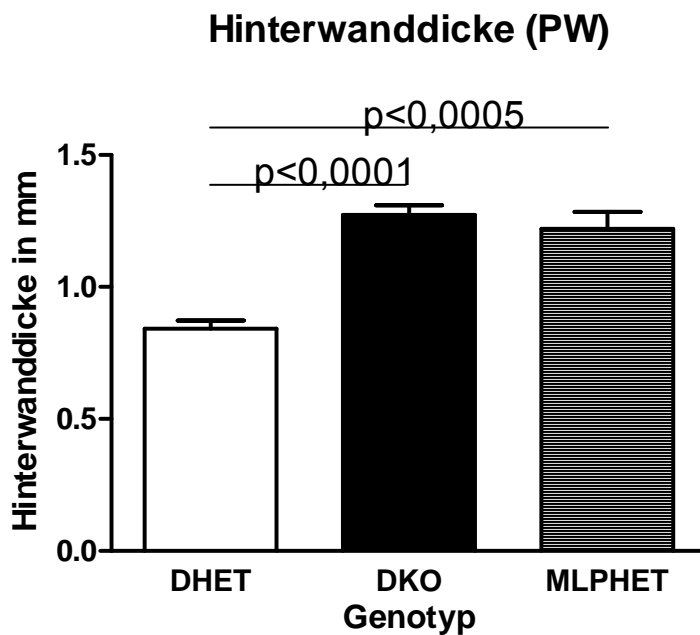


Abb. 3.2: Vergleich der in der Echokardiographie ermittelten Hinterwanddicke.

3. Ergebnisse

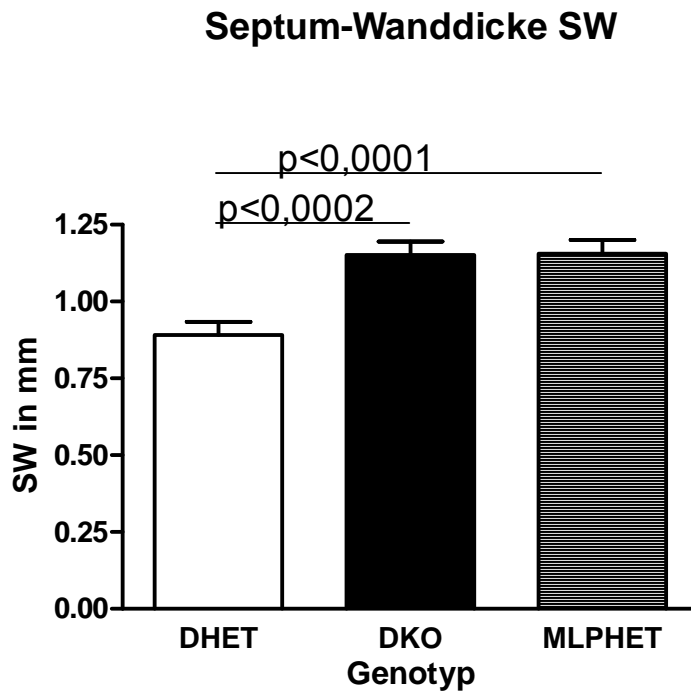


Abb. 3.3: Vergleich der in der Echokardiographie ermittelten Septum-Wanddicke.

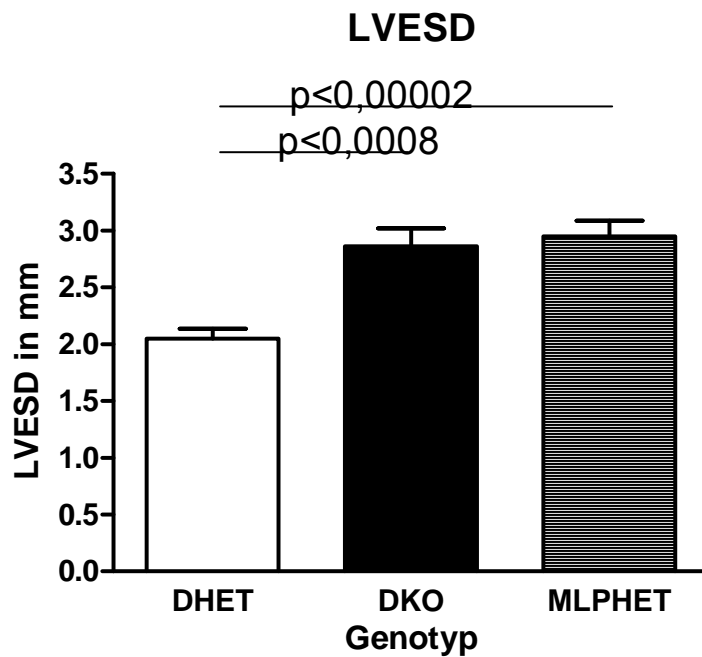


Abb. 3.4: Vergleich der in der Echokardiographie ermittelten linksventrikulären end-systolischen Durchmesser (LVESD).

3. Ergebnisse

Für eine Einschränkung der kontraktilen Funktion des Herzens der MLPHET-Tiere gegenüber den DHET-Tieren sprachen ein signifikant erhöhter linksventrikulärer end-systolischer Durchmesser (LVESD; MLPHET: $2,95 \pm 0,13$ mm gegenüber DHET: $2,05 \pm 0,09$ mm, entsprechend einer Zunahme um 44%; $p < 0,00002$; Abb. 3.4) sowie eine signifikant geringere Verkürzungsfraction (FS für fractional shortening; MLPHET: $28,84 \pm 1,70\%$ gegenüber DHET: $42,92 \pm 2,09\%$; $p < 0,00004$; Abb. 3.5).

Gegenüber den DHET-Tieren der Kontrollgruppe zeigten auch die DKO-Tiere (mit dem Genotyp MLP \neg /L und MyBPc \neg /L; n=10) einen signifikant größeren LVEDD (DHET: $3,58 \pm 0,05$ mm gegenüber DKO: $4,10 \pm 0,10$ mm; $p < 0,0005$; Abb. 3.1) und eine signifikant verdickte Hinterwand (PW; DHET: $0,84 \pm 0,03$ mm gegenüber DKO: $1,27 \pm 0,04$ mm; $p < 0,0001$; Abb. 3.2). Eine signifikante Hypertrophie des Septums war in der Gruppe der DKO-Tiere mit $1,15 \pm 0,04$ mm im Vergleich mit den DHET-Tieren mit $0,89 \pm 0,04$ mm ($p = 0,0002$; Abb. 3.3) ebenfalls erkennbar.

Ebenso zeigten die DKO-Tiere in der Echokardiographie eine eingeschränkte kontraktile Herzfunktion mit signifikant erhöhtem LVESD (DHET: $2,05 \pm 0,09$ mm gegenüber DKO: $2,86 \pm 0,15$ mm; $p < 0,0008$; Abb. 3.4) und signifikant niedrigerer Verkürzungsfraction (DHET: $42,92 \pm 2,09\%$ gegenüber DKO: $30,45 \pm 2,46\%$; $p < 0,003$; Abb. 3.5).

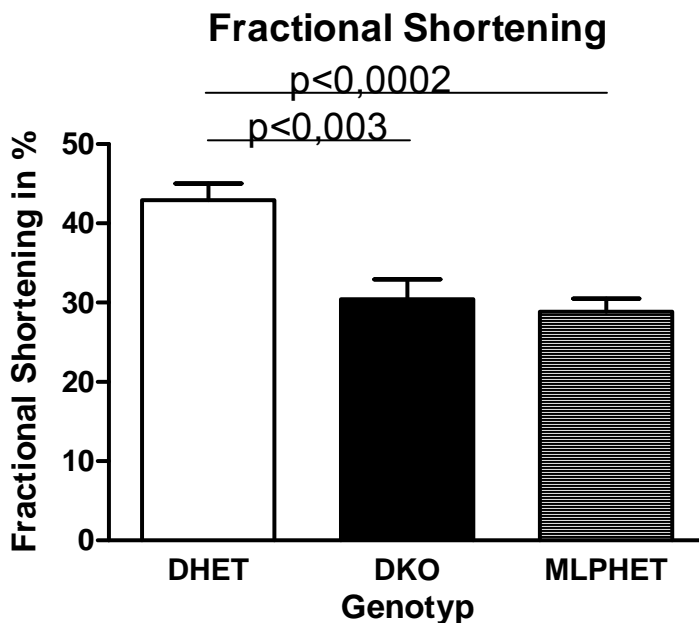


Abb. 3.5: Vergleich der in der Echokardiographie ermittelten Verkürzungsfraction.

3. Ergebnisse

Dabei lagen die ermittelten Werte der DKO-Mäuse mit Ausnahme der Hinterwanddicke stets zwischen den Werten der DHET-Kontrolltiere und denen der MLPHET-Tiere, allerdings ohne sich signifikant von denen der MLPHET-Tiere zu unterscheiden. Wenn man jedoch ausschließlich diejenigen Tiere betrachtet, die zum Zeitpunkt der Echokardiographie älter als 36 Wochen waren, zeigte sich ein tendenzieller Unterschied zwischen den beiden Gruppen der DKO- und der MLPHET-Mäuse: Die Analyse ergab eine Tendenz zu einer Einschränkung der Verkürzungsfraction, die in der Gruppe der MLPHET-Tiere ($n=15$) $29,83 \pm 1,72$ % betrug, im Vergleich zu $37,68 \pm 3,11$ % in den DKO-Mäusen ($n=4$) ($p=0,08$). DHET-Tiere dieser Altersgruppe ($n=5$) wiesen eine Verkürzungsfraction von 41,5% auf, was signifikant höher als bei den MLPHET-Tieren war ($p<0,001$), sich jedoch nicht signifikant von den Werten in der DKO-Gruppe unterschied ($p=0,33$).

Zusammenfassend zeigten gegenüber den DHET-Kontrolltieren sowohl die MLPHET-Tiere als auch die DKO-Tiere in der Echokardiographie eine deutliche Beeinträchtigung der Herzfunktion mit einer dilatativen und einer hypertrophen Komponente. Dabei war die Beeinträchtigung der DKO-Tiere keinesfalls stärker ausgeprägt als die der MLPHET-Tiere. Im Gegenteil zeigte sich eine Tendenz zu einer etwas geringgradigeren Beeinträchtigung.

3. Ergebnisse

3.2 Herzentnahme und Präparation – Auffälligkeiten

Die Tötung und Präparation der Tiere erfolgte wie in 2.5.1.1, S. 29, beschrieben. Zunächst wurde von jeder Maus das Körpergewicht bestimmt, während der weiteren Präparation auch das Herz-, Leber- und Lungengewicht sowie die Tibialänge.

Von den echokardiographisch untersuchten Tieren wurden 5 DHET-Tiere, 14 MLPHET-Tiere sowie 9 DKO-Tiere von der Abteilung kardiovaskuläre Molekulargenetik für die weiteren Versuche zur Verfügung gestellt.

Hinsichtlich der Körpergewichte ergaben sich folgende Werte: Die Gruppe der DHET-Tiere zeigte ein mittleres Körpergewicht von $33,48 \pm 1,79$ g, wobei die Weibchen (n=3) mit $31,67 \pm 1,22$ g erwartungsgemäß leichter als die Männchen (n=2) mit $36,20 \pm 3,90$ g waren. Der Vergleich mit den Tieren der MLPHET-Gruppe ergab bei einem mittleren Körpergewicht von $34,66 \pm 2,78$ g (mit einem Körpergewicht der Weibchen (n=7) von $29,21 \pm 2,51$ g und einem Körpergewicht der Männchen (n=7) von $40,11 \pm 4,16$) keine signifikanten Unterschiede. Auch beim Vergleich mit den Tieren der DKO-Gruppe zeigten sich bei einem mittleren Körpergewicht von $34,48 \pm 0,79$ g (mit einem Körpergewicht der Weibchen (n=4) von $30,25 \pm 1,69$ g und einem Körpergewicht der Männchen (n=5) von $36,02 \pm 0,38$ g) keine signifikanten Unterschiede.

Das Herzgewicht in Milligramm normalisiert auf das Körpergewicht der Tiere in Gramm ergab signifikant höhere Werte für die MLPHET-Tiere mit $10,02 \pm 0,51$ mg/g im Vergleich zu den DHET-Tieren mit $7,42 \pm 0,34$ mg/g ($p < 0,0006$). Die DKO-Tiere wiesen mit $9,99 \pm 0,26$ mg/g ebenfalls signifikant erhöhte Werte im Vergleich zu den DHET-Tieren auf ($p < 0,0003$; Abb. 3.6). Zwischen den MLPHET- und den DKO-Tieren war kein signifikanter Unterschied festzustellen.

Auch bei der Normalisierung des Herzgewichts in Milligramm auf die Tibialänge der Tiere in Millimeter zeigten die MLPHET-Tiere mit $14,69 \pm 0,89$ mg/mm im Vergleich zu den DHET-Tieren mit $10,60 \pm 0,63$ mg/mm signifikant erhöhte Werte ($p < 0,003$). Die DKO-Tiere wiesen mit einem Mittelwert von $14,47 \pm 0,26$ mg/mm gegenüber den DHET-Tieren ebenfalls signifikant erhöhte Werte auf ($p < 0,02$; Abb. 3.7). Ein signifikanter Unterschied zwischen den MLPHET- und den DKO-Tieren konnte nicht festgestellt werden.

3. Ergebnisse

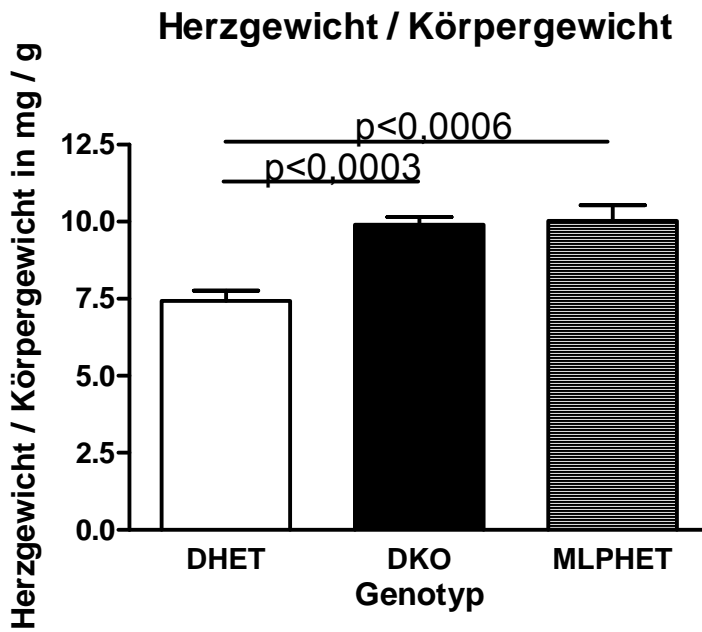


Abb. 3.6: Herzgewicht auf Körpergewicht der Mäuse normalisiert, Auftragung des Mittelwertes mit SEM nach Genotypen.

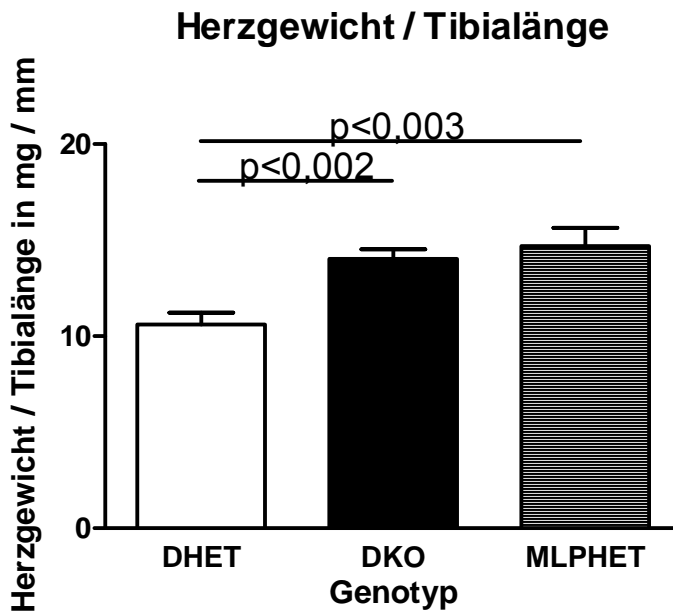


Abb. 3.7: Herzgewicht auf Tibialänge der Mäuse normalisiert, Auftragung des Mittelwertes mit SEM nach Genotypen.

3. Ergebnisse

Hinsichtlich des Lungen- und Lebergewichts fanden sich weder absolut noch bezogen auf Körpergewicht oder Tibialänge signifikante Unterschiede zwischen den Mäusen der drei untersuchten Genotypen.

Bei der äußerlichen Betrachtung der noch uneröffneten Herzen unmittelbar nach der Herzentnahme zeigten sich in der Gruppe der DHET-Tiere die Herzen normal konfiguriert und ohne morphologische Auffälligkeiten. Dagegen war bei den MLPHET- wie auch bei den DKO-Tieren makroskopisch eine deutliche Herzvergrößerung erkennbar. Der linke Ventrikel war in der Regel kugelig dilatiert, die Ventrikelwand wirkte unter dem Binokular deutlich hypertrophiert. Abbildung 3.8 illustriert diesen auffälligen Befund.

Nach Eröffnung des Herzens fiel bei allen drei untersuchten Gruppen eine im Vergleich zu Mäusen anderer Stämme hypoplastische Anlage der Papillarmuskeln auf. Besonders ausgeprägt war diese Hypoplasie in den beiden Gruppen der MLPHET- und DKO-Tiere, wengleich dieser subjektive Eindruck nicht quantitativ beziffert werden konnte. Oft war eine Präparation der Papillarmuskeln unmöglich, so dass auf Trabekel des rechten Ventrikels zurückgegriffen werden musste.



Abb. 3.8: Vergleich der Herzmorphologie: links DHET-Herz, rechts MLPHET-Herz. Auffällig ist die kugelige Dilatation und die buckelige Oberflächenstruktur des MLPHET-Herzens.

3. Ergebnisse

Bei der Präparation der Muskelstreifen fiel eine Verhärtung der Gewebetextur bei den DKO- und der MLPHET-Tieren im Vergleich zu den DHET-Tieren auf. Beim Durchtrennen des Myokards mittels einer Federschere musste ein erhöhter Widerstand überwunden werden. Im Binocular war die stark vergrößerte Trabekularisierung sowohl im rechten als auch linken Ventrikel in diesen beiden Gruppen deutlich zu erkennen. Darüber hinaus wurden in einzelnen Herzen sowohl der DKO- als auch der MLPHET-Tiere intramurale Kalzifikationen im Vorhofmyokard festgestellt, die sich in keinem der DHET-Tiere fanden.

3.3 Versuche mit intakten multizellulären Herzmuskelstreifen

Wie in 2.5.1.4, S.31, beschrieben, durchliefen die intakten multizellulären Herzmuskelstreifen ein Versuchsprotokoll bestehend aus der Bestimmung der Kraft-Frequenz-Beziehung (FFR für Force Frequency Relationship), des Post-Pausen-Verhaltens (PPV) sowie der Isoprenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Iso-KWK). Abb. 3.9 zeigt exemplarisch die Originalregistrierung eines gesamten Versuchsablaufs. In die statistische Auswertung wurde pro Maus ein Streifen aufgenommen. Dieser musste das gesamte Protokoll ohne Hinweise auf eine Kontraktur oder Arrhythmien durchlaufen haben.

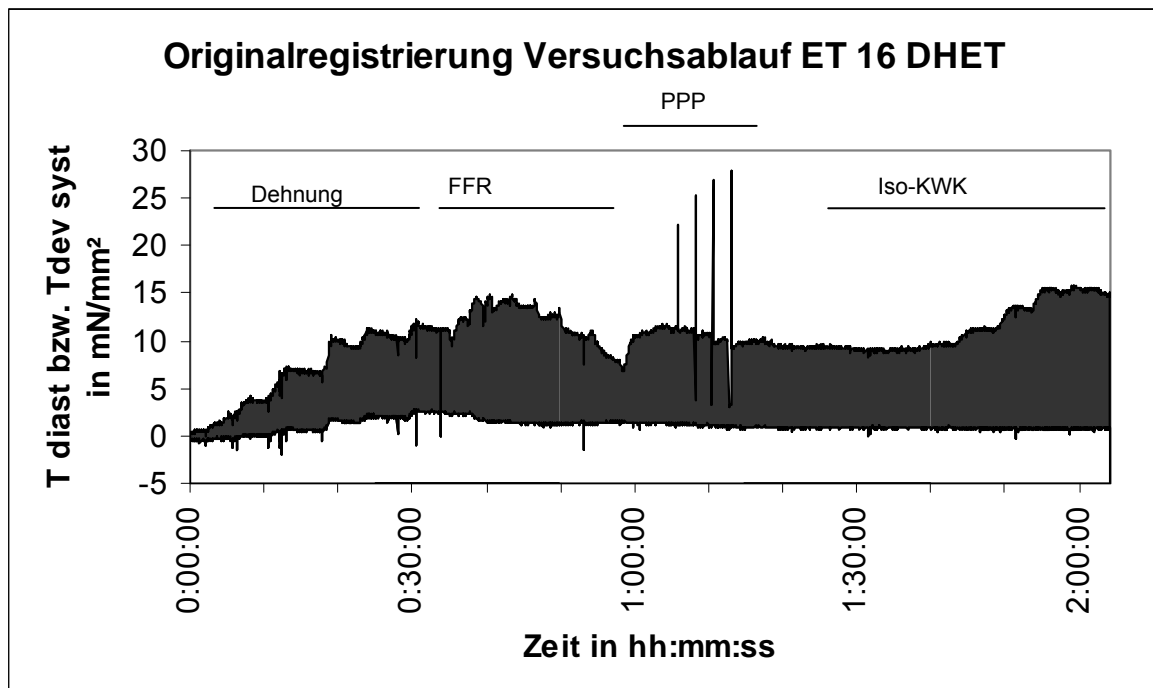


Abb. 3.9: Originalregistrierung eines Versuchsablaufs; ET Maus 16; DHET

3. Ergebnisse

3.3.1 Kraft-Frequenz-Beziehung (FFR)

Die Herzmuskelstreifen der DHET-Tiere (n=4) reagierten auf eine Erhöhung der Stimulationsfrequenz mit einer Zunahme der Kontraktionskraft im Sinne einer positiven Kraft-Frequenz-Beziehung (Mittelwerte auf die bei 4 Hz entwickelte Kraft normalisiert; Zunahme bei 10 Hz auf $1,63 \pm 0,43$). Abb. 3.10 zeigt exemplarisch eine Originalregistrierung der DHET-Maus ET 16.

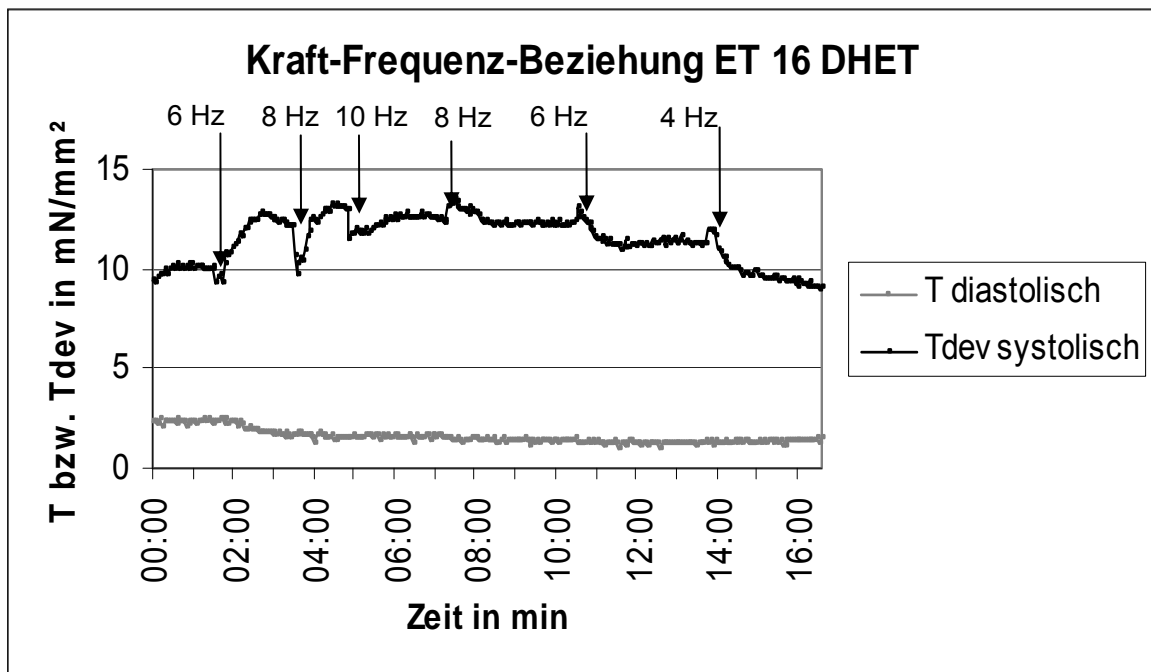


Abb. 3.10: Kraft-Frequenz-Beziehung; Originalregistrierung der DHET-Maus ET 16; Startfrequenz 4 Hz

3. Ergebnisse

Im Gegensatz dazu zeigten die MLPHET-Tiere (n=8) eine negative Kraft-Frequenz-Beziehung (Abnahme bei 10 Hz auf $0,82 \pm 0,10$) mit signifikantem Unterschied zu den DHET-Tieren ($p < 0,001$). Abb. 3.11 zeigt exemplarisch eine Originalregistrierung der MLPHET-Maus ET 26 mit typisch negativer Kraft-Frequenz-Beziehung.

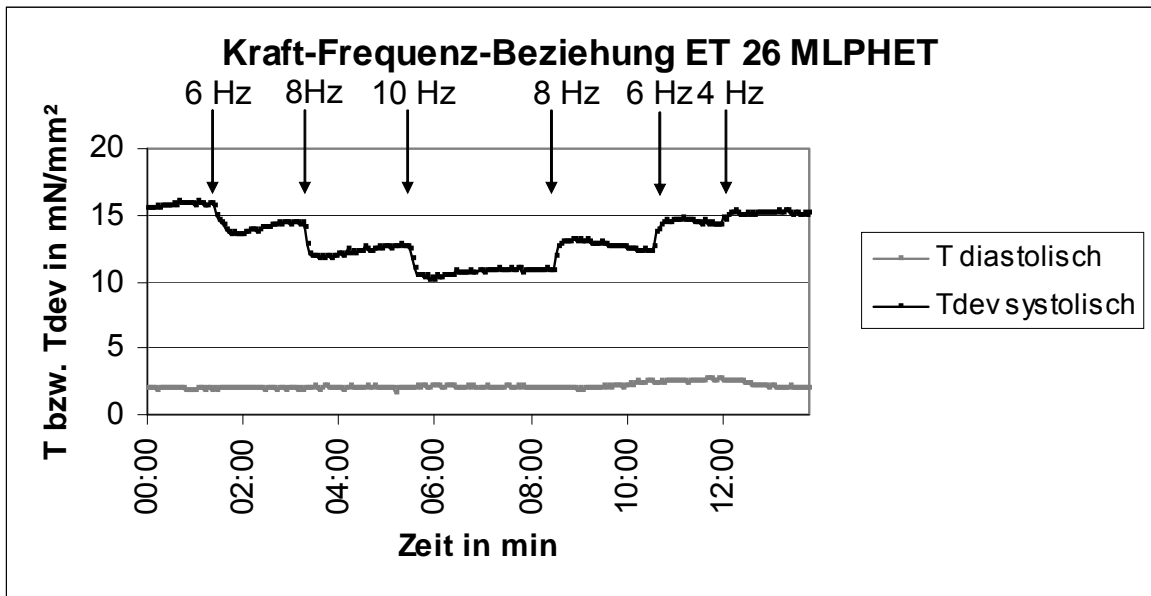


Abb. 3.11: Kraft-Frequenz-Beziehung; Originalregistrierung der MLPHET-Maus ET 26; Startfrequenz 4 Hz

Die Herzmuskelstreifen der DKO-Tiere (n=5) zeigten hingegen eine intermediäre Reaktion mit einer flachen Kraft-Frequenz-Beziehung (Zunahme bei 10 Hz auf $1,09 \pm 0,09$), die sich sowohl gegenüber der Gruppe der DHET-Tiere ($p < 0,02$) als auch der MLPHET-Tiere ($p < 0,0005$) signifikant unterschied.

Abb. 3.12 zeigt die nach Genotypen aufgetragene Kraft-Frequenz-Beziehung.

3. Ergebnisse

Kraft-Frequenz-Beziehung

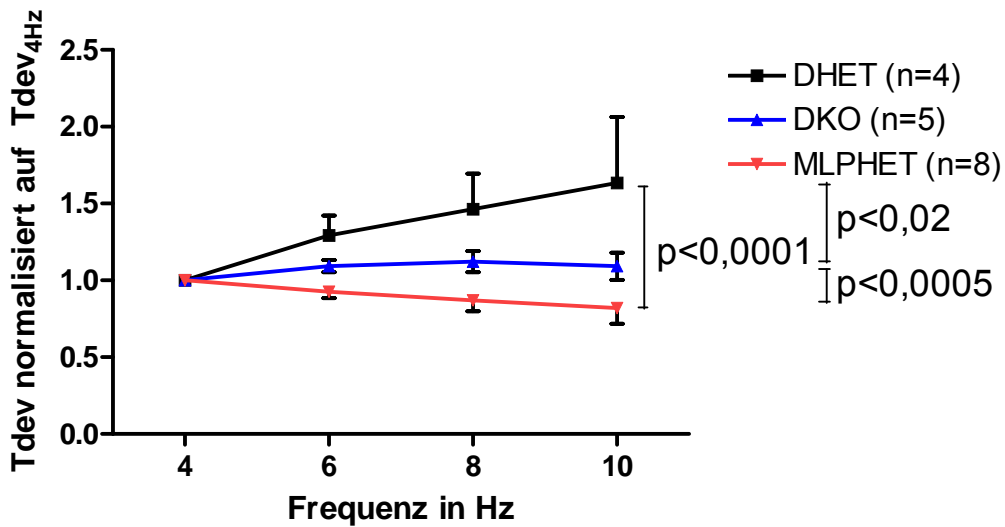


Abb. 3.12: Kraft-Frequenz-Beziehung; Tdev normalisiert auf Tdev_{4Hz}; Auftragung des Mittelwertes mit SEM nach Genotypen.

3.3.2 Post-Pausen-Verhalten (PPV)

Bei der Untersuchung des Post-Pausen-Verhaltens zeigten die Präparate aus allen Gruppen eine Potenzierung, d. h. die erste elektrisch stimulierte Einzelzuckung nach einer Stimulationspause zeigte eine größere Kraftentwicklung als die gemittelten Einzelzuckungen unter regelmäßiger Stimulation bei 6 Hz vor der Stimulationspause. Mit zunehmender Pausendauer wiesen DHET-Tiere zunächst eine deutliche Zunahme der Kontraktionskraft bis 4 sec auf (von $2,11 \pm 0,06$ bei 1 sec auf $2,68 \pm 0,27$ bei 4 sec). Bei Pausenverlängerung auf 8 sec zeigten sie jedoch einen leichten Abfall auf $2,61 \pm 0,20$. Die MLPHET-Tiere wiesen eine deutliche Zunahme der Kontraktionskraft mit zunehmender Pausenlänge bis 8 sec auf, von $2,46 \pm 0,22$ bei 1 sec auf $3,21 \pm 0,34$ bei 8 sec. Auch die DKO-Tiere zeigten eine kontinuierliche Zunahme der Kontraktionskraft mit zunehmender Pausenlänge von $2,06 \pm 0,10$ bei 1 sec auf $2,83 \pm 0,22$ bei 8 sec. Im Vergleich zu den DKO-Tieren zeigten die MLPHET-Tiere eine signifikant ($p < 0,04$) erhöhte Potenzierung normalisiert auf den Ausgangswert. Trotz des absolut größeren Unterschieds zwischen den Mittelwerten der MLPHET- und der DHET-Tiere war der

3. Ergebnisse

Unterschied aufgrund der geringeren Gruppengröße der DHET-Tiere statistisch nicht signifikant.

Abb. 3.13 zeigt exemplarisch die Originalregistrierung einer Post-Pausen-Potenzierung.

Abb. 3.14 zeigt die nach Genotypen aufgetragene Post-Pausen-Potenzierung.

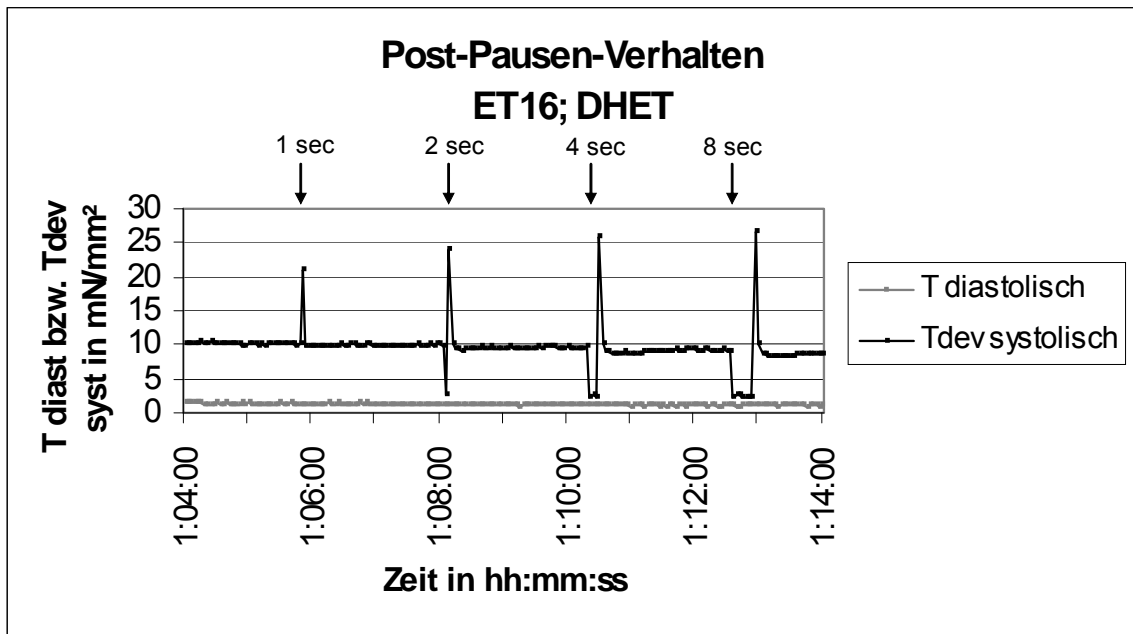


Abb. 3.13: Post-Pausen-Potenzierung; Originalregistrierung der DHET-Maus ET 16; kontinuierliche Zunahme der Kontraktionskraft mit zunehmender Pausenlänge.

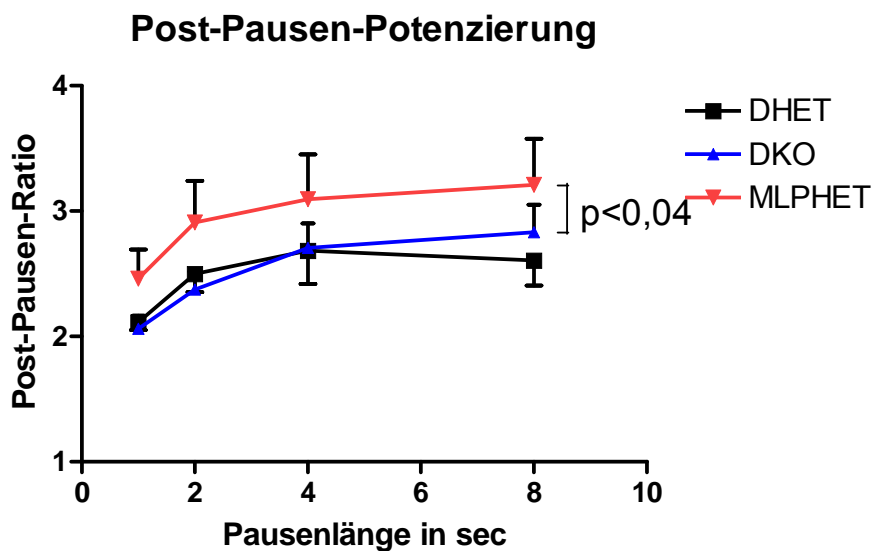


Abb. 3.14: Post-Pausen-Potenzierung; Ratio: $T_{dev_{ppp}}$ normalisiert auf Tdev vor der Pause; Auftragung des Mittelwertes mit SEM nach Genotypen.

3. Ergebnisse

3.3.3 Isoprenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Iso-KWK)

Alle drei Gruppen zeigten erwartungsgemäß eine deutliche Steigerung der Tdev mit Erhöhung der Isoprenalin-Konzentration im Sinne einer funktionierenden β -adrenergen Signaltransduktion. Zur Vergleichbarkeit wurde die bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 1 μ M Isoprenalin entwickelte Tdev_{End} auf die bei Grundstimulation von 6 Hz in Abwesenheit des β -adrenergen Agonisten entwickelte Kraft Tdev_{Basis} normalisiert (Abb. 3.15). Hierbei zeigten die DHET-Tiere die stärkste Zunahme auf $2,60 \pm 0,32$. In Präparaten aus MLPHET-Tieren nahm die Kraftentwicklung auf $2,35 \pm 0,37$ zu, während Präparate aus DKO-Tieren die geringste Kraftzunahme auf $2,23 \pm 0,23$ zeigten. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen konnten jedoch nicht festgestellt werden.

Isoprenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurve

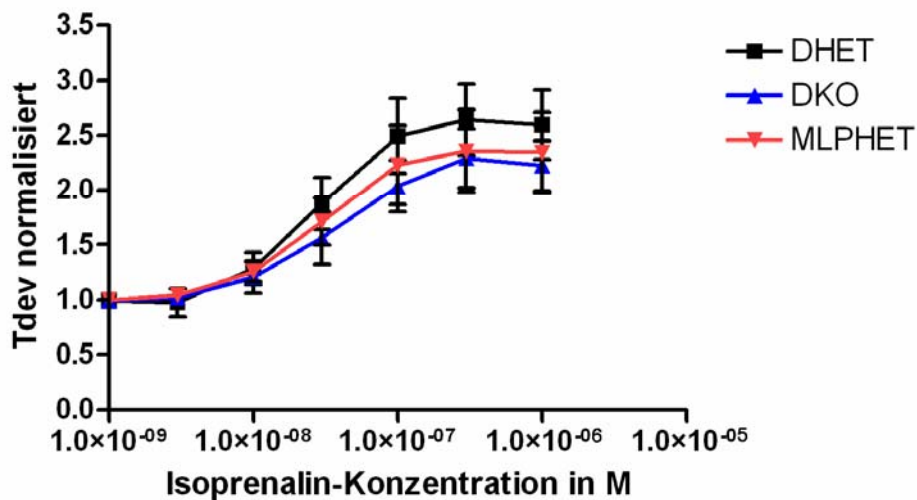


Abb. 3.15: Isoprenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurve; Tdev normalisiert auf Tdev_{Basis} vor Isoprenalin-Gabe; Auftragung des Mittelwertes mit SEM nach Genotypen.

3.4 Versuche mit permeabilisierten Herzmuskelstreifen (Skinned Fibers)

Die Versuche mit permeabilisierten Herzmuskelstreifen wurden durchgeführt, um die Calcium-Aktivierbarkeit der Myofilamente im Myokard der unterschiedlichen Genotypen zu untersuchen. Die Bestimmung der Ruhe-Dehnungs-Kurve diente der Untersuchung der passiv-mechanischen Eigenschaften (Dehnbarkeit) des Muskelgewebes. Die Präparation der Streifen von Tieren aus den Gruppen der DKO- und MLPHET-Gruppe gestaltete sich aufgrund der unregelmäßigeren Trabekelstruktur und der dadurch bedingten Schwierigkeit, parallelfasrig aufgebautes Myokard zu finden, meist schwieriger als die der DHET-Streifen. Sie gelang letztlich jedoch so zufriedenstellend, dass von vergleichbaren Untersuchungsbedingungen für die Muskelstreifen der unterschiedlichen Genotypen ausgegangen werden kann.

Die permeabilisierten Herzmuskelstreifen durchliefen ein Versuchsprotokoll bestehend aus der Bestimmung der maximalen Kontraktionskraft durch zwei Vollaktivierungen, der Calcium-Aktivierung und der Ruhe-Dehnungs-Kurve. Abb. 3.16 zeigt exemplarisch die Originalregistrierung eines gesamten Versuchsablaufs. In die Statistik wurde pro Maus ein Streifen aufgenommen.

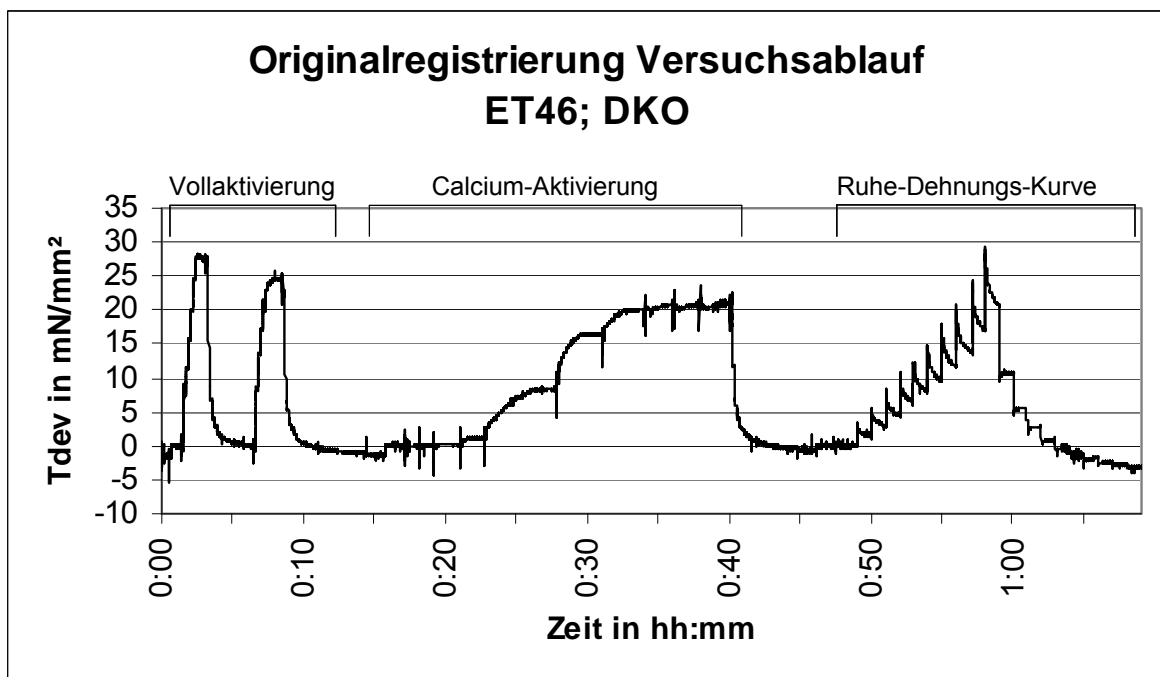


Abb. 3.16: Originalregistrierung eines Skinned-Fibers-Versuchsablaufs; ET-Maus 46; DKO

3. Ergebnisse

3.4.1 Calcium-Aktivierungs-Kurve

Die Bestimmung der Calcium-Aktivierungs-Kurve erfolgte durch die in zehn Schritten durchgeführte Erhöhung der Calcium-Konzentration von $2,99 \times 10^{-11}$ M auf $5,15 \times 10^{-5}$ M. Abb. 3.17 zeigt die Originalregistrierung einer typischen Calcium-Aktivierungs-Kurve.

Die Herzmuskelstreifen der DHET-Tiere (n=5) entwickelten unter Calcium-Aktivierung eine maximale Kraft von $29,04 \pm 1,15$ mN/ mm² (Abb. 3.18). Die zum Erreichen der halben maximalen Kraft nötige Calciumkonzentration EC 50 als Parameter für die Calciumsensitivität betrug in dieser Gruppe $1,92 \pm 0,06$ μ M (Abb. 3.19).

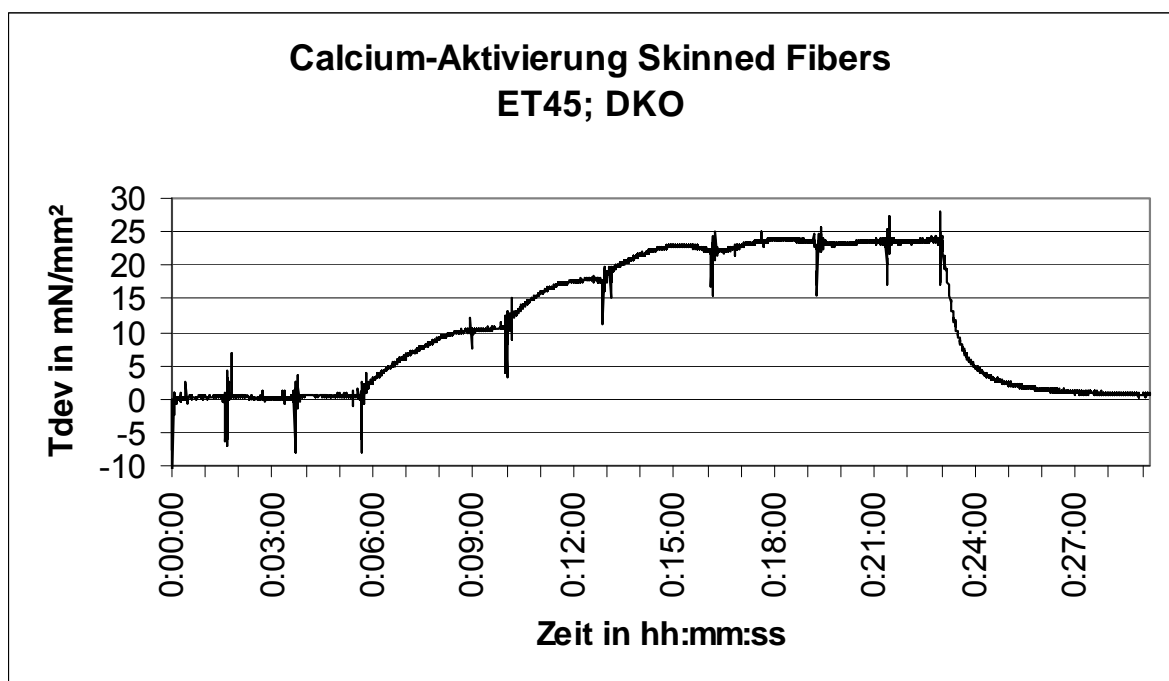


Abb. 3.17: Original-Registrierung als Beispiel einer typischen Calcium-Aktivierungs-Kurve; DKO-Maus ET 45.

3. Ergebnisse

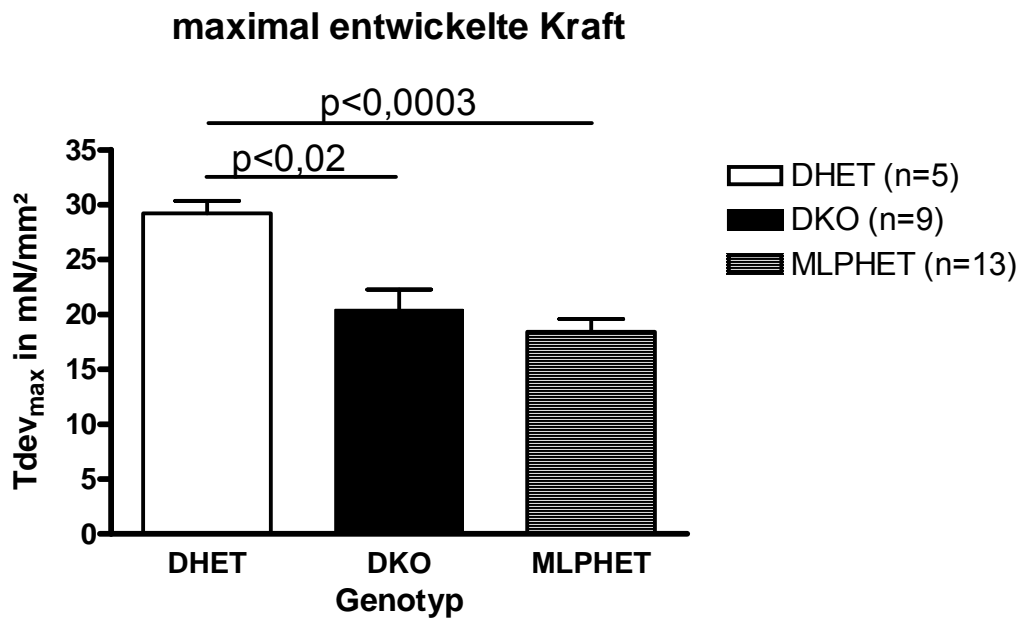


Abb. 3.18: Maximal entwickelte Kraft bei Calcium-Aktivierung nach Genotypen.

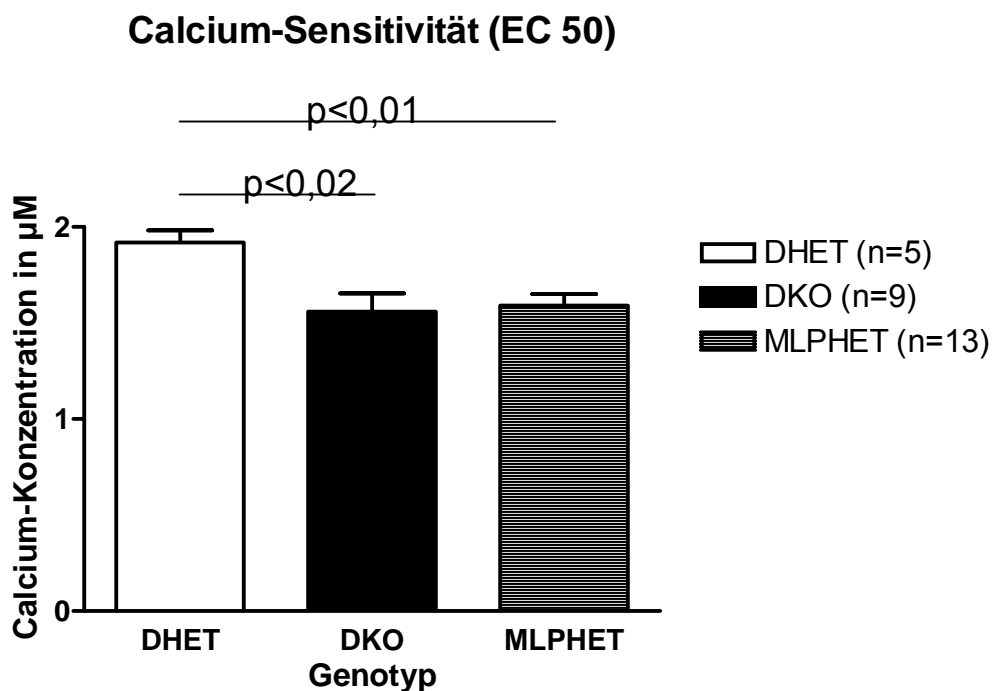


Abb. 3.19: EC 50 als Maß für die Calcium-Sensitivität nach Genotypen; homozygoter Knock Out von MyBPc führt zur Abnahme der EC 50 und damit Zunahme der Calcium-Sensitivität.

3. Ergebnisse

Im Gegensatz dazu betrug die maximale Calcium-aktivierte Kraft in der Gruppe der MLPHET-Tiere nur $18,43 \pm 1,43$ mN/ mm² (n=13; $p < 0,0003$; Abb. 3.18). Die Herzmuskelstreifen der MLPHET-Tiere wiesen darüber hinaus eine im Vergleich zur DHET- Gruppe signifikant niedrigere EC 50 von $1,59 \pm 0,06$ μ M auf ($p < 0,01$; Abb. 3.19). Dies bedeutet, dass die Herzmuskelstreifen der MLPHET-Tiere eine signifikant höhere Calcium-Sensitivität als die DHET-Tiere besitzen, einhergehend mit einem früheren Anstieg der Calcium-Aktivierungs-Kurve und damit einer Linksverschiebung der Kurve (siehe Abb. 3.20).

Die Herzmuskelstreifen der DKO-Tiere entwickelten eine maximale Kraft von $21,41 \pm 2,11$ mN/ mm² (n=9) und damit eine signifikant niedrigere Kraft als die DHET-Gruppe ($p < 0,02$), die sich von derjenigen der MLPHET-Tiere nicht signifikant unterschied (Abb. 3.18). Ebenso wie diejenigen der MLPHET-Tiere zeigten die Muskelstreifen der DKO-Tiere eine verglichen mit den als Kontrolltiere eingesetzten DHET-Tieren signifikant niedrigere EC 50 von $1,56 \pm 0,09$ μ M ($p < 0,02$), die derjenigen der DKO-Tiere vergleichbar war (Abb. 3.19). Somit wiesen beide Genotypen mit homozygotem Knock Out des Myosin-Bindungs-Proteins-C (MyBPC) gegenüber dem DHET-Genotyp eine gesteigerte Calcium-Sensitivität auf.

Die Berechnung des Hill-Koeffizienten, welcher die Steilheit des Kurvenanstiegs und somit die Kooperativität der Calcium-abhängigen Aktivierung widerspiegelt, ergab einen signifikant erniedrigten Wert der DKO-Tiere gegenüber der Gruppe der MLPHET-Tiere mit $3,96 \pm 0,21$ gegenüber $4,85 \pm 0,21$ ($p < 0,007$; Abb. 3.21). Der Unterschied zwischen DKO- und DHET-Tieren ($4,50 \pm 0,21$) war bei einem $p = 0,15$ ebensowenig signifikant wie der Unterschied zwischen DHET und MLPHET-Tieren bei einem $p = 0,33$.

3. Ergebnisse

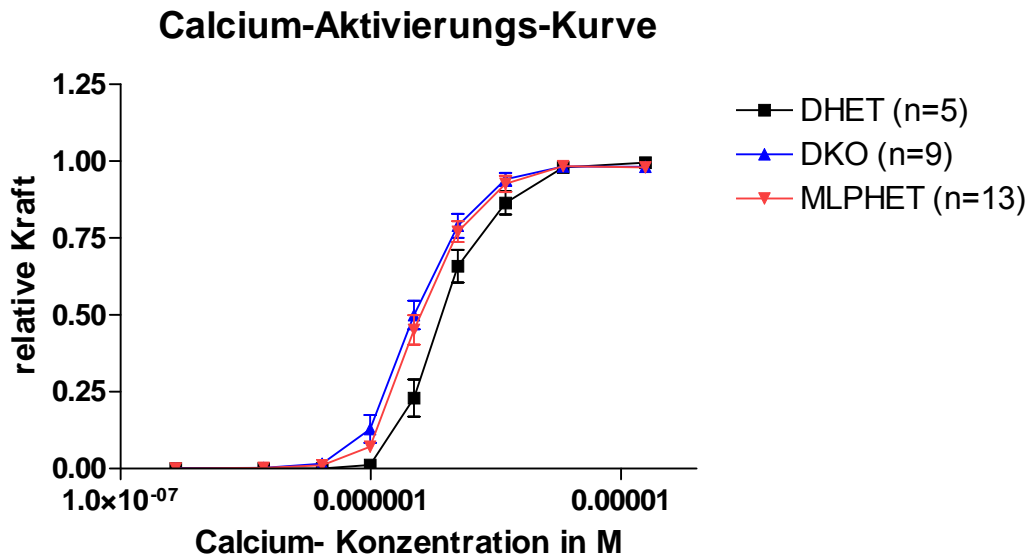


Abb. 3.20: Darstellung der Calcium-Aktivierungs-Kurve nach Genotypen; auf die maximal entwickelte Kraft normalisiert; Linksverschiebung der Kurven in den beiden Gruppen mit homozygotem Knock Out von MyBPc.

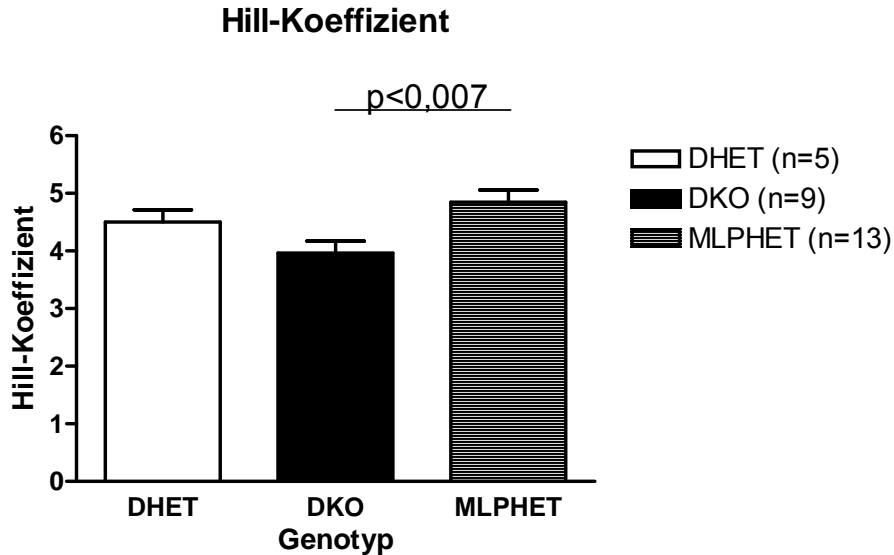


Abb. 3.21: Hill-Koeffizient als Maß für die Steilheit des Kraftanstieges unter Kalziumsteigerung; MLPHET-Tiere zeigten gegenüber den DHET-Tieren einen signifikant steileren Anstieg unter Kalzium.

3. Ergebnisse

3.4.2 Ruhe-Dehnungs-Kurve

Abb. 3.22 zeigt die Originalregistrierung einer typischen Ruhe-Dehnungs-Kurve.

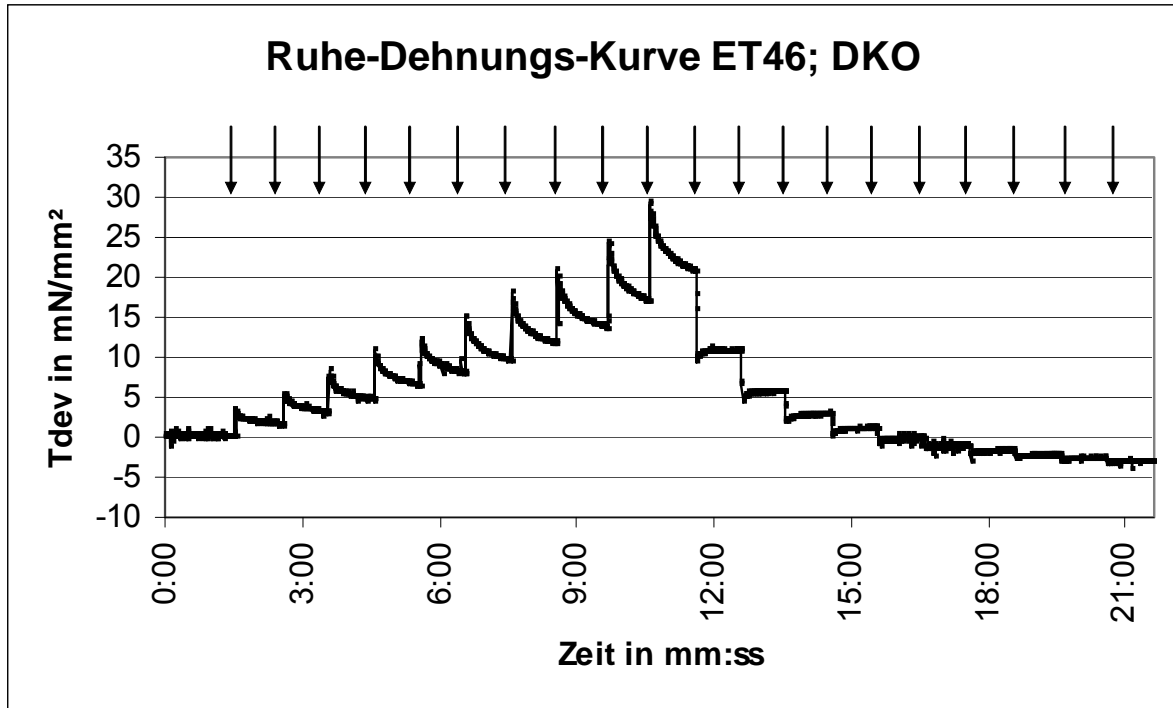


Abb. 3.22: Original-Registrierung als Beispiel einer typischen Ruhe-Dehnungs-Kurve; DKO-Maus ET 46. Senkrechte Pfeile zeigen Längenänderungen um 5% der Gesamtlänge an, Zeitintervall zwischen den einzelnen Dehnungsschritten jeweils eine Minute.

Hierbei zeigten die Herzmuskelstreifen der DHET-Gruppe den größten Kraftanstieg auf $26,95 \pm 2,64$ mN/ mm², gefolgt von der MLPHET-Gruppe mit $24,14 \pm 3,12$ mN/ mm² und der DKO-Gruppe mit $22,70 \pm 3,15$ mN/ mm². Die Unterschiede zwischen den drei Gruppen waren statistisch nicht signifikant. Abb. 3.23 zeigt die durchschnittlichen gemessenen Kräfte bei den jeweiligen Dehnungsstufen.

3. Ergebnisse

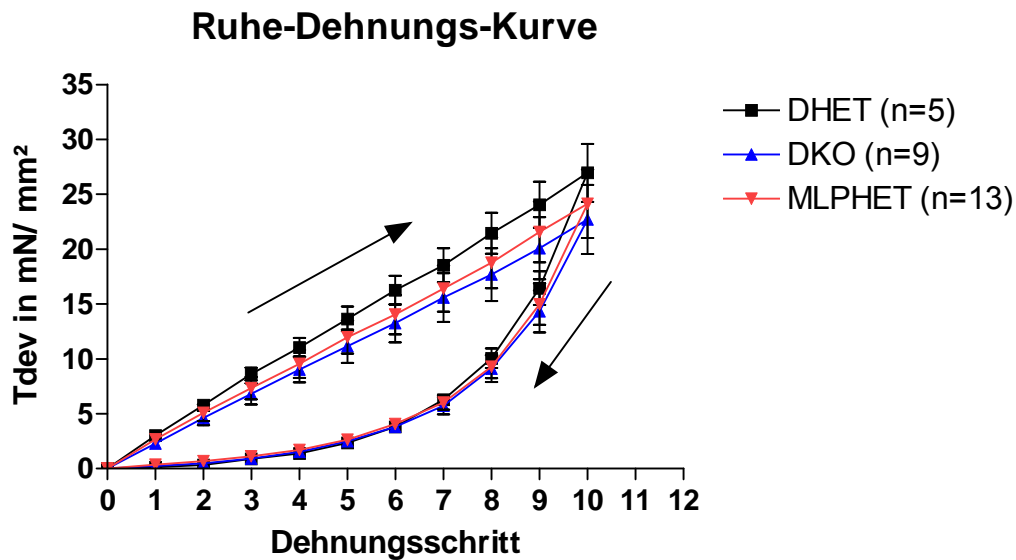


Abb. 3.23: Darstellung der Ruhe-Dehnungs-Kurve nach Genotypen. Aufsteigender Pfeil zeigt die Dehnungs-, absteigender Pfeil die Entdehnungsphase an, es zeigt sich eine typische Verlustschleife..

3.5 Histologische Untersuchungen

3.5.1 Myozytenquerschnittsfläche

Weizenkeim-Agglutinin bindet selektiv an N-Acetylglucosamin und N-Acetylneuramin-Essigsäure, zwei zellmembranspezifische Kohlenhydratderivate (Wright 1984). Durch Konjugation mit einem fluoreszierenden Farbstoff können so die Zellmembranen spezifisch gefärbt und die Zellumrisse sichtbar gemacht werden. Das Verfahren wurde in dieser Studie angewendet, um Aussagen über das Vorliegen einer zellulären Hypertrophie zu ermöglichen.

Die Vermessung der Myozytenquerschnittsfläche ergab für die DHET-Tiere (n=120) einen Wert von $328 \pm 8,95 \mu\text{m}^2$ (Abb. 3.24). Die Myozyten aus MLPHET-Tieren (n=180) zeigten eine signifikant größere Querschnittsfläche mit $454 \pm 10,53 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,0001$) im Sinne einer Hypertrophie der Myozyten. Auch die Gruppe der DKO-Mäuse (n=180) hatte im Vergleich zu den DHET-Tieren eine signifikant erhöhte Myozytenquerschnittsfläche mit $410 \pm 8,61 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,0001$). Allerdings war die Hypertrophie signifikant geringer ausgeprägt als in der Gruppe der MLPHET-Tiere ($p < 0,02$; Abb. 3.24).

3. Ergebnisse

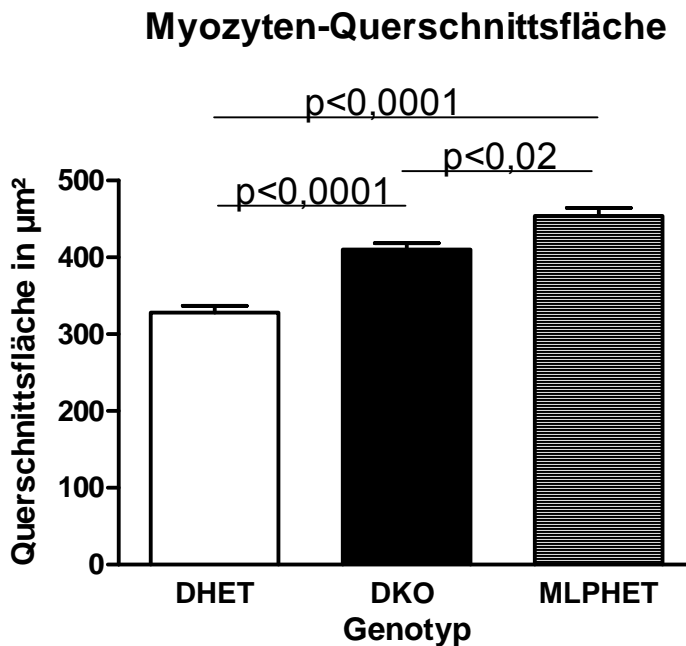


Abb. 3.24: Darstellung der durchschnittlichen Myozytenquerschnittsfläche \pm SEM nach Genotypen

3.5.2 Fibroseanteil am Gesamtgewebe

Die Färbung mit Picrosiriusrot wurde zur Bestimmung des Fibroseanteils der Herzen durchgeführt. Pro Schnitt wurden nach Zufall jeweils zehn Gesichtsfelder vermessen, insgesamt je Gruppe $n=30$ Gesichtsfelder.

Die Messung des Fibroseanteils ergab für die Tiere der DHET-Gruppe einen Wert von $2,14 \pm 0,2\%$. Die Tiere der MLPHET-Gruppe zeigten einen signifikant höheren Anteil an Fibrose mit $7,8 \pm 1,2\%$ ($p < 0,0002$). Die DKO-Tiere wiesen einen noch höheren Fibroseanteil mit $11,6 \pm 1,8\%$ auf mit signifikantem Unterschied gegenüber der DHET-Gruppe ($p < 0,0001$). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen der MLPHET-Tiere und der DKO-Tiere konnte jedoch nicht festgestellt werden. Abb. 3.25 zeigt den durchschnittlichen Fibroseanteil nach Genotyp.

3. Ergebnisse

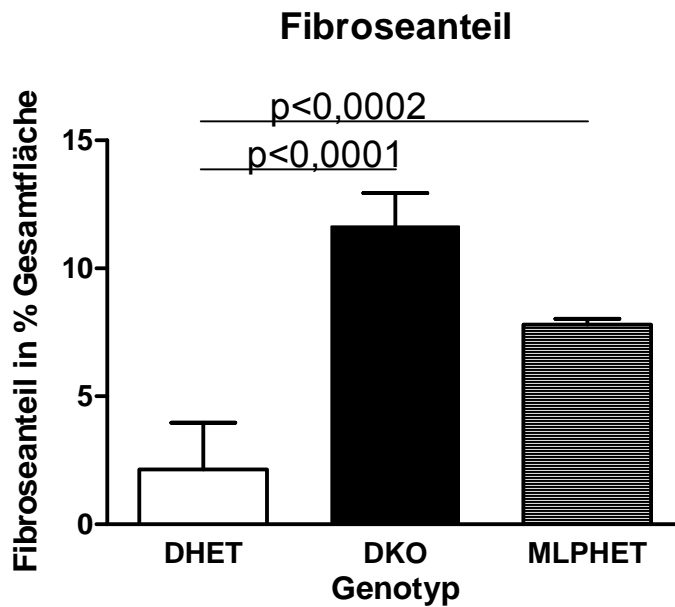


Abb. 3.25: Darstellung des durchschnittlichen Fibroseanteils \pm SEM in % nach Genotyp

3.6 Ergebnisse der Protein-Expressionsuntersuchungen

Für die Untersuchungen wurde Herzmuskelgewebe des rechten Ventrikels verwendet. Ziel der Analyse war, Expressionsgrad und gegebenenfalls -unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der Isoformen der schweren Myosin-Kette zu untersuchen.

Bei der Untersuchung anhand von Coomassie-gefärbten Gelen wurden als Kontrolltiere Wildtyp-Mäuse (WT) desselben Zuchtstammes verwendet. Die Gruppengröße betrug jeweils $n=3$ Tiere. Die Untersuchungen ergaben eine qualitative Hochregulation des β -MHC-Anteils sowohl in der Gruppe der MLPHET-Tiere wie auch in der Gruppe der DKO-Tiere, wie in Abb. 3.26 zu sehen ist.

3. Ergebnisse

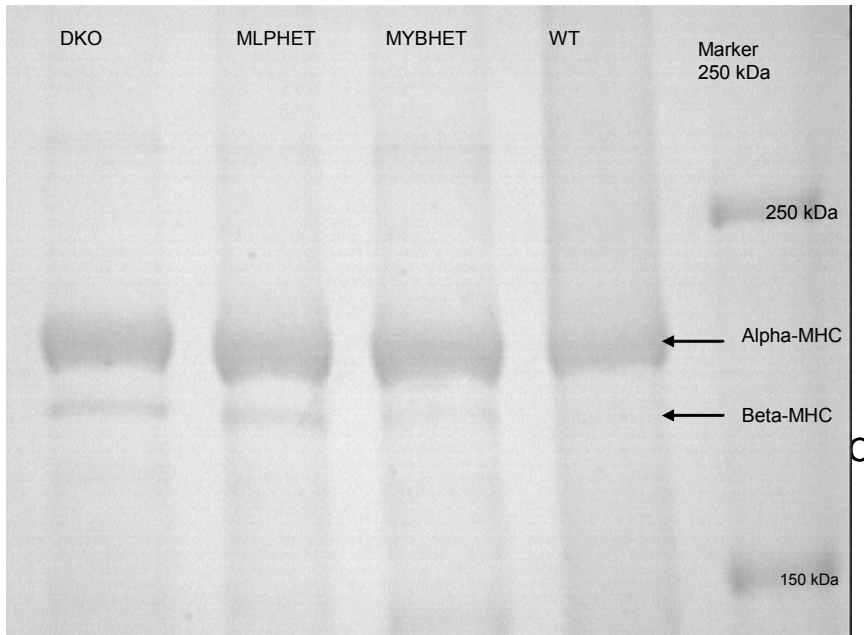


Abb. 3.26: Fotografie eines Coomassie-Gels mit Auftragung nach Genotypen. Es wurden jeweils 7,5 μg Protein aufgetragen. Deutlich sichtbare β -MHC-Bande in der Gruppe der DKO- und MLPHET-Tiere unterhalb der α -MHC-Bande.

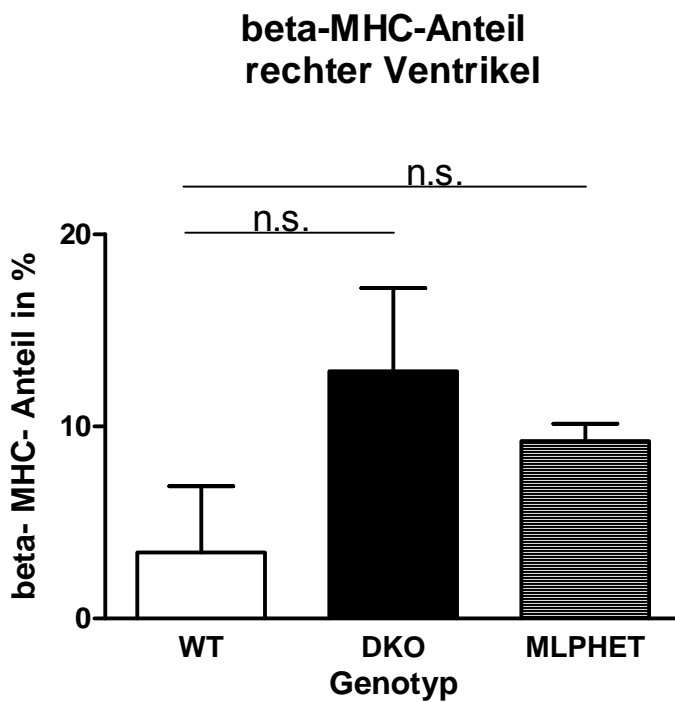


Abb. 3.27: Darstellung des β -MHC-Anteils am gesamten MHC in der densitometrischen Auswertung nach Genotypen in Prozent \pm SEM.

3. Ergebnisse

Die densitometrische Auswertung (Abb. 3.27) ergab für die WT-Tiere einen Anteil von $3,4 \pm 3,4\%$ β -MHC am gesamten MHC-Gehalt. Die Tiere der MLPHET-Gruppe zeigten einen β -MHC-Anteil von $9,2 \pm 0,9\%$ am gesamten MHC, während die DKO-Tiere einen Anteil von $12,9 \pm 4,3\%$ am gesamten MHC aufwiesen. Zwischen den Gruppen bestand – bei allerdings kleiner Gruppengröße – kein signifikanter Unterschied.

3.7 Versuche mit Skelettmuskelstreifen aus dem Zwerchfell

Schwere chronische Herzerkrankungen können mit einer Beeinträchtigung des Skelettmuskels einhergehen. Während MyBPc eine herzspezifische Isoform besitzt, die in unserem Modell ausgeknockt wurde und damit als mechanistische Ursache einer Beeinträchtigung der Skelettmuskulatur nicht in Frage kommt, ist MLP sowohl im Herz wie auch im Skelettmuskel vorhanden. Um einen potenziellen Einfluss einer MLP-Defizienz auf die Skelettmuskelfunktion zu untersuchen, wurden Zwerchfellmuskelstreifen auf ihre Tetanisierbarkeit und ihre Ermüdbarkeit getestet.

3.7.1 Tetanisierung der Skelettmuskelstreifen

Bei der Bestimmung der Tetanisierungskurve entwickelten die DHET-Tiere eine maximale Kraft von $72,98 \pm 3,13 \text{ mN/ mm}^2$ ($n=5$). Die maximale Kraftentwicklung in den MLPHET-Tieren ($71,38 \pm 6,11 \text{ mN/ mm}^2$; $n=13$) und den DKO-Tieren ($81,27 \pm 12,60 \text{ mN/ mm}^2$; $n=8$) unterschied sich davon nicht signifikant. Abb. 3.28 zeigt die Tetanisierungskurve nach Genotypen mit den absoluten Kräften.

3. Ergebnisse

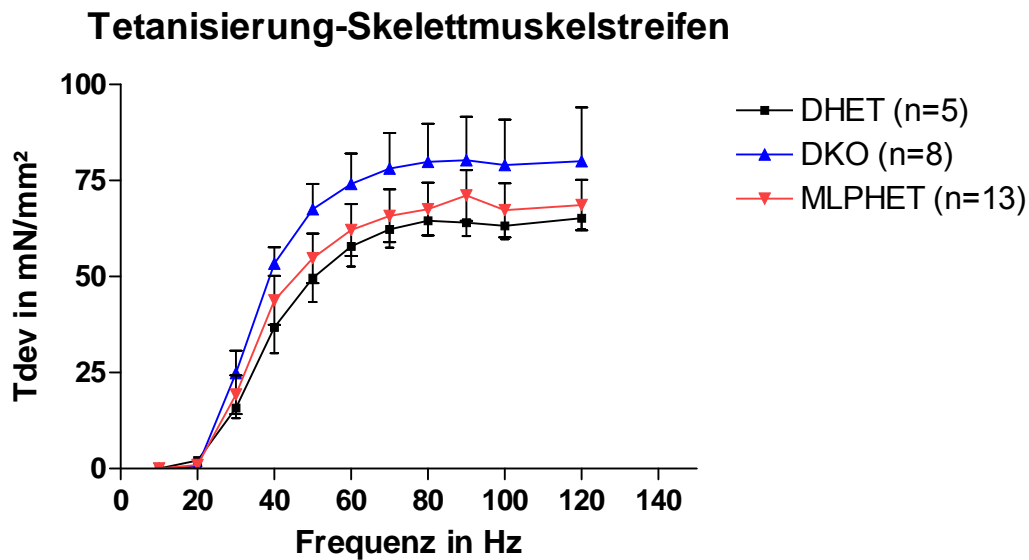


Abb. 3.28: Darstellung der Tetanisierungskurven nach Genotypen; abgebildet sind die absoluten Kräfte \pm SEM.

3.7.2 Ermüdungsresistenz der Skelettmuskelstreifen

In der Ermüdungsresistenzbestimmung zeigten die DHET-Tiere ausgehend von einer zu Anfang entwickelten Kraft von $74,59 \pm 7,09$ mN/mm² einen Abfall nach 100 Stimuli auf $26,84 \pm 1,42$ mN/mm² entsprechend 37% der Anfangskraft. Die MLPHET-Tiere fielen nach 100 Stimuli von $70,46 \pm 6,55$ mN/mm² auf $23,67 \pm 2,25$ mN/mm². Dies entspricht 34% der Anfangskraft. Ausgehend von $69,62 \pm 15,03$ mN/mm² fielen die DKO-Tiere auf $22,21 \pm 3,76$ mN/mm² ab, d. h. 32% der Anfangskraft. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant. Abb. 3.29 zeigt die auf die Ausgangskraft normalisierten Kurven nach Gruppen aufgetragen. Zwischen den Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Ermüdbarkeit festgestellt werden.

Zusammenfassend konnten bei den Untersuchungen der Skelettmuskelstreifen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

3. Ergebnisse

Ermüdungsresistenz-Skelettmuskelstreifen

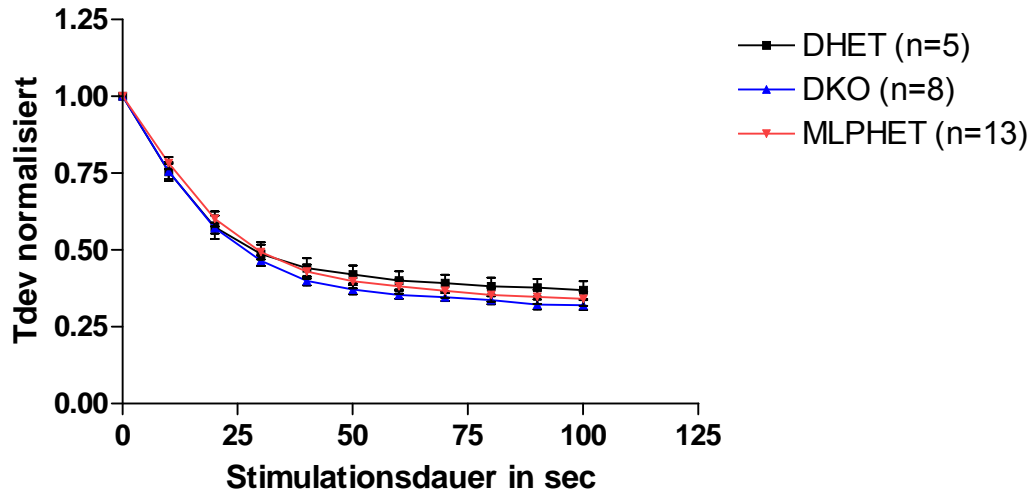


Abb. 3.29: Darstellung der Ermüdungskurven nach Genotypen; abgebildet sind die absoluten Kräfte \pm SEM.

4 Diskussion

4.1 Allgemeines

Herzinsuffizienz ist eine der häufigsten chronischen Krankheiten, von der allein in Deutschland etwa 3% der Bevölkerung in den alten Bundesländern betroffen sind (Eriksson 1995). In westlichen Industrienationen ist die koronare Herzkrankheit die häufigste Ursache für eine Herzinsuffizienz, dicht gefolgt von Kardiomyopathien als zweithäufigster Ursache (Cowie et al. 1999). Ein beträchtlicher Teil dieser Erkrankungen ist familiär bedingt und damit genetisch verursacht (Chien 2003). Durch diese Erkenntnis ist die Molekulargenetik in den letzten Jahren immer stärker in den Mittelpunkt der Forschung gerückt. Mittlerweile sind viele der krankheitsverursachenden Gene identifiziert.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Ausfall des Muscle-LIM-Proteins (MLP) und des herzspezifischen Myosin-Bindenden-Proteins (MyBPc). Dabei sind beim Menschen Mutationen im Bereich des MLP-Gens sowohl im Zusammenhang mit einer dilatativen (Knöll et al. 2002) als auch mit einer hypertrophen (Geier et al. 2003) Kardiomyopathie (DCM bzw. HCM) beschrieben worden. Mutationen im MyBPc-Gen sind beim Menschen für die Entwicklung einer familiären HCM äußerst relevant: In etwa 40% der Fälle einer familiären HCM wurde eine Veränderung in diesem Gen als Ursache der Erkrankung festgestellt (Richard et al. 2003).

Die Pathomechanismen, über die eine Mutation zur Krankheitsentstehung führt, sind noch kaum bekannt. So bleibt trotz der vorangegangenen Publikationen die Frage offen, wie die MyBPc-Defizienz zur Hypertrophie und die MLP-Defizienz vornehmlich zur Dilatation des Herzens führt.

4.2 Tiermodell

Die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Experimente wurden mit Mäusen durchgeführt, bei denen die Gene für MLP und/oder MyBPc entweder heterozygot vorlagen oder komplett ausgeschaltet waren. Verglichen wurden folgende drei Tiergruppen:

- MLP $^{-/-}$ und MyBPc $^{-/-}$, bezeichnet als Doppel-Knock-Out (DKO)
- MLP $+/-$ und MyBPc $^{-/-}$, bezeichnet als MLP-HETerozygote (MLPHET)
- MLP $+/-$ MyBPc $+/-$, bezeichnet als Doppel-HETerozygote (DHET).

Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, wie sich der zusätzliche Ausfall von MLP bei Vorliegen einer MyBPc-Defizienz in Mäusen auf die Herzfunktion auswirkt. Als Limitierung der Studie ist zu nennen, dass als Kontrollgruppe keine Wildtyp-Mäuse sondern DHET-Tiere verwendet wurden. Bei der Untersuchung der Phänotypen transgener Mausmodelle ist internationaler Standard, transgene Tiere mit Wildtyp-Geschwistertieren aus dem selben Wurf zu vergleichen. Daher wäre es auch im Rahmen dieser Studie ideal gewesen, Wildtyp-Geschwistermäuse aus dem selben Wurf als Kontrolltiere zu verwenden. Um diese zu erhalten, hätte man allerdings Mäuse verpaaren müssen, die bezüglich beider Merkmale (MLP- bzw. MyBPc-Defizienz) heterozygot sind. Dies hätte nach den Mendel'schen Verteilungsregeln dazu geführt, dass im Mittel nur 1/16 der Nachkommen dieser Verpaarungen der DKO-Gruppe angehört hätten und auch nur ein weiteres 1/16 Wildtyp-Mäuse gewesen wären. Angesichts von Wurfgrößen zwischen 2 und 8 Tieren, die wir bei den hier verwendeten knock-out Modellen beobachteten, wäre eine vergleichende Untersuchung von Geschwistermäusen aus dem selben Wurf ohnehin nur als Rarität möglich gewesen. Durch Zulassen der DHET-Tiere als „Kontrollen“ wurde es möglich, jeweils bezüglich eines Merkmals homozygote KO-Tiere zu verpaaren. Dadurch wurde diese Studie überhaupt erst realistisch umsetzbar. In Voruntersuchungen hatte sich gezeigt, dass die Gruppe der DHET-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen des selben genetischen Hintergrundstammes vernachlässigbare kardiale Auffälligkeiten aufwies. Daher erschien die Verwendung dieser Tiere als Kontrolltiere möglich.

Der Ausfall von MLP beziehungsweise MyBPc im Mausmodell ist bereits mehrfach in Publikationen beschrieben. Dabei führte der Verlust des Gens für MLP in Mäusen in vorangegangenen Studien zu einer DCM mit Herzinsuffizienz, die durch eine Dilatation aller Herzkammern gekennzeichnet war. In einer ersten Studie entwickelten etwa 50-70%

4. Diskussion

der Mäuse einen frühen Phänotyp und verstarben bereits 20-30 Stunden nach Geburt (Arber et al. 1997). Diejenigen Mäuse, die diese frühe Phase überlebten, zeigten eine strukturelle Störung in der Anordnung der Kardiomyozyten sowie einen Abfall bei der Reaktion auf hochfrequente Stimulation der Gliedergürtelmuskulatur (Arber et al. 1997, Knöll et al. 2002).

MLP wurde als essenzieller Regulator der Myogenese beschrieben (Arber et al. 1994). Es wurde jedoch auch postuliert, dass MLP eine zentrale Funktion bei der Rezeption von Dehnungsreizen und deren Umwandlung in Wachstumsreaktionen der Herzmuskelzellen einnehmen könnte (Knöll et al. 2002). Dies basierte auf Untersuchungen an isolierten neonatalen Herzmuskelzellen von MLP-defizienten Mäusen: Während sich in Zellen aus Wildtyp-Mäusen nach 24-stündiger Dehnung auf einer Silikonmembran eine starke Induktion des molekularen Hypertrophiemarkers Brain-Natriuretic-Peptide (BNP) fand, war diese Reaktion in Zellen aus MLP-knock-out-Mäusen nicht nachweisbar. Wurden die neonatalen Herzmuskelzellen jedoch nicht mechanisch stimuliert sondern verschiedenen neuro-humoralen Hypertrophiestimuli ausgesetzt (Inkubation in Gegenwart des Botenstoffs Endothelin-1 oder des α_1 -adrenergen Agonisten Phenylephrin), so reagierten Wildtyp- und MLP-knock-out-Zellen gleichermaßen mit einer Hochregulation des molekularen Hypertrophiemarkers BNP. Daraus wurde geschlossen, dass MLP-Defizienz zu einer Beeinträchtigung der biomechanischen Reizverarbeitung, nicht jedoch zu einer generellen Blockade der pro-hypertrophen Signaltransduktion in der Herzmuskelzelle führt (Knöll et al. 2002).

Der Verlust des Gens für die herzspezifische Form von MyBPc bei der Maus führte in vorangegangenen Studien zu einer HCM (Harris et al. 2002, Carrier et al. 2004). Die Autoren fanden dabei eine eingeschränkte systolische und diastolische Herzfunktion bei den homozygoten Tieren. Darüber hinaus berichteten Harris et al. (2002) über eine verminderte Calcium-Sensitivität der Herzmuskelzellen. Die heterozygoten Tiere entwickelten ebenfalls eine Hypertrophie, vor allem des Kammerseptums, allerdings ohne eine erkennbare linksventrikuläre Funktionseinschränkung (Carrier et al. 2004). In weiteren Studien wurde – im Gegensatz zu dem Bericht von Harris et al. (2002) – über eine erhöhte Calcium-Sensitivität in permeabilisierten Herzmuskelzellen von Mäusen im ungedehnten Zustand berichtet (Cazorla et al. 2006). In Herzmuskelzellen von Ratten führte eine Abnahme der MyBPc-Konzentration ebenfalls zu einer Zunahme der Calcium-Sensitivität (Hofmann et al. 1991). Ungeklärt blieb jedoch, über welche Mechanismen die MyBPc-Defizienz zur Ausprägung der Hypertrophie führt.

4. Diskussion

Aufgrund der geschilderten Studien und der Unverzichtbarkeit von MLP für die Entwicklung einer biomechanisch induzierten Herzhypertrophie lag die Frage nahe, wie sich die MyBPc-Defizienz – die wie beschrieben in abgesehen davon genetisch unauffälligen Mäusen zu einer HCM führt – dann auswirkt, wenn mit MLP ein zentraler Mediator biomechanisch vermittelter Hypertrophiestimuli gleichfalls fehlt. Handelt es sich bei der Hypertrophie der MyBPc-defizienten Maus um einen günstigen Kompensationsmechanismus, so wäre vorstellbar, dass infolge des begleitenden MLP-Knockouts diese Kompensationsmöglichkeit entfällt und es unter Umgehung der Hypertrophieentwicklung zu einer raschen Herzdilatation und stärkeren Beeinträchtigung der Mäuse kommt. Hat hingegen die Herzhypertrophie der MyBPc-defizienten Maus per se Krankheitswert, so könnte sich eine abgeschwächte Hypertrophieentwicklung aufgrund des begleitenden MLP-Knockouts günstig auswirken.

Zur Klärung dieser Frage wurden die Mäuse in vivo echokardiographisch untersucht. Darüber hinaus wurden in vitro Experimente mit ventrikulären Muskelstreifenpräparaten, Muskelstreifenpräparaten aus dem Zwerchfell und Gewebeschnitten der Herzspitze von Mäusen durchgeführt.

4.3 Beurteilung und Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Echokardiographie und makroskopische Auffälligkeiten

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Mäuse wurden nach Mendel'scher Verteilung geboren und erreichten regelmäßig das Erwachsenenalter. Keines der ausgefallenen Gene scheint also für die Lebensfähigkeit essentiell zu sein.

In der Echokardiographie zeigten sowohl die MLPHET- als auch die DKO-Tiere gegenüber den DHET-Tieren deutlich erweiterte Herzkammern mit kontraktile Funktionseinschränkung sowie hypertrophierten Herzwänden, also den Phänotyp einer kombinierten hypertrophen und dilatativen Kardiomyopathie mit Insuffizienzzeichen. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den vorbeschriebenen Studien sowohl von Arber et al. (1997) und Knöll et al. (2002) mit der Entwicklung einer DCM bei MLP-Verlust als auch von Harris et al. (2002) und Carrier et al. (2004) mit der Entwicklung einer HCM bei MyBPc-Verlust. Die Herzvergrößerung war bereits makroskopisch erkennbar, wobei die Gruppe der DKO-Tiere gegenüber der Gruppe der MLPHET-Tiere keine stärkere Beeinträchtigung der in-vivo-Herzfunktion oder in-vivo-Herzmorphologie aufwies. Auch die

4. Diskussion

Bestimmung der Herzgewichte gab keinen Hinweis auf mögliche Unterschiede zwischen MLPHET- und DKO-Mäusen. Ob sich während der Lebensspanne der Mäuse die Herzhypertrophie und -dilatation gleichzeitig entwickeln oder eine der beiden Kardiomyopathieformen zunächst dominiert und die andere nachfolgt, konnte im Rahmen dieser Studie nicht geklärt werden, da keine Mehrfachuntersuchung der Tiere in unterschiedlichem Alter im Längsschnitt erfolgte.

4.3.2 Intakte multizelluläre Muskelstreifen

Da sich in den spontan schlagenden Herzen in vivo keine Unterschiede zwischen MLPHET- und DKO-Mäusen zeigten, wurden isolierte intakte multizelluläre Muskelstreifen aus den rechten Ventrikeln der Mäuse im Organbad untersucht. In vivo wird die kontraktile Funktion des Herzens neben den intrinsischen Eigenschaften des Herzens maßgeblich von den hämodynamischen Bedingungen im Organismus (Vor- und Nachlast) und der neuro-humoralen Stimulation (beispielsweise durch die Sympathikusaktivität) mitbestimmt. Diese können durch eine Genmodifikation indirekt verändert sein und somit zu einer systematischen Verzerrung führen, die feine Unterschiede zwischen den hier untersuchten Maus-Genotypen hinsichtlich der kontraktilen Eigenschaften des Herzens maskieren könnte. Die Untersuchung isolierter Muskelstreifen im Organbad ermöglicht es dem Experimentator dagegen, die Umgebungsbedingungen für alle Präparate konstant zu halten. Daher spielen solche möglicherweise verzerrenden Faktoren aus der in-vivo Situation bei isolierten Herzmuskelpräparaten keine Rolle, und subtile Funktionsunterschiede können leichter nachgewiesen werden.

4.3.2.1 Kraft-Frequenz-Beziehung

Gao et al. (1998) zeigten, dass isolierte rechtsventrikuläre Trabekel aus den rechten Ventrikeln von Mäusen eine deutlich positive Kraft-Frequenz-Beziehung aufweisen. Redel et al. (2002) berichteten zwar von einer flachen bis negativen Kraft-Frequenz-Beziehung im Mausmyokard. Allerdings wurden in jener Studie linksventrikuläre Papillarmuskeln untersucht. Eine mögliche Erklärung für diese funktionelle Diskrepanz zwischen rechts- und linksventrikulären Muskelstreifen liegt in der Dicke der Präparate: LV-Papillarmuskeln sind typischerweise erheblich dicker als rechtsventrikuläre Trabekel oder Papillarmuskeln.

4. Diskussion

Angesichts der hohen metabolischen Aktivität des Mausmyokards kommt es bei höherfrequenter Kontraktion zu einer raschen Akkumulation von negativ inotrop wirkenden Stoffwechselendprodukten wie H^+ -Ionen und anorganischem Phosphat (P_i), die bei Frequenzsteigerung einem Anstieg der Kontraktilität entgegenwirken, wenn sie nicht sofort durch Diffusion eliminiert werden. Isolierte Muskelstreifenpräparate im Organbad werden nicht vaskulär perfundiert sondern können Stoffaustausch nur durch Diffusion über die Oberfläche des Präparats betreiben. Daher ist in Mauspräparaten ab einer Dicke von ca. 300 μm die Kraftentwicklung im Organbad nicht zuverlässig beurteilbar. Linksventrikuläre Präparate mit einer Dicke von 500 – 800 μm können – wenn überhaupt – nur unter artifiziellen Bedingungen (unphysiologisch niedrige Temperatur und Ca^{2+} -Konzentration) untersucht werden.

In Übereinstimmung mit Gao et al. (1998) zeigten die rechtsventrikulären Trabekel der in der vorliegenden Arbeit als Kontrolltiere eingesetzten DHET-Mäuse eine positive Kraft-Frequenz-Beziehung, also einen normalen Phänotyp. Dies rechtfertigt die Nutzung der DHET-Mäuse als Kontrollgruppe in dieser Studie. Dagegen verlief die Kraft-Frequenz-Kurve der MLPHET-Tiere negativ, während die der DKO-Tiere einen flachen Verlauf nahm. Eine Abflachung bzw. Negativierung der im Normalfall positiven Kraft-Frequenz-Beziehung ist in mehreren Spezies – und nicht zuletzt beim Menschen – als typisches Merkmal des insuffizienten Myokards beschrieben worden (Mulieri et al. 1992, Hasenfuss et al. 1994a). Der inotrope Effekt einer Frequenzsteigerung beruht auf einer Zunahme der während der Systole aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) freigesetzten Menge an Ca^{2+} -Ionen. Für einen adäquaten frequenzabhängigen Anstieg der Kraftentwicklung ist daher eine regelrechte SR-Calciumwiederaufnahme- und -speicherfunktion unabdingbar. Im insuffizienten Myokard ist diese – wie in Abschnitt 1.3.2, S.6, beschrieben – aufgrund von Expressionsveränderungen von in die Ca^{2+} -Homöostase involvierten Proteinen beeinträchtigt.

Die Kraft-Frequenz-Beziehung fiel in den Präparaten aus MLPHET-Mäusen signifikant steiler ab als in denjenigen aus DKO-Tieren. Damit war ein für eine Herzinsuffizienz charakteristischer Phänotyp in den MLPHET-Tieren stärker ausgeprägt als in den DKO-Tieren. Physiologisch stellt der frequenzabhängige Kraftanstieg einen wesentlichen Mechanismus zur Anpassung der Pumpleistung des Herzens an einen gesteigerten Bedarf – etwa in einer Kampf- oder Fluchtsituation – dar. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die kontraktile Herzfunktion in DKO-Tieren möglicher Weise besser erhalten ist als in MLPHET-Tieren.

4. Diskussion

4.3.2.2 Post-Pausen-Verhalten

Die Untersuchung des Post-Pausen-Verhaltens erfolgte ebenfalls als ein Test für die Speicherkapazität des SR (Bers 1985). In allen drei untersuchten Maus-Genotypen fand sich eine klare Potenzierung: Die erste Kontraktion nach einer Unterbrechung der elektrischen Feldstimulation war erheblich kräftiger als der Durchschnittswert der letzten Kontraktionen vor Unterbrechung der Stimulation. Dabei nahm die Potenzierung mit wachsender Pausendauer weiter zu. Weder bei den MLPHET-Tieren noch bei den DKO-Tieren unterschied sich die Potenzierung signifikant von derjenigen der als Kontrollgruppe verwendeten DHET-Mäuse. Allerdings zeigte sich in den Präparaten aus MLPHET-Tieren eine geringfügig aber signifikant stärkere Potenzierung als in denjenigen aus DKO-Tieren.

Für das Post-Pausen-Verhalten entscheidend ist, wie ausgeprägt ein möglicher transsarkolemmaler Ca^{2+} -Verlust während der Stimulationspause ist. Während der Stimulationspause kommt es stochastisch zu vereinzelt Öffnungsereignissen von Ryanodin-Rezeptoren mit geringfügiger Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR. Die freigesetzten Ca^{2+} -Ionen können durch die SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA) unmittelbar wieder ins SR zurückgepumpt werden oder aber durch den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) nach extrazellulär transportiert werden. In Spezies, bei denen für die Ca^{2+} -Elimination während der Diastole der NCX von größerer Relevanz ist als bei der Maus (siehe Abschnitt 1.5, S. 13) kann der transsarkolemmale Ca^{2+} -Verlust während einer Stimulationspause so ausgeprägt sein, dass keine Post-Pausen-Potenzierung sondern sogar eine Post-Pausen-Abnahme resultiert.

In der Maus ist der NCX jedoch von weit geringerer Bedeutung für die Ca^{2+} -Elimination (Li et al., 1998). Daher ist unklar, ob in der Maus überhaupt Situationen vorstellbar sind, in denen es zu einer Verminderung der Post-Pausen-Potenzierung kommen kann. Publikationen hierzu mit Herzmuskelstreifen aus Mäusen sind nicht bekannt. Crozatier et al. (2002) beschrieben lediglich in Myozyten von Wildtyp-Mäusen eine positive Post-Pausen-Potenzierung. Inwieweit der hier beschriebene geringe aber statistisch signifikante Unterschied im Ausmaß der Post-Pausen-Potenzierung zwischen MLPHET-Mäusen und DKO-Mäusen biologisch relevant ist, kann nicht beurteilt werden.

4. Diskussion

4.3.2.3 Isoprenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurve

Die Betrachtung der Kontraktionsantwort nach inotroper Stimulation mit Isoprenalin ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konzentrations-Wirkungs-Kurven der drei untersuchten Maus-Genotypen. Zumindest im Vergleich zu den hier als Kontrollgruppe verwendeten DHET-Mäusen scheint eine deutliche Abnahme der Konzentration von β -Adrenorezeptoren auf den Herzmuskelzellen demnach nicht vorzuliegen. Im menschlichen Myokard wurde bei Herzinsuffizienz eine Herunterregulation β -adrenerger Rezeptoren beschrieben (Bristow et al. 1986, Böhm et al. 1988). In isolierten Maus-Kardiomyozyten wurde unter elektrischer Dauerstimulation von einer Abnahme der β -Adrenozeptoren berichtet (Drvota et al. 1995).

In MLP-defizienten Mäusen wurde von (Arber et al. 1997) bei hämodynamischen Druckmessungen in vivo eine fehlende Antwort auf β -adrenerge Stimulation mit Dobutamin beschrieben. Darüber hinaus zeigten Brickson et al. (2007) auch in MyBPC-defizienten Mäusen in vivo eine fehlende Ansprechbarkeit durch einen β -adrenergen Stimulus. Im Gegensatz dazu zeigten die hier vorgestellten isolierten intakten multizellulären Muskelstreifen im Organbad unabhängig vom Genotyp eine ausgeprägte Zunahme der Kraftentwicklung infolge β -adrenerger Stimulation. Hier liegt demnach eine offensichtliche Diskrepanz zwischen in vivo-Befunden anderer Arbeitsgruppen an MLP- bzw. MyBPC-knockout Mäusen und den in vitro-Befunden aus dieser Arbeit vor.

In vivo unterliegt das Herz dem Einfluss des endogenen Sympathikus. In Tiermodellen der Herzinsuffizienz (beispielsweise nach transversaler Aortenkonstriktion – TAC) wurde gezeigt, dass die Entwicklung einer Herzhypertrophie bzw. -insuffizienz mit einer generalisierten adrenergen Aktivierung einher geht (Ganguly et al. 1989). Daher ist anzunehmen, dass bei den oben genannten in vivo-Untersuchungen an MLP-knockout-Mäusen (Arber et al. 1997) und MyBPC-knockout-Mäusen (Brickson et al. 2007) bereits vor der pharmakologischen Intervention hohe endogene Katecholamin-Serumspiegel zu einer zumindest partiellen Sättigung der β -adrenergen Rezeptoren und somit inotropen Stimulation geführt hatten. Wenn dann während des Experimentes exogen ein β -adrenerger Agonist zugeführt wird, ist das Ausbleiben einer darüber hinaus gehenden inotropen Antwort in einem Modell mit einem schwerwiegenden kardialen Phänotyp nicht überraschend. In den hier durchgeführten Untersuchungen an isolierten Muskelstreifen im Organbad waren die Präparate, wie unter 4.3.2, S. 81, beschrieben, dem Einfluss des endogenen vegetativen Nervensystems entzogen. Eventuell unmittelbar nach der

4. Diskussion

Präparation noch an β -adrenerge Rezeptoren im Gewebe gebundene endogene Agonisten wurden im Verlauf des Experimentes ausgewaschen. Daher traf das im Experiment zur inotropen Stimulation eingesetzte Isoprenalin auf unbesetzte β -adrenerge Rezeptoren und konnte maximale pharmakologische Effekte auslösen. Diese Befunde legen nahe, Ergebnisse aus der in-vivo-Anwendung von β -adrenergen Agonisten in Tiermodellen mit einem ausgeprägten kardialen Phänotyp zurückhaltend zu beurteilen.

4.3.3 Permeabilisierte Herzmuskelstreifen (Skinned Fibers)

4.3.3.1 Calcium-Aktivierung

Mithilfe der permeabilisierten Herzmuskelstreifen wurde die Ansprechbarkeit der Myofilamente durch unterschiedliche Ca^{2+} -Konzentrationen untersucht. Hierbei zeigte sich eine Abhängigkeit der Calcium-Sensitivität vom MyBPc-Genotyp. Die Gruppen mit homozygoter MyBPc-Defizienz, also die DKO- und die MLPHET-Tiere, zeigten gegenüber den Kontrolltieren eine Linksverschiebung der sigmoidalen Ca^{2+} -Aktivierungskurve. Demnach reichte eine geringere Ca^{2+} -Ionenkonzentration aus, um eine Kontraktionsantwort auszulösen, entsprechend einer erhöhten Calcium-Sensitivität.

Diese Ergebnisse stimmen mit vorangegangenen Studien sowohl an ungedehnten Einzelmyozyten der MyBPc-knockout-Maus (Cazorla et al. 2006) als auch von Ratten und Hasen nach partieller Extraktion von MyBPc (Hofmann et al. 1991) überein. Auch Witt et al. (2001) fanden eine Zunahme der Calcium-Sensitivität in einem Mausmodell mit knock-in eines am N-Terminus mutierten MyBPc-Gens. Dagegen fanden Harris et al. (2002) eine Abnahme der Calcium-Sensitivität bei permeabilisierten isolierten Kardiomyozyten aus MyBPc-defizienten Mäusen. Molekularbiologisch stimmt das in dieser Studie verwendete MyBPc-knockout-Modell mit demjenigen der Gruppe von L. Carrier (Cazorla et al. 2006) überein: Wie in Abschnitt 1.6.4, S. 17, beschrieben sind hier die beiden Exons 1 und 2 mit dem Transkriptionsursprung deletiert. Daher wird in diesem Fall auch kein N-terminal trunkeiertes MyBPc gebildet. Im Gegensatz dazu sind beim MyBPc-knockout-Modell der Gruppe von R. Moss (Harris et al. 2002, Harris et al. 2004) die Exons 3–10 durch eine Neomycin-Resistenzkassette ersetzt und der Transkriptionsursprung ist erhalten. Somit kann prinzipiell noch ein Proteinfsegment generiert werden, und es besteht die Möglichkeit, dass dieses im Sinne eines „poison peptides“ zu Funktionsstörungen der

4. Diskussion

Zelle führen könnte (Schwartz 1995, Sarikas et al. 2005). Diese Möglichkeit wird durch die Beobachtung von Witt et al. (2001) unterstrichen, die in einem Mausmodell mit Knock-in eines N-terminal verkürzten MyBPc eine erhöhte Calcium-Sensitivität fanden. Es scheint, als ob der N-Terminus des Proteins für sich genommen die Calcium-Sensitivität senkt, sodass bei Verbleib dieses Segments – wie im Modell von Harris et al. (2002) und Harris et al. (2004) möglich – eine reduzierte Calcium-Sensitivität gefunden wird.

Eine aus der Mutation oder der Defizienz von MyBPc resultierende erhöhte Calcium-Sensitivität mit Hyperkontraktilität der Myozyten ist als Erklärungsmodell für die Entstehung einer HCM diskutiert worden (Witt et al. 2001). Auch andere Mutationen myofilamentärer Proteine, wie die des kardialen Troponins I (cTnI), gehen mit einer Hyperkontraktilität auf dem Boden einer gesteigerten Calcium-Sensitivität einher und verursachen eine HCM (James J et al. 2000).

4.3.3.2 Ruhe-Dehnungs-Kurve

Die passiv-mechanischen Eigenschaften der permeabilisierten Muskelstreifen der drei Maus-Genotypen zeigten bei Dehnung und Entdehnung keine signifikanten Unterschiede. Allerdings war die Präparation der Streifen der DKO- und der MLPHET-Tiere durch die ungeordnete Myokardstruktur deutlich erschwert. Neben dieser strukturellen Unordnung im Myozyten-Verband berichteten Carrier et al. (2004) auch über eine Zunahme der Fibrose in MyBPc-defizienten Mäusen. Dies trifft gleichermaßen auch für MLP-defiziente Mäuse zu (Arber et al. 1997).

Zu den passiv-mechanischen Eigenschaften des Herzmuskels bei Dehnung trägt einerseits die intrinsische Elastizität der Kardiomyozyten bei. In permeabilisierten Herzmuskelstreifen in Relaxationslösung ist die Konzentration an freien Ca^{2+} -Ionen praktisch mit Null gleichzusetzen. Daher sind keine Myosinquerbrücken an Aktin gebunden, die Sarkomere entspannt, und die Elastizität des sarkomerischen Riesenproteins Titin bestimmt hauptsächlich diesen intrinsischen Anteil der Dehnbarkeit. Andererseits tragen extrinsische Strukturen, beispielsweise die elastischen Filamente und Kollagenfibrillen der extrazellulären Matrix, zu den passiv-mechanischen Eigenschaften des Gewebes bei. Makarenko et al. (2004) beschrieben bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie in den Herzmuskelzellen eine Veränderung in der Zusammensetzung der Titin-Isoformen: Kürzere (steifere) Titin-Isoformen wurden durch längere (dehnbarere) Titin-Isoformen ersetzt. Es wurde diskutiert, dass bei Vorliegen einer ausgeprägten

4. Diskussion

Fibrose mit Versteifung der extrazellulären Matrix, wie sie bei herzinsuffizienten Patienten regelhaft vorliegt, die intrinsische Elastizität der Kardiomyozyten an Relevanz verlieren könnte (Makarenko et al., 2004).

Falls dies auch im genetischen Kardiomyopathie-Modell der Maus zutrifft, kann aus der Beobachtung vergleichbarer passiv-mechanischer Eigenschaften von permeabilisierten Muskelstreifen aus den drei in dieser Studie untersuchten Maus-Genotypen nicht geschlossen werden, dass die intrinsische Elastizität der Kardiomyozyten vergleichbar ist. Knöll et al. (2002) führten Experimente zur passiven Dehnbarkeit isolierter Papillarmuskeln von MLP-knockout-Mäusen durch und beobachteten, dass MLP-defizientes Myokard eine größere passive Dehnbarkeit (Compliance) aufwies als Wildtyp-Myokard. In dieser Arbeit wurde allerdings Myokard aus Mäusen im Alter von zwei Wochen untersucht. Der Fibrosegrad des Gewebes wurde von Knöll et al. (2002) leider nicht berichtet. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die Herzen der juvenilen Mäuse noch keine wesentliche Fibrosierung aufwiesen.

Im Gegensatz dazu wurden in dieser Studie weit ältere Mäuse untersucht, die bereits eine substanzielle Myokardfibrose entwickelt hatten. Es ist anzunehmen, dass aufgrund der Fibrose mögliche subtile Unterschiede in den intrinsischen passiv-mechanischen Eigenschaften maskiert wurden und daher nicht nachweisbar waren.

4.3.4 Histologische und immunhistologische Untersuchungen

Die histologische Untersuchung ergab eine signifikant höhere Fibrosierung im Myokard der DKO- und der MLPHET- Tiere im Vergleich zu den DHET-Mäusen. Der mittlere Fibroseanteil war in den DKO-Tieren höher als in den MLPHET-Tieren, doch erreichte dieser Unterschied keine statistische Signifikanz. Dieses Ergebnis ist schwer mit den vergleichbaren passiv-mechanischen Eigenschaften der permeabilisierten Muskelstreifen aus linksventrikulären Papillarmuskeln (siehe Abschnitt 4.3.3.2) in Einklang zu bringen. Ausgehend von diesem Befund hätte man in allen drei untersuchten Genotypen einen vergleichbaren Fibrosegrad erwartet. Hier ist möglicherweise bedeutsam, dass die Kontrollgruppe der DHET-Tiere keine Wildtyp-Kontrolle war. Carrier et al. (2004) zeigten eine Myokardhypertrophie in heterozygoten MyBPC-knockout-Mäusen, wenngleich ohne linksventrikuläre Funktionseinschränkung. Daher ist es möglich, dass die DHET-Tiere im Vergleich zu einer Wildtyp-Kontrolle bereits einen gesteigerten Fibrosegrad aufwiesen,

4. Diskussion

was im Rahmen dieser Studie jedoch nicht untersucht wurde. Eine weitere mögliche Erklärung für die Diskrepanz liegt in der Lokalisation des jeweils untersuchten Gewebes: Die Myokardproben für die histologische Untersuchung wurden aus der Ventrikelspitze entnommen, wo wenig parallelfaseriges Gewebe vorliegt, während die Präparate für die Permeabilisierung longitudinalen Schnitten aus den linksventrikulären Papillarmuskeln entsprachen, wo eine weitgehend parallele Anordnung der Myozyten vorliegt. Daher könnte es strukturelle Unterschiede zwischen den histologisch untersuchten und den biomechanisch untersuchten Präparaten geben.

Bei der Evaluation des zellulären Hypertrophiegrades durch Bestimmung der Zelldurchmesser zeigten die Mäuse der DHET-Gruppe den geringsten Durchschnittswert. Im Vergleich dazu war eine deutliche Hypertrophie der Myozyten sowohl der MLPHET- als auch der DKO-Tiere festzustellen. Dieser Befund stimmt mit den Beschreibungen der MLP-defizienten Tiere durch Arber et al. (1997) und Knöll et al. (2002) sowie der MyBPC-defizienten Tiere durch Harris et al. (2002) und Carrier et al. (2004) überein. Die MLPHET-Tiere wiesen einen signifikant größeren Myozytendurchmesser als die DKO-Tiere auf. Die Hypertrophie scheint also bei zusätzlichem Ausfall von MLP schwächer auszufallen als bei ausschließlicher MyBPC-Defizienz. Grund hierfür könnte die von Knöll et al. (2002) postulierte Rolle von MLP in einem Dehnungs-Sensor-Komplex sein (siehe Abschnitt 4.2, S. 78). Der Befund ist auch konsistent mit der Beobachtung von Heineke et al. (2003): Sie reduzierten mithilfe eines Antisense-Oligonukleotid-Ansatzes die MLP-Expression in isolierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten und fanden daraufhin eine abgeschwächte zelluläre Hypertrophieantwort auf Hypertrophie-induzierende Stimuli.

4.3.5 Proteinuntersuchungen

Bei Hypertrophie des Herzens findet eine Reaktivierung eines fetalen Genexpressionsprogramms statt, infolge derer es unter anderem zu einer vermehrten Synthese der schweren β -Myosin-Kette (β -MHC) kommt (Chien et al. 1993, Hoit et al. 1995). In dieser Studie wurde die β -MHC-Expression qualitativ mit Hilfe Coomassiegefärbter Gele evaluiert. Der mittlere β -MHC-Gehalt war in den MLPHET- und DKO-Tieren tendenziell höher als in den DHET-Mäusen und wiederum in den DKO-Tieren höher als in den MLPHET-Tieren. Aufgrund der signifikanten Unterschiede in den Myozytendurchmessern hätte man erwartet, dass der β -MHC-Gehalt in den MLPHET-

4. Diskussion

Mäusen höher als in den DKO-Mäusen sein sollte. Aufgrund der geringen Gruppengrößen (von jedem Genotyp wurden lediglich Proben aus drei Herzen analysiert) waren die Unterschiede jedoch statistisch nicht signifikant und die Beobachtung ist nicht zuverlässig genug, dass man Schlussfolgerungen daraus ziehen könnte.

4.3.6 Diaphragmale Skelettmuskelstreifen

Bei der Untersuchung der Skelettmuskelstreifen aus dem Zwerchfell waren keine funktionellen Unterschiede zwischen den drei untersuchten Gruppen feststellbar. Dies betrifft sowohl die maximale Kraftentwicklung unter Tetanisierung als auch das Verhalten in einem Ermüdungstest. MLP wird in allen quergestreiften Muskeltypen exprimiert, also auch im Skelettmuskel. Arber et al. (1997) beschrieben eine Beeinträchtigung der Skelettmuskulatur bei MLP-defizienten Mäusen in Form eines Dekrements evozierter Motorpotenziale bei schneller Stimulation. Diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit nicht reproduziert werden.

Dies lag möglicherweise daran, dass in dieser Arbeit mit dem Zwerchfell ein Muskeltyp untersucht wurde, der langsame Typ-1-Fasern und schnelle Typ-2-Fasern in etwa ausgewogenen Proportionen enthält, während Arber et al. (1997) für ihre Untersuchungen Ableitungen vom M. gastrocnemius machten, der vorwiegend schnelle Typ-2-Fasern enthält. Darüber hinaus nutzten Arber et al. (1997) in-vivo-Ableitungen evozierter Motorpotenziale und registrierten daher nicht die mechanische Kontraktionsantwort, während in dieser Studie biomechanische Messungen am isolierten Muskelstreifenpräparat unter elektrischer Feldstimulation vorgenommen wurden. Aus diesen Gründen sind die Untersuchungsmodelle so wenig vergleichbar, dass es problematisch ist, vergleichende Schlussfolgerungen zu ziehen.

4.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

In der hier vorliegenden Arbeit wurden erstmals die Auswirkungen des zusätzlichen Ausfalls von MLP in MyBPc-defizienten Mäusen auf die Herzfunktion in vivo und in vitro untersucht. Die DHET-Mäuse zeigten keine erkennbaren krankhaften Veränderungen und konnten daher als Kontrollgruppe verwendet werden. Im Vergleich dazu wiesen sowohl die MLPHET- als auch DKO-Tiere in vivo, makroskopisch und in-vitro klare Zeichen einer Herzinsuffizienz auf: Echokardiographisch waren erweiterte Herzkammern, hypertrophierte Herzwände und eine reduzierte Pumpfunktion nachweisbar; isolierte Muskelstreifen zeigten eine abgeflachte bzw. negative Kraft-Frequenz-Beziehung; histologisch ließ sich eine deutliche Fibrose und zelluläre Hypertrophie nachweisen. Dazu passend zeigten die Tiere der Gruppen MLPHET und DKO eine qualitative Hochregulation von β -MHC.

Der Vergleich der DKO-Mäuse mit den MLPHET-Mäusen macht deutlich, dass die zusätzliche MLP-Defizienz nicht zu einer Zunahme der funktionellen Beeinträchtigungen führt. Im Gegenteil zeigte sich sogar eine tendenziell bessere Herzfunktion der DKO-Tiere mit einer signifikant besseren Kraft-Frequenz-Beziehung und einer signifikant niedrigeren Hypertrophie. Somit führt die Kombination einer mit HCM einher gehenden genetischen Intervention (MyBPc-Knockout) mit einer Intervention, die eine DCM hervorruft (MLP-Knockout) offenbar nicht zu einer fatalen Beschleunigung der Entwicklung einer Herzinsuffizienz.

Ziel dieser Studie war primär eine Beschreibung des kardialen Phänotyps von Mäusen mit einem kombinierten MLP-/MyBPc-Knockout. Um aus den Ergebnissen dieser Studie Erkenntnisse zu den molekularen Entstehungsmechanismen der Herzinsuffizienz ableiten zu können, sind weiterführende Untersuchungen erforderlich. Diese sollten beispielsweise evaluieren, ob bekannte Signaltransduktionswege der Herzhypertrophie in den hier betrachteten genetischen Kardiomyopathiemodellen differenziell aktiviert werden. Erste Befunde aus mRNA-Expressionsanalysen mittels realtime-PCR, die in der Arbeitsgruppe Kardiovaskuläre Molekulargenetik (Prof. Dr. med. Knöll) vorgenommen wurden, zeigen sowohl in der DKO-Gruppe als auch der MLPHET-Gruppe eine signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöhte mRNA-Expression des molekularen Hypertrophiemarkers BNP. Auch die Expression des endogenen Calcineurin-Inhibitors Modulatorisches Calcineurin-Interagierendes Protein (MCIP) ist gesteigert. Laut Lemmens et al. (2007) ist MCIP bei Hypertrophie erhöht und limitiert die weitere Entwicklung einer Hypertrophie (Rothermel et

4. Diskussion

al. 2001). DKO-Mäuse zeigten signifikant höhere MCIP-mRNA-Expressionswerte als die MLP^{HET}-Tiere. Dies könnte wiederum einen Mechanismus für die signifikant niedrigere Hypertrophie der DKO-Tiere darstellen.

Im Falle des MLP-Knock-Out-Modells der Maus sind so genannte Rettungsmutationen beschrieben: So konnten Minamisawa et al. (1999) in MLP-knockout Mäusen durch den Ausfall von Phospholamban (PLB) als Inhibitor der SERCA eine regelrechte elektromechanische Kopplung mit normaler Herzfunktion wieder herstellen. Ebenso gelang es Esposito et al. (2000) durch Blockade der β -Adrenorezeptor-Kinase (β -ARK), in MLP-defizienten Mäusen die pathologischen Veränderungen weitgehend zu verhindern. Auch in einem Mutationsmodell von MyBPC in der Maus führte der zusätzliche Ausfall von PLB zu einer Normalisierung der Kontraktilität der Myozyten, allerdings kam es dennoch zur Ausprägung eines Phänotyps mit HCM (Song et al. 2003).

In der hier vorliegenden Arbeit von einer solchen Rettungsmutation durch den zusätzlichen Ausfall von MLP zu sprechen, ist sicherlich zu hoch gegriffen. Dennoch scheinen die Ergebnisse dieser Arbeit die von Knöll et al. (2002) beschriebene Theorie von MLP als zentrales Protein in der Wahrnehmung und Umsetzung von Hypertrophieereizen mit weiteren Details zu untermauern. Die Aufklärung des molekularen Mechanismus', über den MLP in die Hypertrophiekaskade eingebunden ist, bleibt zukünftigen Untersuchungen vorbehalten.

5 Zusammenfassung

Von einer Herzinsuffizienz sind etwa 3 % der Menschen in den alten Bundesländern betroffen. Ursächlich liegt oft eine genetische Veränderung in Funktionsproteinen vor, zu denen das Myosin-Bindungs-Protein C (MyBPc) und das Muscle-LIM-Protein (MLP) gehören. In dieser Arbeit wurde anhand eines Mausmodells die Auswirkung des kompletten Ausfalls eines (MLPHET) bzw. beider (DKO) für die Proteine kodierenden Gene auf die Herzfunktion untersucht. Als Kontrollgruppe dienten Tiere mit doppelt-heterozygotem Genotyp (DHET).

Dafür wurden zunächst echokardiographische Funktionsparameter in vivo gewonnen, sowie Herz- und Körpergewicht der Mäuse erhoben. Anschließend wurden intakte multizelluläre Muskelstreifen aus dem Herzen sowie aus dem Zwerchfell präpariert, elektrisch stimuliert und mit speziellen Funktionstests auf Unterschiede in der elektromechanischen Kopplung, der adrenergen Stimulationsfähigkeit, der Calciumhomöostase, sowie, nach Entfernung der Zellmembran, der Calciumsensitivität untersucht. Darüber hinaus wurden die typischen Veränderungen bei Herzinsuffizienz im Herzmuskelgewebe wie Fibrose und Hypertrophie histologisch quantifiziert. Schließlich erfolgte im Herzmuskelgewebe die semiquantitative Bestimmung des Hypertrophiemarkers schwere β -Myosin-Kette.

Dabei zeigten sowohl die MLPHET- als auch die DKO-Tiere in vivo, makroskopisch als auch in vitro gegenüber der Kontrollgruppe eine deutlich eingeschränkte Herzfunktion sowie eine signifikant erhöhte Fibrosierung und Hypertrophie des Herzmuskels. Der Ausfall von MyBPc in den MLPHET- und den DKO-Tieren führte zu einer signifikant erhöhten Calcium-Sensitivität gegenüber den Kontrolltieren. Unterschiede der MLPHET-Tiere gegenüber den DKO-Tieren bestanden in einem signifikant steileren Abfall in der Kraft-Frequenz-Beziehung, einer stärkeren Post-Pausen-Potenzierung sowie einem größeren Myozytendurchmesser. Die zusätzliche MLP-Defizienz der DKO-Tiere führte also nicht zu einer funktionell stärkeren Beeinträchtigung, sondern sogar zu einer tendenziell besseren Herzfunktion. Die Aufklärung des molekularen Mechanismus, über den MLP in die Hypertrophiekaskade eingebunden ist, bleibt zukünftigen Untersuchungen vorbehalten.

6 Literaturverzeichnis

1. Allen D, Kentish J (1985): The cellular basis of the length-tension relation in cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol* 17: 821-840
2. Arber S, Caroni P (1996): Specificity of single LIM motifs in targeting and LIM/LIM interactions in situ. *Genes Dev* 10: 3, 289-300
3. Arber S, Halder G, Caroni P (1994): Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation. *Cell* 79: 2, 221-231
4. Arber S, Hunter J, Ross J, Hongo M, Sansig G, Borg J, Perriard J, Chien K R, Caroni P (1997): MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell* 88: 393-403
5. Bassani J, Bassani R, DM B (1994): Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol* 476 (2): 279-293
6. Bers D M (1985): Ca influx and sarcoplasmic reticulum Ca release in cardiac muscle activation during postrest recovery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 248: 3, H366-381
7. Bers D M (2000): Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ Res* 87: 275-281
8. Bers D M: *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force* 2nd Edition, Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands 2001
9. Bers D M, Bassani R A, Bassani J W M, Baudet S, Hryshko L V (1993): Paradoxical Twitch Potentiation After Rest in Cardiac Muscle: Increased Fractional Release of SR Calcium. *J Mol Cell Cardiol* 25: 9, 1047
10. Boateng S S, SE; Qi, L; Goldspink, PH; Russell, B. (2009): Myocyte remodeling in response to hypertrophic stimuli requires nucleocytoplasmic shuttling of muscle LIM protein. *J Mol Cell Cardiol.* 47: (4), 426-435
11. Böhm M, Beuckelmann D, Brown L, Feiler G, Lorenz B, Nabauer M, Kemkes B, Erdmann E (1988): Reduction of beta-adrenoceptor density and evaluation of positive inotropic responses in isolated, diseased human myocardium. *Eur Heart J* 9: 8, 844-852
12. Böhm M, Eschenhagen T, Gierschik P, Larisch K, Lensche H, Mende U, Schmitz W, Schnabel P, Scholz H, Steinfath M et al. (1994): Radioimmunochemical Quantification of Gi[alpha] in Right and Left Ventricles from Patients with Ischaemic and Dilated Cardiomyopathy and Predominant Left Ventricular Failure. *J Mol Cell Cardiol* 26: 2, 133-149
13. Bonne G, Carrier L, Richard P, Hainque B, Schwartz K (1998): Familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutations to functional defects. *Circ Res* 83: 580-593
14. Brickson S, Fitzsimons D, Pereira L, Hacker T, Valdivia H, Moss R (2007): In vivo left ventricular functional capacity is compromised in cMyBP-C null mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H1747-H1754
15. Bridge J H B, Ershler P R, Cannell M B (1999): Properties of Ca²⁺ sparks evoked by action potentials in mouse ventricular myocytes. *J Physiol* 518: 2, 469-478
16. Bristow M R, Ginsburg R, Umans V, Fowler M, Minobe W, Rasmussen R, Zera P, Menlove R, Shah P, Jamieson S (1986): Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both

6. Literaturverzeichnis

- receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down- regulation in heart failure. *Circ Res* 59: 3, 297-309
17. Bristow M R, Minobe W, Rasmussen R, Hershberger R E, Hoffman B B (1988): Alpha-1 adrenergic receptors in the nonfailing and failing human heart. *J Pharmacol Exp Ther* 247: 3, 1039-1045
 18. Bristow M R, Hershberger R E, Port J D, Minobe W, Rasmussen R (1989): Beta 1- and beta 2-adrenergic receptor-mediated adenylate cyclase stimulation in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Mol Pharmacol* 35: 3, 295-303
 19. Brown A M, Birnbaumer L (1990): Ionic Channels and Their Regulation by G Protein Subunits. *Annu Rev Physiol* 52: 197-213
 20. Buckley N M, Penefsky Z J, Litwak R S (1972): Comparative force-frequency relationships in human and other mammalian ventricular myocardium. *Pflugers Arch* 332: 4, 259
 21. Carrier L, Knöll R, Vignier N, Keller D, Bausero P, Prudhon B, Isnard R, Ambroisine M, Fiszman M, Ross J et al. (2004): Asymmetric septal hypertrophy in heterozygous cMyBP-C null mice. *Cardiovasc Res* 63: 293-304
 22. Cazorla O, Szilagyi S, Vignier N, Salazar G, Kramer E, Vassort G, Carrier L, Lacampagne A (2006): Length and protein kinase A modulations of myocytes in cardiac myosin binding protein C-deficient mice. *Cardiovasc Res* 69: 2, 370-380
 23. Chien K R (2003): Genotype, phenotype: upstairs, downstairs in the family of cardiomyopathies. *J Clin Invest* 111: 175-178
 24. Chien K R, Zhu H, Knowlton K U, Miller-Hance W, Van-Bilsen M, O'Brien T X, Evans S M (1993): Transcriptional Regulation During Cardiac Growth and Development. *Annu Rev Physiol* 55: 77-95
 25. Clark W, Rudnick S, LaPres J, Andersen L, LaPointe M (1993): Regulation of hypertrophy and atrophy in cultured adult heart cells. *Circ Res* 73: 1163-1176
 26. Codd M B, Sugrue D D, Gersh B J, Melton L J d (1989): Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. *Circulation* 80: 3, 564-572
 27. Cohn J N, Levine T B, Olivari M T, Garberg V, Lura D, Francis G S, Simon A B, Rector T (1984): Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 311: 13, 819-823
 28. Cohn J N, Bristow M R, Chien K R, Colucci W S, Frazier O H, Leinwand L A, Lorell B H, Moss A J, Sonnenblick E H, Walsh R A et al. (1997): Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute Special Emphasis Panel on Heart Failure Research. *Circulation* 95: 4, 766-770
 29. Colucci W S (1997): Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure. *Am J Cardiol* 80: 15L-25L
 30. Costandi P N, Frank L R, McCulloch A D, Omens J H (2006): Role of Diastolic Properties in the Transition to Failure in a Mouse Model of Cardiac Dilatation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(6): H2971-2979
 31. Cowie M R, Mosterd A, Wood D A, Deckers J W, Poole-Wilson P A, Sutton G C, Grobbee D E (1997): The epidemiology of heart failure. *Eur Heart J* 18: 2, 208-225
 32. Cowie M R, Wood D, Coats A, Thompson S, Poole-Wilson P, Suresh V, Sutton G C (1999): Incidence and aetiology of heart failure: a population-based study. *Eur Heart J* 20: 421-428

6. Literaturverzeichnis

33. Crozatier B, Badoual T, Boehm E, Ennezat P-V, Guenoun T, Su J, Veksler V, Hittinger L U C, Ventura-Clapier R (2002): Role of creatine kinase in cardiac excitation-contraction coupling: studies in creatine kinase-deficient mice. *FASEB J* 16: 7, 653-660
34. Currie S (1999): Enhanced phosphorylation of phospholamban and downregulation of sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase type 2 (SERCA 2) in cardiac sarcoplasmic reticulum from rabbits with heart failure. *Cardiovasc Res* 41: 1, 135-146
35. Danielsen W, v der Leyen H, Meyer W, Neumann J, Schmitz W, Scholz H, Starbatty J, Stein B, Doring V, Kalmar P (1989): Basal and isoprenaline-stimulated cAMP content in failing versus nonfailing human cardiac preparations. *J Cardiovasc Pharmacol* 14 (1): 171-173
36. Despa S, Islam M A, Weber C R, Pogwizd S M, Bers D M (2002): Intracellular Na⁺ Concentration Is Elevated in Heart Failure But Na/K Pump Function Is Unchanged. *Circulation* 105: 21, 2543-2548
37. Drummond G I, Severson D L (1979): Cyclic nucleotides and cardiac function. *Circ Res* 44: 2, 145-153
38. Drvota V, Wei H, Haggblad J, Carlsson B, Sylven C (1995): Beta-adrenergic receptor function in cultured AT-1 cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 207: 1, 13-19
39. Ecamot-Laubriet A, De Luca K, Vandroux D, Moisant M, Bernard C, Assem M, Rochette L, Teyssier J-R (2000): Downregulation and Nuclear Relocation of MLP During the Progression of Right Ventricular Hypertrophy Induced by Chronic Pressure Overload. *J Mol Cell Cardiol* 32: 12, 2385-2395
40. Ehler E, Horowitz R, Zuppinger C, Price R L, Perriard E, Leu M, Caroni P, Sussman M, Eppenberger H M, Perriard J-C (2001): Alterations at the Intercalated Disk Associated with the Absence of Muscle Lim Protein. *J Cell Biol* 153: 4, 763-772
41. Eriksson H (1995): Heart failure: a growing public health problem. *J Intern Med* 237(2): 135-141
42. Esposito G, Santana L F, Dilly K, Cruz J D S, Mao L, Lederer W J, Rockman H A (2000): Cellular and functional defects in a mouse model of heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: 6, H3101-3112
43. Evans W (1948): Familial cardiomegaly. *Br Heart J* 26: 68-82
44. Feldman M D, Alderman J D, Aroesty J M, Royal H D, Ferguson J J, Owen R M, Grossman W, McKay R G (1988): Depression of systolic and diastolic myocardial reserve during atrial pacing tachycardia in patients with dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 82: 1661-1669
45. Flick M J, Konieczny S F (2000): The muscle regulatory and structural protein MLP is a cytoskeletal binding partner of beta-1- spectrin. *J Cell Sci* 113: 1553-1564
46. Frank O (1895): Zur Dynamik des Herzmuskels. *Z Biol* 32: 370-437
47. Frey N, Katus H A, Kuhn C, Frank D (2006): The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signaling and disease. *J Mol Med* 84: 446-468
48. Freyd G, Kim S, Horvitz H (1990): Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*. *Nature* 344: 876-879
49. Ganguly P, Lee S, Beamish R, Dhalla N (1989): Altered sympathetic system and adrenoceptors during the development of cardiac hypertrophy. *Am Heart J* 118: 520-525
50. Gao W D, Perez N G, Marban E (1998): Calcium cycling and contractile activation in intact mouse cardiac muscle. *J Physiol (Lond)* 507: 1, 175-184

6. Literaturverzeichnis

51. Gaughan J P, Furukawa S, Jeevanandam V, Hefner C A, Kubo H, Margulies K B, McGowan B S, Mattiello J A, DiPaola K, Piacentino V, III et al. (1999): Sodium/calcium exchange contributes to contraction and relaxation in failed human ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 277: 2, H714-724
52. Gautel M, Zuffardi O, Freiburg A, Labeit S (1995): Phosphorylation switches specific for the cardiac isoform of myosin binding protein c: a modulator of cardiac contraction. *EMBO J* 14: 1952-1960
53. Geier C, Perrot A, Ozcelik C, Binner P, Counsell D, Hoffmann K, Pilz B, Martiniak Y, Gehmlich K, van der Ven P F M et al. (2003): Mutations in the Human Muscle LIM Protein Gene in Families With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation* 107: 10, 1390-1395
54. Govier W C (1968): Myocardial alpha adrenergic receptors and their role in the production of a positive inotropic effect by sympathomimetic agents. *J Pharmacol Exp Ther* 159: 1, 82-90
55. Granzier H, Labeit S (2004): The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res* 94: 284-295
56. Gregorio C C, Trombitas K, Centner T, Kolmerer B, Stier G, Kunke K, Suzuki K, Obermayr F, Herrmann B, Granzier H et al. (1998): The NH2 Terminus of Titin Spans the Z-Disc: Its Interaction with a Novel 19-kD Ligand (T-cap) Is Required for Sarcomeric Integrity. *J Cell Biol* 143: 4, 1013-1027
57. Grunig E, Tasman J A, Kucherer H, Franz W, Kubler W, Katus H A (1998): Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 31: 1, 186-194
58. Gulati J, Scordilis S, Babu A (1988): Effect of troponin C on the cooperativity in Ca²⁺ activation of cardiac muscle. *FEBS Lett* 236: 2, 441
59. Gustafsson F, Torp-Pedersen C, Brendorp B, Seibaek M, Burchardt H, Kober L, for the D s g (2003): Long-term survival in patients hospitalized with congestive heart failure: relation to preserved and reduced left ventricular systolic function. *Eur Heart J* 24: 9, 863-870
60. Hain J, Onoue H, Mayrleitner M, Fleischer S, Schindler H (1995): Phosphorylation Modulates the Function of the Calcium Release Channel of Sarcoplasmic Reticulum from Cardiac Muscle. *J Biol Chem* 270: 5, 2074-2081
61. Harris S P, Bartley C R, Hacker T A, McDonald K S, Douglas P S, Greaser M L, Powers P A, Moss R L (2002): Hypertrophic Cardiomyopathy in Cardiac Myosin Binding Protein-C Knockout Mice. *Circ Res* 90: 5, 594-601
62. Harris S P, Rostkova E, Gautel M, Moss R L (2004): Binding of Myosin Binding Protein-C to Myosin Subfragment S2 Affects Contractility Independent of a Tether Mechanism. *Circ Res* 95: 9, 930-936
63. Harrison S, McCall E, Boyett M R (1992): The relationship between contraction and intracellular sodium in rat and guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 449: 517-550
64. Hasenfuss G (1998): Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res* 37: 2, 279-289
65. Hasenfuss G, Holubarsch C, Hermann H P, Astheimer K, Pieske B, Just H (1994a): Influence of the force–frequency relationship on haemodynamics and left ventricular function in patients with non-failing hearts and in patients with dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 15: 2, 164-170
66. Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, Drexler H (1994b): Relation between myocardial function and expression of

6. Literaturverzeichnis

- sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 75: 3, 434-442
67. Hasenfuss G, Meyer M, Schillinger W, Preuss M, Pieske B, Just H (1997): Calcium handling proteins in the failing human heart. *Basic Res Cardiol* 92: 87-93
 68. Heineke J, Kempf T, Kraft T, Hilfiker A, Morawietz H, Scheubel R J, Caroni P, Lohmann S M, Drexler H, Wollert K C (2003): Downregulation of Cytoskeletal Muscle LIM Protein by Nitric Oxide: Impact on Cardiac Myocyte Hypertrophy. *Circulation* 107: 10, 1424-1432
 69. Ho K K, Anderson K M, Kannel W B, Grossman W, Levy D (1993): Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation* 88: 1, 107-115
 70. Hofmann P, Hartzell H, Moss R (1991): Alterations in Ca²⁺ sensitive tension due to partial extraction of C-protein from rat skinned cardiac myocytes and rabbit skeletal muscle fibers. *J Gen Physiol* 97: 1141-1163
 71. Hoit B D, Shao Y, Gabel M, Walsh R A (1995): Left atrial mechanical and biochemical adaptation to pacing induced heart failure. *Cardiovasc Res* 29: 4, 469
 72. Holubarsch C, Ruf T, Goldstein D J, Ashton R C, Nickl W, Pieske B, Pioch K, Ludemann J, Wiesner S, Hasenfuss G et al. (1996): Existence of the Frank-Starling Mechanism in the Failing Human Heart: Investigations on the Organ, Tissue, and Sarcomere Levels. *Circulation* 94: 4, 683-689
 73. Hoppe U, Böhm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer H, Osterspey A, Schmaltz A, Erdmann E (1998): Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. *Z Kardiol* 87: 645-661
 74. Imoto Y, Yatani A, Reeves J P, Codina J, Bimbaumer L, Brown A M (1988): Alpha-subunit of Gs directly activates cardiac calcium channels in lipid bilayers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 255: 4, H722-728
 75. James J, Zhang Y, Osinska H, Sanbe A, Klevitsky R, Hewett T E, Robbins J (2000): Transgenic Modeling of a Cardiac Troponin I Mutation Linked to Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Res* 87: 9, 805-811
 76. James P, Inui M, Tada M, Chiesi M, Carafoli E (1989): Nature and site of phospholamban regulation of the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature* 342: 6245, 90-92
 77. Jeacocke S, England P (1980): Phosphorylation of a myofibrillar protein of Mr 150.000 in perfused rat heart, and the tentative identification of this as C-protein. *FEBS Lett* 122: 129-132
 78. Kajiwara H, Morimoto S, Fukuda N, Ohtsuki I, Kurihara S (2000): Effect of Troponin I Phosphorylation by Protein Kinase A on Length-Dependence of Tension Activation in Skinned Cardiac Muscle Fibers. *Biochem Biophys Res Commun* 272: 1, 104
 79. Kamisago M (2000): Mutations in sarcomeric protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 343: 1688-1696
 80. Karlsson O, Thor S, Olsson H, Edlund T (1990): Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature* 344: 879-882
 81. Kentish J C, McCloskey D T, Layland J, Palmer S, Leiden J M, Martin A F, Solaro R J (2001): Phosphorylation of Troponin I by Protein Kinase A Accelerates Relaxation and Crossbridge Cycle Kinetics in Mouse Ventricular Muscle. *Circ Res* 88: 10, 1059-1065
 82. Klinke R, Silbernagel S: *Lehrbuch der Physiologie*; Thieme-Verlag, Stuttgart 2000

6. Literaturverzeichnis

83. Knöll R, Hoshijima M, Hoffman H, Person V, Lorenzen-Schmidt I, Bang M, Hayashi T, Shiga N, Yasukawa H, Schaper W et al. (2002): The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z-disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell* 111: 943-955
84. Knöll R, Kostin S, Klede S, Savvatis K, Klinge L, Stehle I, Gunkel S, Kotter S, Babicz K, Sohns M et al. (2010): A Common MLP (Muscle LIM Protein) Variant Is Associated With Cardiomyopathy. *Circ Res* 106: 4, 695-704
85. Kögler H (2006): The role of cardiac myosin binding protein-C as a regulator of myofilament Ca²⁺ sensitivity. *Cardiovasc Res* 69: 2, 304-306
86. Kong Y, Flick M, Kudla A, Konieczny S (1997): Muscle LIM protein promotes myogenesis by enhancing the activity of MyoD. *Mol Cell Biol* 17: 8, 4750-4760
87. Koretz J, Irving T, Wang K (1993): Filamentous aggregates of native titin and binding of C-protein and AMP-deaminase. *Arch Biochem Biophys* 304: 2, 305-309
88. Lemmens K, Segers V, Demolder M, Michiels M, Van Cauwelaert P, De Keulenaer G W (2007): Endogenous inhibitors of hypertrophy in concentric versus eccentric hypertrophy. *Eur J Heart Fail* 9: 4, 352-356
89. Li L, Chu G, Kranias E G, Bers D M (1998): Cardiac myocyte calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CaMKII effects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 274: 4, H1335-1347
90. Lindner M, Erdmann E, Beuckelmann D J (1998): Calcium Content of the Sarcoplasmic Reticulum in Isolated Ventricular Myocytes from Patients with Terminal Heart Failure. *J Mol Cell Cardiol* 30: 4, 743-749
91. Löffler G, Petrides P: *Biochemie und Pathobiochemie*, 6. Auflage; Springer-Verlag, Berlin 1998
92. Lorenzen-Schmidt I, Stuyvers B, ter Keurs H, Date M, Hoshijima M, Chien K, McCulloch A, Omens J (2005): Young MLP deficient mice show diastolic dysfunction before the onset of dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 39: 2, 241-250
93. Louis H, Pino J, Schmeichel K, Pomies P, Beckerle M (1997): Comparison of three members of the Cysteine-rich Protein family reveals functional conservation and divergent patterns of gene expression. *J Biol Chem* 272: 43, 27484-27491
94. Maier L S, Pieske B, Allen D G (1997): Influence of stimulation frequency on [Na⁺]_i and contractile function in Langendorff-perfused rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 273: 3, H1246-1254
95. Makarenko I, Opitz C A, Leake M C, Neagoe C, Kulke M, Gwathmey J K, del Monte F, Hajjar R J, Linke W A (2004): Passive Stiffness Changes Caused by Upregulation of Compliant Titin Isoforms in Human Dilated Cardiomyopathy Hearts. *Circ Res* 95: 7, 708-716
96. Maron B J (1997): Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* 350: 127-133
97. Maron B J, Shirani J, Poliac L C, Mathenge R, Roberts W C, Mueller F O (1996): Sudden death in young competitive athletes. Clinical, demographic, and pathological profiles. *JAMA* 276: 3, 199-204
98. McMurray J J, Stewart S (2000): Heart failure: Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart* 83: 5, 596-602
99. Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, Kuwajima G, Mikoshiba K, Just H, Hasenfuss G (1995): Alterations of Sarcoplasmic Reticulum Proteins in Failing Human Dilated Cardiomyopathy. *Circulation* 92: 4, 778-784

6. Literaturverzeichnis

100. Michels V, Moll P, Miller F, Tajik J, Chu J, Driscoll D, Burnett J, Rodeheffer R, Chesebro J, Tazelaar H (1992): The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 326: 77-82
101. Minamisawa S, Hoshijima M, Chu G, Ward C A, Frank K, Gu Y, Martone M E, Wang Y, Ross J, John (1999): Chronic Phospholamban-Sarcoplasmic Reticulum Calcium ATPase Interaction Is the Critical Calcium Cycling Defect in Dilated Cardiomyopathy. *Cell* 99: 3, 313-322
102. Moos C, Offer G, Starr R, Bennett P (1975): Interaction of C-protein with myosin, myosin rod and light meromyosin. *J Mol Biol* 97: 1-9
103. Moos C, Mason C, Besterman J M, Feng I-N, Dubis J H (1978): The binding of skeletal muscle C-protein to F-actin, and its relation to the interaction of actin with myosin subfragment-1. *J Mol Biol* 124: 571-586
104. Mulieri L, Hasenfuss G, Ittleman F, Blanchard E, Alpert N (1989): Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime. *Circ Res* 65(5): 1441-1449
105. Mulieri L A, Hasenfuss G, Leavitt B, Allen P D, Alpert N R (1992): Altered myocardial force-frequency relation in human heart failure. *Circulation* 85: 5, 1743-1750
106. Offer G, Moos C, Starr R (1973): A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal myofibrils: Extraction, purification and characterization. *J Mol Biol* 74: 4, 653
107. Omens J, Usyk T, Li Z, McCulloch A (2002): Muscle LIM protein deficiency leads to alterations in passive ventricular mechanics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H680-H687
108. Packer M (1988): Neurohormonal interactions and adaptations in congestive heart failure. *Circulation* 77: 4, 721-730
109. Pena J, Wolska B (2004): Troponin I phosphorylation plays an important role in the relaxant effect of beta-adrenergic stimulation in mouse hearts. *Cardiovasc Res* 61: 756-763
110. Pieske B, Kretschmann B, Meyer M, Holubarsch C, Weirich J, Posival H, Minami K, Just H, Hasenfuss G (1995): Alterations in Intracellular Calcium Handling Associated With the Inverse Force-Frequency Relation in Human Dilated Cardiomyopathy. *Circulation* 92: 5, 1169-1178
111. Pieske B, Sütterlin M, Schmidt-Schweda S, Minami K, Meyer M, Olschewski M, Holubarsch C, Just H, Hasenfuss G (1996): Diminished post-rest potentiation of contractile force in human dilated cardiomyopathy. Functional evidence for alterations in intracellular Ca²⁺ handling. *J Clin Invest* 98: 764-776
112. Pieske B, Schlotthauer K, Schattmann J, Beyersdorf F, Martin J, Just H, Hasenfuss G (1997): Ca-dependent and Ca-independent regulation of contractility in isolated human myocardium. *Basic Res Cardiol* 92: 75-86
113. Piot C, Lemaire S, Albat B, Seguin J, Nargeot J, Richard S (1996): High Frequency-Induced Upregulation of Human Cardiac Calcium Currents. *Circulation* 93: 1, 120-128
114. Pitschner H, Droege A, Mitze M, Schlepper M, Brodde O (1993): Down-regulated beta-adrenoceptors in severely failing human ventricles: uniform regional distribution, but no increased internalization. *Basic Res Cardiol* 88 (2): 179-191
115. Redel A, Baumgartner W, Golenhofen K, Drenckhahn D, Golenhofen N (2002): Mechanical activity and force-frequency relationship of isolated mouse papillary muscle: effects of extracellular calcium concentration, temperature and contraction type. *Pflügers Arch* 445: 2, 297-304

6. Literaturverzeichnis

116. Redwood C, Moolman-Smook J, Watkins H (1999): Properties of mutant contractile proteins that cause hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 44: 20-36
117. Reiken S, Gaburjakova M, Guatimosim S, Gomez A M, D'Armiento J, Burkhoff D, Wang J, Vassort G, Lederer W J, Marks A R (2003): Protein Kinase A Phosphorylation of the Cardiac Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) in Normal and Failing Hearts. Role of phosphatases and response to isoproterenol. *J Biol Chem* 278: 1, 444-453
118. Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, Benaiche A, Isnard R, Dubourg O, Burban M et al. (2003): Hypertrophic Cardiomyopathy: Distribution of Disease Genes, Spectrum of Mutations, and Implications for a Molecular Diagnosis Strategy. *Circulation* 107: 17, 2227-2232
119. Roth D M, Swaney J S, Dalton N D, Gilpin E A, Ross J, Jr. (2002): Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: 6, H2134-2140
120. Rothermel B A, McKinsey T A, Vega R B, Nicol R L, Mammen P, Yang J, Antos C L, Shelton J M, Bassel-Duby R, Olson E N et al. (2001): Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6, 3328-3333
121. Rozental R, Carvalho A, Spray D (2000): Gap junctions in the cardiovascular and immune systems. *Braz J Med Biol Res* 33(4): 365-368
122. Rundqvist B, Elam M, Bergmann-Sverrisdottir Y, Eisenhofer G, Friberg P (1997): Increased Cardiac Adrenergic Drive Precedes Generalized Sympathetic Activation in Human Heart Failure. *Circulation* 95: 1, 169-175
123. Sarikas A, Carrier L, Schenke C, Doll D, Flavigny J, Lindenberg K, Eschenhagen T, Zolk O (2005): Impairment of the ubiquitin-proteasome system by truncated cardiac myosin binding protein C mutants. *Cardiovasc Res* 66(1): 33-44
124. Schallus T, Fehér K, Ulrich A, Stier G, Muhle-Goll C (2009): Structure and dynamics of the human muscle LIM protein. *FEBS Lett* 583(6): 1017-1022
125. Schwartz K (1995): Familial hypertrophic cardiomyopathy- nonsense versus missense mutations. *Circulation* 91: 2865-2867
126. Schwinger R H, Bohm M, Koch A, Schmidt U, Morano I, Eissner H J, Uberfuhr P, Reichart B, Erdmann E (1994): The failing human heart is unable to use the Frank-Starling mechanism. *Circ Res* 74: 5, 959-969
127. Schwinger R H G, Bohm M, Schmidt U, Karczewski P, Bavendiek U, Flesch M, Krause E-G, Erdmann E (1995): Unchanged Protein Levels of SERCA II and Phospholamban but Reduced Ca²⁺ Uptake and Ca²⁺-ATPase Activity of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum From Dilated Cardiomyopathy Patients Compared With Patients With Nonfailing Hearts. *Circulation* 92: 11, 3220-3228
128. Scriven D, Dan P, Moore E D (2000): Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys J* 79(5): 2682-2691
129. Sham J S, Jones L R, Morad M (1991): Phospholamban mediates the beta-adrenergic-enhanced Ca²⁺ uptake in mammalian ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 261: 4, H1344-1349
130. Smith P, Krohn R, Hermanson G, Mallia A, Gartner F, Provenzano M, Fujimoto E, Goeke N, Olson B, Klenk D (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150(1): 76-85
131. Song Q, Schmidt A G, Hahn H S, Carr A N, Frank B, Pater L, Gerst M, Young K, Hoit B D, McConnell B K et al. (2003): Rescue of cardiomyocyte dysfunction by

6. Literaturverzeichnis

- phospholamban ablation does not prevent ventricular failure in genetic hypertrophy. *J Clin Invest* 111: 6, 859-867
132. Soteriou A, Gamage M, Trinick J (1993): A survey of interactions made by the giant protein titin. *J Cell Sci* 104: 119-123
 133. Straub V, Campbell K (1997): Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr Opin Neurol* 10(2): 168-175
 134. Studer R, Reinecke H, Bilger J, Eschenhagen T, Bohm M, Hasenfuss G, Just H, Holtz J, Drexler H (1994): Gene expression of the cardiac Na(+)-Ca²⁺ exchanger in end-stage human heart failure. *Circ Res* 75: 3, 443-453
 135. Towbin J A, Bowles N E (2002): The failing heart. *Nature* 415: 227-233
 136. Vahl C F, Timek T, Bonz A, Fuchs H, Dillman R, Hagl S (1998): Length Dependence of Calcium- and Force-Transients in Normal and Failing Human Myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 30: 5, 957-966
 137. Vinogradova T M, Bogdanov K Y, Lakatta E G (2002): beta-Adrenergic Stimulation Modulates Ryanodine Receptor Ca²⁺ Release During Diastolic Depolarization to Accelerate Pacemaker Activity in Rabbit Sinoatrial Nodal Cells. *Circ Res* 90: 1, 73-79
 138. Vomanen M (1992): Maximum heart rate of soricine shrews: correlation with contractile properties and myosin composition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 262: 5, R842-851
 139. Wang, Xinkang, Lee Gerald, Liebhaber Stephen, Nancy C (1992): Human Cysteine-rich Protein. *J Biol Chem* 267: 13, 9176-9184
 140. Way M, Chalfie M (1988): Mec-3, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*. *Cell* 54: 5-16
 141. Weil J, Eschenhagen T, Hirt S, Magnussen O, Mittmann C, Remmers U, Scholz H (1998): Preserved Frank-Starling mechanism in human end stage heart failure. *Cardiovasc Res* 37: 2, 541-548
 142. Witt C C, Gerull B, Davies M J, Centner T, Linke W A, Thierfelder L (2001): Hypercontractile Properties of Cardiac Muscle Fibers in a Knock-in Mouse Model of Cardiac Myosin-binding Protein-C. *J Biol Chem* 276: 7, 5353-5359
 143. Wright C S (1984): Structural comparison of the two distinct sugar binding sites in wheat germ agglutinin isolectin II. *J Mol Biol* 178: 1, 91-104
 144. Yamamoto K (1986): The binding of skeletal muscle C-protein to regulated actin. *FEBS Lett* 208: 123-127
 145. Yoshimura M, Yasue H, Okumura K, Ogawa H, Jougasaki M, Mukoyama M, Nakao K, Imura H (1993): Different secretion patterns of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. *Circulation* 87: 2, 464-469
 146. Zolk O, Caroni P, Bohm M (2000): Decreased Expression of the Cardiac LIM Domain Protein MLP in Chronic Human Heart Failure. *Circulation* 101: 23, 2674-2677