

Aus Abteilung für Kinderkardiologie und Pädiatrische Intensivmedizin – Großhadern
Kinderklinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität
Leiter: Prof. Dr. med. Heinrich Netz

**Myokardiales Expressionsmuster der
natriuretischen Peptide und Connexine bei
dilatativer Kardiomyopathie und kongenitalen Vitien**

Dissertation
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Sonja Gebhard
aus München
2006

**Mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Heinrich Netz
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. H. Adelsberger Prof. Dr. K. Theisen Priv. Doz. Dr. M. Näbauer
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Rainer Kozlik-Feldmann
Dekan:	Prof. Dr. med. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	16.11.2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Genexpression	7
1.1.1	Aufbau des humanen Genoms	7
1.1.2	Die Proteinbiosynthese	8
1.1.3	Bedeutung der Genexpression in der Medizin	9
1.2	Connexine	9
1.2.1	Struktur und Funktion der Gap Junctions	9
1.2.2	Die Familie der Connexine	10
1.2.3	Für die Herzmuskeltätigkeit wichtige Connexine und ihre Lokalisation	12
1.2.4	Funktion der herzrelevanten Connexine	13
1.2.5	Veränderung der Expression der herzrelevanten Connexine bei Herzerkrankungen	14
1.2.6	Veränderung der Anordnung der Connexine an den Myokardzellen	15
1.3	Natriuretische Peptide	15
1.3.1	Struktur, Synthese und Funktion der natriuretischen Peptide	15
1.3.2	Die Familie der natriuretischen Peptide	17
1.3.3	Im Herzen synthetisierte natriuretische Peptide und ihre Lokalisation	17
1.3.4	Rezeptoren und Metabolismus	18
1.3.5	Funktion der natriuretischen Peptide	19
1.3.6	Veränderungen der Expression der natriuretischen Peptide bei Herzerkrankungen	20
1.3.7	Therapeutisches Potential	21
1.4	Zielsetzung der Arbeit	22

2	Material und Methoden	23
2.1	Materialien	23
2.1.1	Probenmaterial	23
2.1.2	Chemikalien und sonstige Reagenzien	23
2.1.3	Herstellung einzelner Lösungen	24
2.1.4	Geräte	25
2.1.5	Enzyme	26
2.1.6	Plasmidvektoren	26
2.1.7	Bakterienstämme	27
2.1.8	Kulturmedien für Bakterien	27
2.1.9	Oligonukleotide für Klonierung und Sequenzierung	28
2.1.9.1	Primer für 18s-rRNA	28
2.1.9.2	Primer für hCx40	28
2.1.9.3	Primer für hCx43	28
2.1.9.4	Primer für hGH	28
2.1.9.5	Primer für hANP	28
2.1.9.6	Primer für hBNP	28
2.1.10	Primer und Sonden für TaqMan™-PCR-Assays	28
2.1.10.1	Quantitative Bestimmung der 18s-rRNA	29
2.1.10.2	Quantitative Bestimmung der hCx40	29
2.1.10.3	Quantitative Bestimmung der hCx43	29
2.1.10.4	Quantitative Bestimmung der hGH	29
2.1.10.5	Quantitative Bestimmung der hANP	29
2.1.10.6	Quantitative Bestimmung der hBNP	29
2.2	Methoden	30
2.2.1	Vorbehandlung des Probenmaterials	30
2.2.1.1	Isolierung der Gesamt-RNA	30
2.2.1.1.1	Vorbemerkungen	30
2.2.1.1.2	Isolierung der RNA	30
2.2.1.1.3	Entfernung kontaminierender DNA	31
2.2.1.1.4	Bestimmung der Konzentration der präparierten RNA	32
2.2.1.1.5	Bestimmung der Qualität der präparierten RNA	32
2.2.1.1.5.1	Spektralphotometrie	32

2.2.1.1.5.2	Gelelektrophorese	33
2.2.1.2	Überprüfung der DNA-Freiheit der isolierten RNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
2.2.1.3	Entfernung kontaminierender DNA	36
2.2.1.4	Synthese der komplementären DNA (cDNA)	36
2.2.2	Standardkurvenerstellung	37
2.2.2.1	Sequenzsuche	37
2.2.2.2	Sonden- und Primerdesign	37
2.2.2.3	Primerdesign für Klonierung	38
2.2.2.4	Klonierung von DNA-Fragmenten	38
2.2.2.4.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
2.2.2.4.2	Klonierung	40
2.2.2.4.3	Transformation kompetenter Bakterien	41
2.2.2.4.4	Isolierung und Reinigung der Plasmid-DNA	41
2.2.2.4.4.1	Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA (Miniprep)	42
2.2.2.4.4.2	Isolierung der Plasmid-DNA im großen Maßstab	43
2.2.2.4.5	Hydrolytische Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen (Restriktionsverdau)	43
2.2.2.4.6	Reinigung der DNA-Fragmente	44
2.2.2.4.7	DNA-Sequenzierung	44
2.2.2.4.8	Linearisierung des Plasmids	46
2.2.2.4.9	Genaue absolute Quantifizierung	47
2.2.3	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	47
2.2.3.1	Vorbemerkungen	47
2.2.3.2	Real-Time TaqMan™-PCR	48
2.2.3.3	Quantifizierungsstrategie	49
2.2.3.4	Vorbereitungen	49
2.2.3.5	Durchführung	51
2.2.3.6	Auswertung	52
3	Ergebnisse	54
3.1	Patientenkollektiv	54

3.2	Connexine	56
3.2.1	hCx40 und hCx43-Transformation	56
3.2.2	Explorative Datenanalyse der hCx40-Expression bei verschiedenen Erkrankungen in den rechten und linken Vorhöfen und Hauptkammern	56
3.2.3	Explorative Datenanalyse der hCx43-Expression bei verschiedenen Erkrankungen in den rechten und linken Vorhöfen und Hauptkammern	59
3.2.4	Zusammenhang zwischen dem Grad der Herzinsuffizienz (NYHA 3 und 4) und der Genexpression von hCx40 und hCx43 bei DCM	61
3.2.5	Zusammenhang zwischen hCx40- und hCx43-Genexpression	64
3.2.6	Zusammenhang zwischen hämodynamischen Parametern und Genexpression von hCx40 und hCx43	65
3.3	Natriuretische Peptide	67
3.3.1	hANP und hBNP-Transformation	67
3.3.2	Explorative Datenanalyse der hANP-Expression bei verschiedenen Erkrankungen in den rechten und linken Vorhöfen und Hauptkammern	67
3.3.3	Explorative Datenanalyse der hBNP-Expression bei verschiedenen Erkrankungen in den rechten und linken Vorhöfen und Hauptkammern	69
3.3.4	Zusammenhang zwischen dem Grad der Herzinsuffizienz (NYHA 3 und 4) und der Genexpression von hANP und hBNP bei DCM	71
3.3.5	Zusammenhang zwischen hANP- und hBNP-Genexpression	74
3.3.6	Zusammenhang zwischen hämodynamischen Parametern und Genexpression von hANP und hBNP	75
4	Diskussion	77
4.1	Connexine	77
4.1.1	Vorbemerkung	77
4.1.2	Interpretation der Ergebnisse	77

4.2	Natriuretische Peptide	79
4.2.1	Vorbemerkung	79
4.2.2	Interpretation der Ergebnisse	80
5	Zusammenfassung	82
6	Anhang	85
6.1	Tabellen	85
6.2	Abbildungen	86
6.3	Sequenzen	88
6.3.1	Sequenz der 18s rRNA	88
6.3.2	Sequenz des hCx40	90
6.3.3	Sequenz des hCx43	91
6.3.4	Sequenz des hGH	94
6.3.5	Sequenz des hANP	96
6.3.6	Sequenz des hBNP	96
6.4	Varianzanalysen	98
6.4.1	Varianzanalyse hCx40	98
6.4.1.1	Post-Hoc-Test ohne Unterteilung in Lokalisationen	98
6.4.1.2	Post-Hoc-Test mit Unterteilung in Lokalisationen	98
6.4.2	Varianzanalyse hCx43	100
6.4.2.1	Post-Hoc-Test ohne Unterteilung in Lokalisationen	100
6.4.2.2	Post-Hoc-Test mit Unterteilung in Lokalisationen	101
6.4.3	Varianzanalyse hANP	103
6.4.3.1	Post-Hoc-Test ohne Unterteilung in Lokalisationen	103
6.4.3.2	Post-Hoc-Test mit Unterteilung in Lokalisationen	104
6.4.4	Varianzanalyse hBNP	106
6.4.4.1	Post-Hoc-Test ohne Unterteilung in Lokalisationen	106
6.4.4.2	Post-Hoc-Test mit Unterteilung in Lokalisationen	106

6.5	Probenliste	108
7	Literaturverzeichnis	109
8	Abkürzungen	129
9	Danksagung	132
10	Tabellarischer Lebenslauf	133

1 Einleitung

1.1 Genexpression

1.1.1 Aufbau des humanen Genoms

Mit dem klassischen Experiment der Transformation von Bakterien wiesen O. T. Avery, C. MacLeod und M. McCarty 1944 nach, dass Desoxyribonukleinsäuren (DNA) Träger der genetischen Information sind. Sie bestehen aus einer Kette über Phosphatbrücken verknüpfter Desoxyribose-Einheiten, an die N-glykosidisch eine der Purinbasen Adenin oder Guanin bzw. der Pyrimidinbasen Thymin oder Cytosin gebunden sind. Die im Jahre 1953 von James Watson und Francis Crick aufgeklärte dreidimensionale Struktur der DNA, die Doppelhelix, welche sich aus zwei komplementären Einzelsträngen bildet, wird durch Wasserstoffbrücken zwischen Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin stabilisiert. Die Reihenfolge der Basen auf einem Polynukleotidstrang ist in keiner Weise beschränkt, in der Basensequenz ist die genetische Information enthalten. Zirka drei Milliarden dieser Basenpaare, verteilt auf 22 Autosomen und die beiden Geschlechtschromosomen X und Y, bilden das haploide humane Genom.

Die DNA besteht sowohl aus kodierenden Abschnitten, die für die Biosynthese entsprechender mRNA bzw. eines bestimmten Proteins notwendig sind, als auch aus nichtkodierenden Bereichen mit unbekannter Funktion, die ca. 80 % des Genoms bilden.

Gene haben sehr unterschiedliche Größen und Strukturen. Es gibt Gene mit ca. 100 Basenpaaren, aber auch solche, die aus über zwei Millionen Basenpaaren bestehen (Knippers). Die meisten proteinkodierenden Gene setzen sich aus kodierenden Bereichen (Exons) und nicht kodierenden Abschnitten (Introns) zusammen. Die lineare Folge der Nukleotide bestimmt die Abfolge der Aminosäuren in Proteinen.

1.1.2 Die Proteinbiosynthese

Die Proteinbiosynthese gliedert sich in zwei Abschnitte. Zunächst werden bei der Transkription einzelne Gene oder Gruppen von Genen mit Hilfe der DNA-abhängigen RNA-Polymerasen in RNA-Stränge umgeschrieben. Dabei werden drei Arten von Ribonukleinsäuren unterschieden: Die „messenger“-RNA (mRNA) dient als Informationsüberträger in der Proteinbiosynthese, während andere RNA-Moleküle Teile der Proteinsynthesemaschinerie sind. Dazu gehören die „transfer“-RNA (tRNA) und die ribosomale RNA (rRNA), die den größten Anteil der Gesamt-RNA einer Zelle ausmachen.

Alle Formen zellulärer RNA werden von RNA-Polymerasen synthetisiert, die ihre Anweisungen von DNA-Matrizen erhalten. Typ I und III katalysieren die Transkription der Gene für tRNAs und rRNAs, während die RNA-Polymerase II an der Synthese der mRNA beteiligt ist.

Transkription: Die Boten-Ribonukleinsäuren sind Transkripte proteinkodierender Gene und dienen als Matrize bei der Proteinbiosynthese. Sie wurden 1961 von F. Jacob und J. Monod als sehr kurzlebige Zwischenprodukte bezeichnet und weisen typische Strukturmerkmale auf:

- eine 7-Methyl-Guanosinium-Kappe, das sog. Cap-G, das über eine 5'-5'-Triphosphatbrücke mit dem ersten Nukleotid der mRNA verknüpft ist;
- die 5'-untranslatierte Region;
- die kodierende Region, beginnend mit dem Start-Codon AUG;
- die 3'-untranslatierte Region im Anschluss an das Stop-Codon (UAA,UAG oder UGA);
- einen aus 150 - 250 Adenin-Nukleotiden bestehenden Poly-A-Schwanz.

Diesem Prozess der Transkription schließt sich die Translation an, die Synthese von Proteinen nach Instruktionen, die von einer mRNA-Matrize stammen.

Translation: Als Adaptermolekül bei der Proteinbiosynthese dienen die „transfer“-RNAs, die zwischen 73 und 93 Ribonukleotide lang sind und eine kleeblattartige Struktur ausbilden. Sie werden durch Aminoacyl-tRNA-Synthetasen spezifisch mit einer der 20 Aminosäuren beladen und hängen diese bei der Proteinbiosynthese an die wachsende Polypeptidkette an.

Die ribosomale RNA bildet gemeinsam mit den Proteinen die Ribosomen, welche ungefähr zwei Drittel des Gewichtes der Ribosomen ausmacht. Diese sind

bei Eukaryonten in Form einer kleinen 40S- und einer großen 60S-Untereinheit organisiert und stellen den Ort der Proteinbiosynthese dar.

1.1.3 Bedeutung der Genexpression in der Medizin

Obwohl alle Zellen eines Organismus die identische genetische Information enthalten, differenzieren Zellen und übernehmen verschiedene Aufgaben im Organismus. Dies ist möglich, da Zellen nicht das gesamte vorhandene genetische Material ausnützen, sondern nur einen gewissen Teil der Gene exprimieren. Die Aktivität der Gene spiegelt sich wieder in der Art und Menge der mRNAs und der mit ihrer Hilfe synthetisierten Proteine. Dadurch werden nicht nur Zelldifferenzierung und Regulation zellulärer Prozesse beeinflusst, sondern möglicherweise auch die Entstehung verschiedenster Erkrankungen. Mit Hilfe der Untersuchung der Expression bestimmter Genabschnitte erhofft man sich deshalb mehr Einblicke in noch unbekannte pathophysiologische Vorgänge.

1.2 Connexine

1.2.1 Struktur und Funktion der Gap Junctions

Jean-Paul Revel und Morris Karnovsky entdeckten Zell-Zell-Kanäle, sogenannte Gap Junctions, die für die interzelluläre Kommunikation benachbarter Zellen von großer Bedeutung sind. Diese Gap Junctions, auch Nexus oder Kontaktzonen genannt, bestehen jeweils aus 12 Molekülen Connexin, einem zwischen 26 und 60 kDa-Transportmembranprotein. Sechs Connexine bilden die Wand eines Connexons (= Halbkanal). Zwei dieser Connexone zweier benachbarter Zellen bilden durch Kontakt im Extrazellularraum einen kompletten funktionsfähigen Zell-Zell-Kanal (Bruzzone et al., 12; Donaldson et al., 34; Yeager, 130). Das Zentrum dieses Kanals ist hydrophil und ermöglicht den Transport (Donaldson et al., 34; Saés et al., 92).

Werden Connexone aus identischen bzw. unterschiedlichen Connexinen zusammengesetzt, so sind sie homomer bzw. heteromer. Bestehen die Gap Junctions aus identischen bzw. unterschiedlichen Connexonen, so spricht man von homo- bzw. heterotypischen Kanälen (Bruzzone et al., 12; Gros et al., 47; Kumar und

Gilila, 61).

1964 konnte Werner Löwenstein durch Fluoreszenz darstellen, dass nicht alle Moleküle die kleinen zellenverbindenden Kanäle mit einer zentralen Öffnung von zwei nm Durchmesser passieren können. Polaren Molekülen bis zu ca. ein kDa und somit anorganischen Ionen und den meisten Metaboliten wie Zucker, Aminosäuren und Nukleotiden ist ein Durchtritt möglich, dagegen sind Proteine, Nukleinsäuren und Polysaccharide für diese Kontaktzonen zu groß (Bruzzone et al., 12; Kumar et al., 61; Peters et al., 82; Stryer, 105; Yeager, 130). Allerdings gibt es connexin-spezifische Unterschiede in der Permeabilität der Kanäle (Veenstra et al. 118).

Gap Junctions sind im gesamten Tierreich nicht nur in Skelettmuskeln, Erythrozyten und zirkulierenden Lymphozyten von großer Bedeutung, sondern auch neben Regulation von Embryogenese, Differenzierung und Ernährung z. B. von Augenlinse und Knochen in einigen erregbaren Geweben wie Nervengewebe, glatter Muskulatur und Herzmuskel unentbehrlich. Dort sind benachbarte Zellen über einen raschen Strom von Ionen durch diese Gap Junctions miteinander verbunden, die folglich eine schnelle Antwort auf entsprechende Reize ermöglichen. Somit sind Gap Junctions neben der metabolischen auch für elektrische Kommunikation zuständig (Bruzzone et al.,12, Kumar et al., 61; Simon und Goodenough, 101; Stryer, 105). Die Gap Junctions ermöglichen eine Ausbreitung der Aktionspotentiale innerhalb der Myokardzellen und sind verantwortlich für eine koordinierte Kontraktion (Gros et al., 47).

Im Herzmuskel sind diese Gap Junctions vor allem in den longitudinalen Bereichen bestimmter Regionen, den sogenannten Disci intercalares, zu finden (Gros und Jongma, 47; Peters et al., 82; Severs et al., 99; Yeager et al., 130).

1.2.2 Die Familie der Connexine

Bis jetzt sind in Säugetieren bereits 14 verschiedene Arten von Connexinen identifiziert worden (Gros et al., 47). Die Connexin-Gene sind sehr einfach aufgebaut, d. h. die gesamte kodierende Region ist in einem Exon enthalten.

Die Struktur der einzelnen Connexine ist stets sehr ähnlich. Dieses komplexe Transmembranprotein besteht aus vier Transmembrandomänen (eine mit amphibischem Charakter), zwei Extrazellular-Domänen (für die Interaktion der beiden Connexone) und drei Intrazellulardomänen (aminoterminal Domäne,

carboxyterminale Domäne und zentrale cytoplasmatische Domäne). Die Varianz der Molekülmasse und somit der verschiedenen Connexine besteht in der unterschiedlichen Länge der Sequenzen von carboxyterminaler und zentraler cytoplasmatischer Domäne (Bruzzone et al., 12; Goodenough et al., 43; Saéz et al., 92).

Unger et al. konnte aus isolierten Zellen rekombinierte Gap Junction-Proteine auflösen und die typische 12-gliedrige Struktur darstellen. Es stellte sich heraus, dass ein Connexon aus 24 Alpha-Helices besteht, entsprechend der zuvor beschriebenen vier Transmembrandomänen der sechs Connexine (Saéz et al., 92).

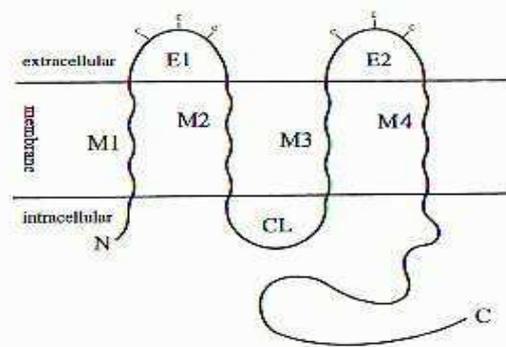


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Connexins.

M1 – M4 sind die transmembranen Domänen, E1 und E2 die extrazellulären Domänen, CL die zentrale cytoplasmatische Domäne, N das N-terminale und C das C-terminale Ende.

Das divergente Verhalten und die unterschiedlichen Permeabilitätseigenschaften der Connexinsubklassen sind nicht nur auf ihre oben beschriebenen unterschiedlichen Strukturen zurückzuführen, sondern lassen sich auch durch modifizierende Mechanismen wie Phosphorylierung, Dephosphorylierung oder Änderung des pH-Wertes oder der Konzentration des freien Calciums erklären. Kumar und Gilula beschreiben eine Korrelation eines erhöhten intrazellulären Calciums mit einer verminderten Kommunikation über die Gap Junctions. (Bruzzone et al., 12; Goodenough et al., 43; Kumar und Gilula, 61; Yeager, 130).

Theoretisch können, wie bereits angesprochen, Gap Junctions äußerst variabel aus den unterschiedlichen Connexinsubtypen aufgebaut werden und erhalten somit entsprechende Bezeichnungen. Jedoch berichten Kumar und Gilula (61) davon, dass in vivo Connexone nicht mit anderen Connexonen beliebig kombiniert werden können. Gleiches berichten Bruzzone et al., Peters et al. und

White et al., für die Kompatibilität machen White et al. die extrazelluläre Domäne E2 verantwortlich.

Die gängige Einteilung der einzelnen Connexine erfolgt aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichts. Das in dieser Arbeit untersuchte Connexin 43 des Menschen hat eine Molekülmasse von 43 kDa und wird entsprechend als hCx43 (h für human) bezeichnet. Alternativ wird eine weitere Nomenklatur basierend auf der Evolution verwendet, wobei in zwei Klassen Alpha bzw. Typ II und Beta bzw. Typ I unterteilt wird (Bruzzone et al., 12; Goodenough et al., 43; Kumar und Gilula, 61; Simon und Goodenough, 101; van Veen et al., 117). Dabei sind Connexin 40 und 43 in der Gruppe der Alpha-Connexine und Connexin 45 in der Gruppe der Beta-Connexine (Goodenough et al., 43). Im Vergleich zu den Beta-Typ-Connexinen haben die Alpha-Typ-Connexine sowohl ein längeres C-terminales Ende als auch eine längere cytoplasmatische M2- und M3-Domäne.

1.2.3 Für die Herzmuskeltätigkeit wichtige Connexine und ihre Lokalisation

Diese Gap Junctions sind in allen Geweben, jedoch in unterschiedlicher Menge vorhanden. Nach Bruzzone et al. (12) konnten sechs verschiedene Connexinarten in Herzgeweben nachgewiesen werden (hCx37, hCx40, hCx43, Cx45, hCx46 und hCx50), jedoch sind nach Angaben von Gros und Jongasma (47) hCx40, hCx43 und hCx45 die am Herzen am stärksten exprimierten Subtypen und am wahrscheinlichsten von großer Bedeutung für die Funktionsfähigkeit der Herzens.

Aufgrund der geringen Expression von hCx45 im Arbeitsmyokard des Atriums und Ventrikel wie auch im Reizleitungssystem (Chen et al., 16; Davis et al., 25; Peters et al., 82; Saéz et al., 92) wurde dieser Subtyp in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Viele Autoren wie Saéz et al. (92) und Gourdie et al. (45) bezeichneten das als erstes im Herzgewebe identifizierte hCx43 (Gros et al., 47) als das dominanteste Gap Junction-Protein im menschlichen Arbeitsmyokard des Ventrikels. Ebenso konnte hCx43 im Arbeitsmyokard des Atriums als auch im Reizleitungssystem (Atrioventrikularknoten und Schenkel des His-Bündels bzw. Purkinjefasern) lokalisiert werden (Davis et al., 24; Gros und Jongasma, 47; Oosthoek et al., 80; van Kempen et al., 114; Vozzi et al., 119).

Chen und weitere (Bruzzone et al., 12; Davis et al., 25; Saéz et al., 92; van

Kempen et al., 114 und Vozzi et al., 119) konnten hCx40 sowohl im Reizleitungssystem (Hisbündel und Purkinjefasern) als auch im Arbeitsmyokard des Vorhofs nachweisen, wobei es als Hauptconnexin für das Reizleitungssystem dargestellt wird. Saéz et al. (92) wiesen ausdrücklich darauf hin, daß hCx40 im Arbeitsmyokard des Ventrikels nicht vorhanden ist. Vozzi et al. konnten zwar die hCx40-mRNA nachweisen, jedoch das Protein selbst nicht.

Im Bereich des Eintritts der Purkinjefasern in das Arbeitsmyokard sind beide Connexine hCx40 und hCx43 exprimiert und bilden parallel homotypische Gap Junction-Kanäle aus (Donaldson et al., 34).

Unabhängig von den Connexinsubklassen konnte anhand von Studien festgestellt werden, dass in verschiedenen Bereichen der Herzgewebe unterschiedliche Anzahlen von Gap Junctions von ein wenigen bis zu Tausenden existieren. Während es im Sinusknoten nur wenige Kanäle gibt, wurden im Gegensatz dazu, im Atrium und Ventrikel eine große Anzahl gefunden (Gros et al., 47).

1.2.4 Funktion der herzrelevanten Connexine

Für einige Autoren war neben der Lokalisation der verschiedenen Connexinsubtypen Cx40, Cx43 und Cx45 deren unterschiedliche Expression im Entwicklungsprozess des Herzens sehr entscheidend. So wurde die wichtige Rolle der Connexine am Werdegang des Herzens an knockout-Mäusen bewiesen.

Molekularbiologische Methoden wurden angewandt um die Expression der kardiovaskulären Connexine zu verändern. Reaume et al. (88) verwendeten eine homologe Rekombination zur Produktion von Cx43-Null-Mäusen (Cx43^{-/-}). Diese überlebten bis zur Geburt und schienen normal entwickelt zu sein. Jedoch kurz nach Geburt begannen sie zyanotisch zu werden und verstarben rasch an den Folgen der Obstruktion des rechten Ausflusstraktes. Die Tatsache, dass diese Mäuse bis zur Geburt überlebt haben, ist durch eine eventuelle Kompensation durch andere Connexine wie Cx40 zu erklären (Gros et al., 47), wobei bei diesen Cx43-Null-Mäusen ebenso eine Reduktion des Cx45 beschrieben wurde. In heterozygoten Mäusen (Cx43^{+/-}) war lediglich eine QRS-Verbreiterung zu beobachten; die Mäuse waren lebensfähig (Saéz et al., 92). Bei überexprimierten Cx43-Mäusen ergaben sich dieselben Defekte wie bei Cx43-Null-Mäusen (Simon, 102). Es scheint so, dass die

Anwesenheit des Cx43 nicht die alleinige Notwendigkeit für die Funktionstüchtigkeit des Herzens darstellt.

Die bedeutende Funktion des Cx40-Proteins im Reizleitungssystem wurde an knockout-Mäusen bestätigt. Diese Mäuse entwickelten sich normal, auf Grund dessen davon ausgegangen werden kann, dass Cx40 für die Entwicklung des Herzens keine entscheidende Rolle spielt. Jedoch war ein verbreiteter QRS-Komplex zu erkennen, der sich in einem Rechts-Schenkel-Block äußerte (White und Paul, 125).

Cx45-defiziente Mäuse starben während der Embryogenese. Die Herzen dieser Mäuse waren dilatiert (Saéz et al., 92).

1.2.5 Veränderung der Expression der herzrelevanten Connexine bei Herzerkrankungen

Gap Junctions mit ihren kleinsten Bausteinen sind sehr wichtig für die elektrische Aktivität des Herzens. Eine Vielfalt von Änderungen in Anzahl und Verteilung konnten bereits in erkrankten Herzen beobachtet werden.

So berichtet Saéz et al. (92) von einer Reduktion der Expression von Connexin 43 im Arbeitsmyokard des Ventrikels bei Arrhythmie, Ischämie und Infarkt. Ähnliches konnten weitere Autoren beschreiben. Mit Hilfe konfokaler Lasermikroskopie erwiesen Peters et al. (83) eine verminderte Expression des Cx43-Proteins an Myokardbiopsien von Patienten mit Ischämie und hypertrophiertem Ventrikel als Folge einer Aortenstenose. Bei terminalen herzinsuffizienten Patienten mit ischämischer und dilatativer Kardiomyopathie konnte ebenfalls eine Reduktion der Cx43-Expression im linken Ventrikel erkannt werden (Dupont et al., 36). Zusätzlich zeigten sie bei Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie eine parallele Cx40-Expressionserhöhung, bei dilatativer Kardiomyopathie allerdings nicht. Ebenso fanden Bastide et al. (5) bei hypertensiven Ratten sowohl eine erhöhte Expression von Cx40 als auch eine verminderte Expression von Cx43. Im Gegensatz dazu war bei Modellen mit Vorhofflimmern neben einer reduzierten Expression von Cx40 keine Änderung in der Expression von Cx43 zu beobachten (Saéz et al, 92; van der Velden et al., 113).

Punktmutationen in der C-terminalen Domäne des Connexins 43 konnten ebenso mit Anomalien im kardiovaskulärem System in Zusammenhang gebracht werden (Britz-Cunningham et al., 10).

1.2.6 Veränderung der Anordnung der Connexine an den Myokardzellen

Smith et al. (103) konnte eine veränderte Verteilung der Cx43-Proteine im direkt an das Narbengewebe angrenzende Herzgewebe feststellen. Diese Proteine waren entgegen den vom Infarktbereich weiter entfernten Geweben nicht in den Disci intercalares, sondern waren diffus an der gesamten Oberfläche vertreten. Diese Veränderung konnten auch Saéz et al. (92), Saffitz et al. (93) und Sepp et al. (97) beobachten. Eine deutliche Reduktion der großen Gap Junction-Aggregate, die normalerweise in den Disci intercalares zu finden sind, zeigte Kaprielian et al. (58).

1.3 Natriuretische Peptide

1.3.1 Struktur, Synthese und Funktion der natriuretischen Peptide

Das atriale natriuretische Peptid (ANP, A-type natriuretic peptide, Atriopeptin) wird in den Kardiomyozyten im Vorhof der Herzens und dem Reizleitungssystem gebildet. Das Gen des ANPs ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms Eins lokalisiert. Nach Abspaltung eines Signalpeptids vom 151 Aminosäuren langen Vorläuferprotein wird das ANP-Prohormon in sekretorischen Vesikeln der Kardiomyozyten des Vorhofs gespeichert. Dieses Prohormon trennt sich in zwei Fragmente, die beide in den Blutkreislauf eingehen. Zum einen entsteht ein C-terminales 28-Aminosäuren-Peptid (ANP 99 - 126), zum anderen ein N-terminales 24-Aminosäuren-Fragment (ANP 1 - 98). Dieses über eine Disulfid-Brücke zyklisierte Peptid aus 28 Aminosäuren ist die Speicherform des ANP und der wichtigste Vertreter einer Familie von homologen Peptidhormonen, die nicht nur im Herzen, sondern auch im Gehirn und Endothel nachgewiesen werden. Ferner gehen einige Autoren davon aus, daß das N-terminale Fragment durch weitere Proteolyse für das Entstehen dreier Peptide (proANPs 1 – 30, 31 – 67 und 79 – 98) verantwortlich ist, die eventuell diuretische und / oder vasodilatierende Wirkung besitzen (Brockhoff et al., 11; Levin et al., 65; Wilkins et al., 126).

BNP wird wie ANP in den Kardiomyozyten des Herzens exprimiert (de Bold et al., 28; Durocher et al., 37; Takahashi et al., 108), dabei hauptsächlich im Ventrikel (Yasue et al., 129). Die Synthese erfolgt entsprechend der des ANPs als Prohormon. Das 134 Aminosäuren lange Vorläuferprotein spaltet das Signalpeptid ab und es

entsteht das 108 Aminosäure lange Prohormon. Durch enzymatische Spaltung wird entsprechend des ANPs ein N-terminales Fragment und das physiologisch aktive C-terminale 32 Aminosäuren-Peptid. Im Gegensatz zu ANP wird BNP nur in seiner prozessierten Form und nur in geringen Mengen in den sekretorischen Vesikeln in den Kardiomyozyten gespeichert (Levin et al., 65; Yasue et al., 129).

Die wichtigsten Wirkungen des physiologisch aktiven ANP und BNP sind in erster Linie die Entlastung des Herzens mit der Förderung der Diurese und Natriurese, die periphere Vasodilatation und die Hemmung der Renin- und Aldosteron-Sekretion (Brockhoff et al., 11; Ogawa et al., 78; Wilkins et al., 126; Yasue et al., 129).

C-Typ natriuretisches Peptid (CNP) ist das dritte identifizierte der Familie der natriuretischen Peptide. Es setzt sich aus 22 Aminosäuren zusammen und wurde vorerst in Schweinehirnen isoliert, später jedoch auch in peripheren Organen gefunden (Levin et al., 65; Ogawa et al., 78; Sudoh et al., 107). Im Myokard ist CNP nach Angaben von Takahashi et al. (108) allerdings nicht signifikant exprimiert. Während die Strukturen von ANP und CNP in vielen verschiedenen Spezies erhalten geblieben ist, zeigt BNP eine Spezies-Spezifität (Wilkins et al., 126).

Im Gegensatz zu ANP und BNP ist das CNP weit weniger gut charakterisiert und besitzt zwar stärkere vasodilatierende Wirkung, jedoch keine diuretische Aktivität (Brockhoff et al., 11; Levin et al., 65). Im Gegensatz zu ANP und BNP agiert CNP nicht als kardiales Hormon, sondern als Neuropeptid oder als Regulator des Gefäßtonus über autokrine und parakrine Wirkungsmechanismen. Somit sind die natriuretischen Peptide allgemein an der Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushaltes und der Blutdruckregulation beteiligt (Ogawa et al., 78; Wei et al., 122; Wilkins et al., 126).

Volumenexpansion und Drucksteigerung in Vorhof und Ventrikel bewirkt im Herzen eine erhöhte ANP- und BNP-Konzentration im Blut (Levin et al., 65; de Bold et al., 28; Yasue et al., 129). Mit deren Hilfe wird der periphere und pulmonale Widerstand und somit der systemische und pulmonale Druck erniedrigt. Ebenso wird ein verminderter venöser Rückstrom und geringerer enddiastolischer Druck erreicht; somit resultiert ein erhöhtes Herzzeitvolumen mit verbesserter diastolischer Funktion (Levin et al., 65; Wilkins et al., 126).

1.3.2 Die Familie der natriuretischen Peptide

Die Familie der natriuretischen Peptide besteht aus drei Peptiden: Atriales natriuretisches Peptid (ANP), brain natriuretisches Peptid (BNP) und C-type natriuretisches Peptid (CNP). Diese besitzen eine große Übereinstimmung in Bezug auf die Aminosäuresequenzen und eine Schleife in ihrer Struktur (Brockhoff et al., 11). Die biologisch aktiven Formen enthalten alle eine charakteristische Ringstruktur aus 17 Aminosäuren mit einer Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinresten (de Bold et al., 29; Ogawa et al., 78).

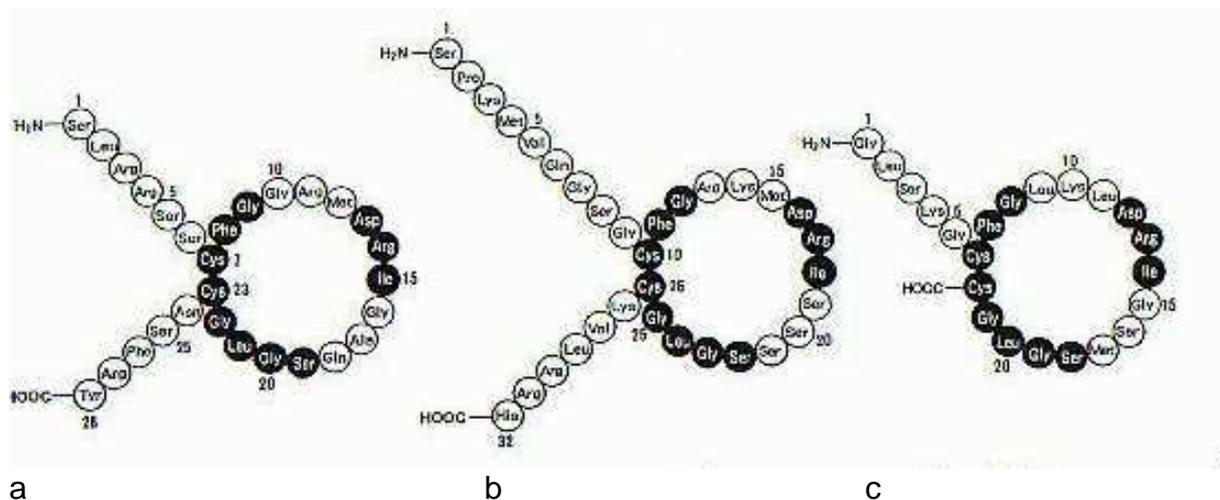


Abbildung 2: Darstellung der Struktur der Familie der natriuretischen Peptide, a: ANP, b: BNP, c: CNP. Die bei allen Peptiden identischen Aminosäuren sind dunkel gekennzeichnet.

1.3.3 Im Herzen synthetisierte natriuretische Peptide und ihre Lokalisation

ANP-mRNA ist in vielen Geweben vorhanden, allerdings wird ANP im den Vorhöfen des Herzens sezerniert (Wilkins et al., 126; Yasue et al., 129). Die ANP-Expression wird postnatal herunterreguliert und ist somit vorhofspezifisch. Die ANP-mRNA-Expression ist nach Angaben von Hosoda et al. (51) im linken und rechten Vorhof gleich stark, jedoch deutlich höher als im linken und rechten Ventrikel.

BNP, das primär in Homogenisaten von Schweinehirnen (Sudoh et al., 106; Ogawa et al., 78; Yasue et al., 129) isoliert wurde, wird ebenso im Blutkreislauf und in höchster Konzentration im Herzgewebe gefunden (Brockhoff et al., 11; Wilkins et al., 126). ANP und BNP werden nach Angaben von Wilkins et al. (126) zwar in den

Vorhöfen gebildet, jedoch wird angenommen, dass eine große Menge des im Blut zirkulierenden BNPs aus den Ventrikeln stammt (Ogawa et al., 78; Yasue et al., 129). Hosoda et al. (51) berichtet über eine kammer-spezifische BNP-mRNA-Expression. Somit ist diese im rechten Vorhof höher als im linken, dennoch höher als in den beiden Ventrikeln. Auch wenn - wie bereits angesprochen - die BNP-mRNA-Expression in den Vorhöfen höher ist, wird unter Berücksichtigung der deutlich höheren Gewebemasse der Ventrikel 77 % der im Herzen synthetisierten BNP-mRNA in den beiden Ventrikeln produziert (Hosoda et al., 51).

CNP, das prominenteste Neuropeptid in der Familie der natriuretischen Peptide, wird hauptsächlich im Gehirn gefunden, die Plasmakonzentrationen im zirkulierenden Blut sind sehr gering. Es wird auch spekuliert, dass CNP in Gefäßendothelzellen synthetisiert wird (Wilkins et al., 126).

1.3.4 Rezeptoren und Metabolismus

Ihre physiologische Aktivität erhalten die natriuretischen Peptide erst nach Kopplung an spezifischen natriuretischen Rezeptoren. Drei dieser Rezeptoren konnten bereits geklont und alphabetisch benannt werden.

NPR-A (natriuretic peptide receptor-A) und NPR-B (natriuretic peptide receptor-B) - dominant im Gehirn - gehören zu den Rezeptor-Guanylylcyclasen und bestehen aus einer extrazellulären Domäne, einer einzelnen Transmembrandomäne und einem intrazellulären Ende, das die Konversion des Guanosin-triphosphates in das Guanosinmonophosphat katalysiert. Die Bindung der natriuretischen Peptide an der extrazellulären Seite der spezifischen Rezeptoren bewirkt eine Veränderung der Aktivität der cytoplasmatischen katalysierenden Domäne. Dabei wird die Guanylylcyclase aktiviert und es entsteht das cGMP als intrazellulärer Mediator, der Proteinkinasen aktiviert (Levin et al., 65; Wilkins et al., 126).

ANP hat die höchste Affinität zu NPR-A, gefolgt von BNP und schließlich CNP. Die Reihenfolge für NPR-B ist umgekehrt, d. h. CNP hat die höchste Affinität zu NPR-B, gefolgt von BNP; ANP hat die niedrigste Affinität. Dementsprechend können NPR-A und NPR-B als prinzipielle Rezeptoren für ANP und CNP betrachtet werden. Ein Guanylylcyclase-Rezeptor, dem gegenüber BNP eine hohe Affinität zeigt, ist noch nicht identifiziert worden (Levin et al., 65; Ogawa et al., 78; Wilkins et al., 126).

Der am meist verbreitete der drei Rezeptoren ist NPR-C (natriuretic peptide receptor-C). Diesem fehlt die intrazelluläre Domäne und ist nicht eindeutig an ein Second-messenger-System geknüpft. Ihm wird eher die Funktion eines Clearance-Rezeptors zugesprochen zur Regulation der Plasmakonzentration der natriuretischen Peptide. Es gibt auch Berichte darüber, dass dieser Rezeptor möglicherweise die Adenylatcyclase inhibiert und eine Phospholipaseaktivität in einigen Geweben bewirkt. Der NPR-C ist ein Homodimer-Protein, jedes Monomer besitzt eine Transmembrandomäne. Alle drei natriuretischen Peptide haben dieselbe Affinität. (Levin et al., 65; Wilkins et al., 126).

Wilkins et al. (126) beschreibt eine deutlich niedrigere Affinität von BNP als ANP für NPR-C.

Die Inaktivierung der natriuretischen Peptide geschieht hauptsächlich in der Niere durch eine neutrale Endopeptidase, Ektoenzyme mit einer weit gefächerten Substratspezifität und einer weiten Gewebeverteilung (Lunge und Niere eingeschlossen), jedoch ebenso über sog. Clearance-Rezeptoren durch Bindung des Hormons. Die neutrale Endopeptidase inaktiviert alle drei natriuretischen Peptide, die höchste Affinität hat sie für CNP, gefolgt von ANP und schließlich BNP. Die Kombination aus Inaktivierung durch eine neutrale Endopeptidase und durch die Bindung an einen NPR-C-Rezeptor hat den größten Effekt (Wilkins et al., 126).

1.3.5 Funktion der natriuretischen Peptide

In einem Experiment an Ratten erkannten de Bold et al. (27) erstmals, dass der in Ratten injizierte Vorhofextrakt eine stark natriuretische und diuretische Wirkung mit mehr als 30-facher Natrium- und Chlorid- und 10-facher Wasser-Ausscheidung hatte. Ebenso erfolgte eine Blutdrucksenkung und Hämatokriterhöhung (Levin et al., 65). Vier Jahre später konnte das erste natriuretische Peptid, das ANP, isoliert und charakterisiert werden. 1988 und 1990 wurden zwei weitere natriuretische Peptide, das BNP und das CNP, isoliert (Ogawa et al., 78; Sudoh et al., 106 und 07).

Es gab bereits einige Studien mit Mäusen, deren Konzentrationen an natriuretischen Peptiden im Plasma verändert wurden. So hatten Mäuse mit einer Überexpression von ANP einen erniedrigten systemischen Blutdruck und boten einen Schutz vor hypoxiebedingter pulmonaler Hypertension. Im Gegensatz dazu zeigten Mäuse mit fehlendem ANP (ANP^{-/-}) einen höheren systemischen Blutdruck. Diese

antworteten bei salzreicher Ernährung mit erhöhtem Natrium im Blut und einer akuten intravaskulären Volumensteigerung, zeigten aber eine schwache natriuretische und diuretische Wirkung bei akuter Volumensteigerung während einer salzarmen Ernährung. Heterozygote Mäuse (ANP^{+/+}) hatten normale Blutdrücke (Levin et al., 65; Wilkins et al., 126).

1.3.6 Veränderungen der Expression der natriuretischen Peptide bei Herzerkrankungen

Bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz und akutem Herzinfarkt konnten bereits erhöhte ANP- und BNP-Sekretionen beobachtet werden (Brockhoff et al., 11). Plasmakonzentrationen von ANP und BNP steigen sehr rasch im Krankheitsverlauf und im Verhältnis zum Grad der Erkrankung an (Wei et al., 122; Wilkins et al., 126; Yasue et al., 129). Mit Hilfe der erhöhten Werte im Plasma können in den ersten drei Tagen nach Herzinfarkt diejenigen Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion identifiziert werden, welche von einer frühen Behandlung mit ACE-Hemmer (ACE = angiotensin-converting enzyme) profitieren würden (Wilkins et al., 126). In der Frühphase des Myokardinfarktes steigt die BNP-Plasmakonzentration deutlich an, während die ANP-Plasmakonzentration schwächer ansteigt (Ogawa et al., 78). Yasue et al. (129) berichten von mehreren Untersuchungen chronisch herzinsuffizienter Patienten. Diese zeigten eine erhöhte ANP- und BNP-mRNA-Expression und ein damit verbundener erhöhter ANP- und BNP-Plasmaspiegel. Bedeutend war die Korrelation der Plasmaspiegel der natriuretischen Peptide (ANP und BNP) mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz. Bei leichter Herzinsuffizienz erhöht sich die ANP-mRNA-Expression und Sekretion im Atrium, bei fortschreitender Herzinsuffizienz ergab sich zusätzlich eine ANP-mRNA-Expression und -Sekretion im linken Ventrikel (de Bold et al., 29). Levin et al. (65) berichten über eine bei gesunden Probanden geringe ANP-Produktion im Ventrikel und eine erhöhte ANP-Sekretion bei fetalen, neonatalen und hypertrophierten Herzen. Ähnlich verhält sich die BNP-mRNA-Expression und -Sekretion bei diesen chronisch herzinsuffizienten Patienten, während der größere Anteil der BNP-mRNA-Expression im Ventrikel stattfindet (Brockhoff et al., 11; Yasue et al., 129). Das in Atrium und Ventrikel exprimierte BNP ist dabei deutlich erhöht, sodass das bei gesunden Probanden eigentlich niedrigere BNP die ANP-Menge bei fortschreitender Herzinsuffizienz sogar

übersteigt (Wei et al., 122). Somit spekulierten Yasue et al. (129) damit, den ANP- und BNP-Spiegel als Marker für den Schweregrad einer Herzinsuffizienz mit linksventrikulärer Dysfunktion einzusetzen. Weiterhin korrelieren die Plasmakonzentrationen von ANP und BNP nicht nur mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz, sondern auch mit hämodynamischen Parametern (Yasue et al., 129; Yoshimura et al., 132).

Der Zusammenhang von hämodynamischer Belastung, kompensatorischer Hypertrophie und den erhöhten Plasmakonzentrationsspiegel von ANP und BNP sind bis heute noch nicht ganz aufgeklärt (de Bold et al., 28 und 29). Allerdings werden die BNP Spiegel bereits diagnostisch genutzt.

1.3.7 Therapeutisches Potential

Kurzinfusionen mit ANP und BNP bei Patienten mit Herzinsuffizienz zeigten positive Effekte. Sie bewirkten eine Erniedrigung sowohl des rechtsatrialen und pulmonalen Drucks als auch der Renin- und Aldosteronkonzentrationen. Das Schlagvolumen, die Natriuresis und Diuresis waren bei gleichbleibender glomerulären Filtrationsrate erhöht (de Bold et al., 27). Patienten mit Hypertonie reagierten ebenfalls positiv auf die Infusion dieser Peptide. Essentielle Hypertoniker zeigten nach fünftägiger Infusion mit niedrig dosiertem ANP einen niedrigeren Blutdruck, der drei Tage anhielt. Andere Applikationsarten wie nasal und oral sind in Überlegung, da eine Infusionstherapie über längere Zeit nicht praktikabel wäre. Ogawa et al. (78) sind der Ansicht, dass das BNP aufgrund seiner deutlich früheren Expression im Vergleich zu ANP ein besseres Mittel in akuten Fällen wäre. Ein weiterer Schritt wäre, eine orale Verabreichung eines NEP-Inhibitor (Inhibitor der neutralen Endopeptidase), die den Plasmaspiegel der natriuretischen Peptide erhöht. Eine Kombination mit einem ACE-Hemmer (Angiotensin-Converting-Enzym-Inhibitor), der zusätzlich Angiotensin II vermindert, wäre theoretisch eine optimale Kombination, um den klinischen Verlauf positiv zu beeinflussen (Levin et al., 65; Wilkins et al., 126). Brockhoff et al. (11) zeigen, dass das Plasma-BNP möglicherweise eine Bedeutung als Prognosefaktor bei Patienten mit Herzinsuffizienz und Myokardinfarkt hat.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Herzerkrankungen sind heutzutage nicht selten und die Herzinsuffizienz hat eine hohe Morbidität. Neben der Klinik werden bildgebende Verfahren als Entscheidungshilfen für das therapeutische Procedere herangezogen. Wünschenswert wäre jedoch, nicht nur Informationen über den Funktionszustand der Herzmuskelzelle zu gewinnen, sondern auch über den Regulationszustand mit der Möglichkeit therapeutisch einzugreifen.

Ziel der Arbeit ist es, aus Herzmuskelproben des rechten und linken Vorhofs und des Ventrikels durch den quantitativen Nachweis von Transkripten die Aktivität der pathophysiologisch relevanten Gene hCx40, hCx43, hANP und hBNP im Sinne eines molekularen Stagings zu bestimmen. Interessant ist die möglicherweise differente Expression von Connexinen und natriuretischen Peptiden bei verschiedenen Herzerkrankungen (Vitium, dilatative und ischämische Kardiomyopathie) sowie im Vergleich zu der herzgesunder Probanden, da diese wichtige Proteine für die Vorlast-/Nachlastregulation sowie der Signaltransduktion des Herzens sind.

Mit Hilfe der quantitativen PCR (TaqManTM-PCR) soll die Kenntnis über das Genexpressionsmuster der Herzmuskelzellen erweitert werden. Dadurch sind neue Perspektiven für ein differenziertes therapeutisches Vorgehen bei Herzerkrankungen und deren Spätkomplikationen sowie möglicherweise Ansatzpunkte für gentherapeutische Behandlungsstrategien zu erhoffen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Probenmaterial

Als Material für die beschriebenen Untersuchungen diente Herzgewebe, welches nach Entnahme im Klinikum Großhadern sofort in flüssigen Stickstoff schockgefroren wurde. Die längerfristige Aufbewahrung des Materials erfolgte im Stickstofftank. Dabei handelte es sich um Gewebematerial aus den linken und rechten Vorhöfen und Ventrikeln von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM), ischämischer Kardiomyopathie (ICM) bzw. angeborenen Herzfehlern. Als Kontrolle für die Expression von hCx40, hCx43, hGH, hANP, hBNP und h18s wurde ebenfalls nach Entnahme in flüssigen Stickstoff eingefrorenes Herzgewebe aus den Vorhöfen und Herzkammern gesunder Personen verwendet.

2.1.2 Chemikalien und sonstige Reagenzien

Für die Experimente wurden ausschließlich Substanzen höchster Reinheitsstufe verwendet:

Acrylamidlösung	Bio-Rad, München
Agar	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Agarosegel	GibcoBRL Life Technologies, Eggenstein
Ampicillin	Gerbu, Gaiberg
APS-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Chlorophorm	Merck, Darmstadt
CTAB-Lösung	Sigma, Deisenhofen
DEPC-Wasser	Sigma, Deisenhofen
1 Kb DNA ladder	GibcoBRL Life Technologies, Eggenstein
dNTP	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
DTT	GibcoBRL Life Technologies, Eggenstein
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen

Guanidiniumisothiocyanat 4M	Sigma, Deisenhofen
Harnstoff	Sigma, Deisenhofen
IPTG	Gerbu, Gaiberg
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
LiChrosolv	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumpuffer	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Sigma, Darmstadt
NaOAc (pH 5,4)	Sigma, Deisenhofen
Phenol (pH 4,3)	Sigma, Deisenhofen
Plasmid Maxi Kit 25	QUIAGEN, Hilden
Ready-Mix (BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reactions mit AmpliTaq® DNA Polymerase FS)	PE Applied Biosystems
Sarcosyl 10%	Sigma, Deisenhofen
SDS	Merck, Darmstadt
Sodiumcitrat pH 8,1	Sigma, Deisenhofen
TaqMan PCR Core Reagent Kit	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
TEMED	Sigma, Deisenhofen
TE-Puffer pH 8,0 (bestehend aus 20mM Tris pH 8,0 und 1mM EDTA pH 8,0)	Ambion, Austin, Texas, USA
TOPO-TA Cloning Kit	Invitrogen
Tris	Merck, Darmstadt
Zitronensäure 2M	Sigma, Deisenhofen

2.1.3 Herstellung einzelner Lösungen

<u>DNA/RNA-Auftragspuffer:</u> 15 %	Ficoll
(= „loading buffer“) 0,25 %	Bromphenolblau
0,25 %	Xylencyanol

<u>FSB:</u>	250 mM	TrisHCl (pH 3 bei Raumtemperatur)
	375 mM	KCl
	15 mM	MgCl ₂

<u>Solution D:</u>	25 mM	Sodiumcitrat (pH 8,1)
	2 M	Zitronensäure zur pH-Einstellung auf pH 7,0
	4 M	Guanidiniumisothiocyanat
	0,5 %	Sarcosyl

Die Herstellung erfolgte mit DEPC-Wasser.

Vor Verwendung wurden 100 µl 2-Mercaptoethanol zu 14 ml dieser Lösung zugesetzt. Dadurch war die Lagerung bei 4 °C bis zu drei Wochen möglich.

<u>STET-Lösung:</u>	8 % (w/v)	Saccharose
	50 mM	Tris-HCl pH 8,0
	50 mM	EDTA
	0,1 %	Triton X-100

<u>10xTBE:</u>	1,35 M	Tris
	0,45 M	Borsäure
	25 mM	EDTA

2.1.4 Geräte

Brutschrank	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammern Horizon 58	GibcoBRL Life Technologies, Eggenstein
Homogenisator Polytron	Kinematica, Littau, Schweiz
Kühlzentrifuge Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
N ² -Behälter	KGW Isotherm
Pipetman	Abimed
Photometer (BioPhotometer)	Eppendorf, Hamburg
Schüttler (Certomat® HK + R)	Braun, Melsungen
Sequenzier	
(ABI PRISM™ 377-DNA-Sequenzier)	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
TaqMan™ (ABI PRISM™ 7700)	

Sequence Detector)	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Thermocycler (MJ Research PTC-225 Peltier Thermal Cycler)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Thermocycler (Thermocycler 60)	bio-med, Theres
Tischzentrifuge (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries
UV-Transluminator	MWG Biotech
Thermodrucker (Videocopy processor)	Mitsubishi
Vakuumbzentrifuge (Speed-Vac)	Bachofer, Reutlingen
37 °C-Wärmeschrank	Heraeus, Hanau
Waage	Sartorius
Wasserbad (Multi-Blok® Heater LAB-LINE®)	Köttermann Labortechnik, Uetze-Hänigsen
Zentrifuge (Omnifuge 2,0 RS)	Haereus, Hanau

2.1.5 Enzyme

AmpliTaq Gold™	Applied Biosystems, Weiterstadt
DNAse (RNAse-frei)	Roche Diagnostics, Mannheim
Oligonukleotide HPLC-gereinigt (Primer)	Interactiva
Random Hexamer Primer pd(N)6	Roche-Diagnostics, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs, Frankfurt
RNAsin-Ribonuklease-Inhibitor	Promega, Mannheim
SuperScript™ II RNAse H ⁻ Reverse Transkriptase	GibcoBRL Life Technologies, Eggenstein
TaqMan-Primer	Thermo Hybaid, Ulm
TaqMan-Sonden (gereinigt)	Eurogentec, Seraing, Belgien

2.1.6 Plasmidvektoren

Für die direkte Klonierung von PCR-Produkten wurde der pCR®2.1 TOPO TA Cloning®-Vektor der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande) verwendet.

2.1.7 Bakterienstämme

Zur Klonierung und Gewinnung von Plasmid-DNA wurde mit One Shot® TOP10F'-Zellen der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande) gearbeitet.

2.1.8 Kulturmedien für Bakterien

<u>LB-Medium:</u>	5 g	Hefeextrakt
	10 g	Bacto-Trypton
	10 g	Natriumchlorid

<u>SOC-Medium:</u>	20 g	Bacto-Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	10 mM	Natriumchlorid
	2,5 mM	Kaliumchlorid
	10 mM	Magnesiumchlorid
	10 mM	Magnesiumsulfat
	20 mM	Glucose

Die Mengenangaben beziehen sich auf einen Liter Medium unter Verwendung von deionisiertem Wasser. Die Medien wurden nach dem Ansetzen autoklaviert.

Zur Herstellung der X-Gal-IPTG-Ampicillin-Agarplatten wurden dem jeweiligen Medium vor dem Autoklavieren 15 g Agar / Liter hinzugefügt. Vor dem Gießen der Platten wurde dem geschmolzenen Agar Ampicillin (50 µg / ml) und zusätzlich für die Blau/Weiß-Selektion IPTG (f.c. 0,2 mM) und X-Gal (f.c. 0,004 %) zugesetzt. Dabei wurden Ampicillin und IPTG vor deren Verwendung sterilisiert.

2.1.9 Oligonukleotide für Klonierung und Sequenzierung

2.1.9.1 Primer für 18s-rRNA

Primer for	5'-GGCGGCTTTGGTGA CTCTAG-3'
Primer rev	5'-CGCGGGACACTCAGCTAAG-3'

2.1.9.2 Primer für hCx40

Primer for	5'-GTCTCTACGCCCTCTCTGGTGTAC-3'
Primer rev	5'-GAAAGCTGGCACTTAGCCATGTA-3'

2.1.9.3 Primer für hCx43

Primer for	5'-ACCTGGGCTAATTACAGTGCAGAA-3'
Primer rev	5'-CCGCTCATTACATACACAGAAC-3'

2.1.9.4 Primer für hGH

Primer for	5'-AATTCCATGGCACCGTCAAG-3'
Primer rev	5'-GGAAGGCCATGCCAGTGA-3'

2.1.9.5 Primer für hANP

Primer for	5'-GAGCAGCAAGCAGTGGATTG-3'
Primer rev	5'-TCCTCCCTGGCTGTTATCTTCA-3'

2.1.9.6 Primer für hBNP

Primer for	5'-GGATCCCCAGACAGCACCTT-3'
Primer rev	5'-AAGCCCCTTGTGGAATCAGAA-3'

2.1.10 Primer und Sonden für TaqMan™-PCR-Assays

Die für die Polymerase-Kettenreaktion verwendeten Oligonukleotide wurden als Auftragssynthesen von der Firma Interactiva (Ulm) hergestellt. Die Sonden für den TaqMan™-PCR-Assay lieferte die Firma Eurogentec.

2.1.10.1 Quantitative Bestimmung der 18s-rRNA

Primer for	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'
Primer rev	5'-TCCAATTACAGGGCCTCGAA-3'
Sonde	5'-CAGGCGCGCAAATTACCCACTCC-3'

2.1.10.2 Quantitative Bestimmung der hCx40

Primer for	5'-TCCAGGGCACTCTGCTCAA-3'
Primer rev	5'-TGAAGCCACCTCCATGGT-3'
Sonde	5'-TATGTGTGCAGCATCCTGATCCGCA-3'

2.1.10.3 Quantitative Bestimmung der hCx43

Primer for	5'-GAATTACAGCCACTAGCCATTGTG-3'
Primer rev	5'-CAGGTCATCAGGCCGAGGT-3'
Sonde	5'-CAGCGACCTTCAAGCAGAGCCAGC-3'

2.1.10.4 Quantitative Bestimmung der hGH

Primer for	5'-CATGGGTGTGAACCATGAGAAGTA-3'
Primer rev	5'-GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA-3'
Sonde	5'-CAACAGCCTCAAGATCATCAGCAATGCC-3'

2.1.10.5 Quantitative Bestimmung der hANP

Primer for	5'-CCAGAGCTAATCCCATGTACAATG-3'
Primer rev	5'-TTCTTCAAATGGTCCAGCAA-3'
Sonde	5'-CCAACGCAGACCTGATGGATTTCAAGAAT-3'

2.1.10.6 Quantitative Bestimmung der hBNP

Primer for	5'-GGCAGCCCCGGTTCAG-3'
Primer rev	5'-CGACAGTTTGCCCTGCAAAT-3'
Sonde	5'-TGCTCCTGTAACCCGGACGTTTCCA-3'

2.2 Methoden

2.2.1 Vorbehandlung des Probenmaterials

2.2.1.1 Isolierung der Gesamt-RNA

2.2.1.1.1 Vorbemerkungen

Durch ubiquitär vorkommende RNA-abbauende Enzyme (RNAsen) besteht bei der Präparation und dem Arbeiten mit RNA stets die Gefahr, daß RNA zerstört wird. Deshalb muss bereits bei der Isolierung von RNA peinlichst genau darauf geachtet werden, dass sowohl der Arbeitsplatz als auch das verwendete Material RNase-frei sind. Nicht nur das Tragen von Handschuhen und steriles Arbeiten, sondern auch die speziell nur für Arbeiten mit RNA verwendeten Lösungen und Geräte waren notwendige Voraussetzungen, um eine Kontamination zu vermeiden. Da RNAsen sehr resistente Enzyme sind, wurden Metall- und Glaswaren nach gründlicher Reinigung und anschließendem Spülen mit DEPC-Wasser sterilisiert, Plastikmaterial wie Pipettenspitzen als sterile Einmalartikel verwendet und Lösungen stets mit DEPC behandeltem Wasser angesetzt. Zur Herstellung des DEPC-Wassers wurde dem destillierten Wasser 0,1 % DEPC zugesetzt, anschließend eine Stunde unter Lichtausschluss gerührt und autoklaviert.

2.2.1.1.2 Isolierung der RNA

In dieser Arbeit wurde in flüssigen Stickstoff eingefrorenes Herzgewebe verwendet, wobei die jeweils eingesetzte Menge zwischen 30 und 50 mg betrug. Nach genauer Gewichtsbestimmung wurden 0,75 ml Phenol (pH 4,3), 150 µl Chloroform / Isoamylalkohol (25 : 1) und 75 µl zwei molarer NaOAc (pH 5,4) zugegeben und die Lösung anschließend auf Eis gestellt. Beim Phenol war darauf zu achten, dass der pH unter sieben lag, da sonst nicht selektiv RNA, sondern RNA und DNA gemeinsam isoliert werden würde. Nach Zugabe von 0,75 ml Solution D / Mercaptoethanol (140 : 1) wurde die Probe homogenisiert und sofort in ein 2ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überpipettiert, 10 Sekunden mit dem Vortexer gemischt und 10 bis 30 Minuten auf Eis gestellt. Bei der Homogenisierung wurde eine Zeit zwischen 45 und

60 Sekunden bei einer DPH-Zahl von 30 000 gewählt, da bei zu kurzer Homogenisierungszeit die Gefahr einer DNA-Verunreinigung und bei zu langer Zeit die Gefahr degradierter RNA gegeben ist. Anschließend wurden die Proben 15 Minuten bei 12 000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in 0,75 ml Isoamylalkohol gegeben, um das Phenol zu entfernen, welches die RNA zerstören würde. Dabei ist genau darauf zu achten, die Interphase nicht mitzupipettieren, um eine Verunreinigung mit Proteinen und DNA zu vermeiden. Nach 10 Sekunden Vortexen und 10 Minuten Inkubation auf Eis folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 1200 UpM und 4 °C. Die dabei entstandene, milchige Phase wurde in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt, das 0,5 ml Isopropanol enthielt. Nach 10 Sekunden Mischen wurde die RNA mindestens 20 bis 30 Minuten bei -80°C gefällt. Nach erneutem 15-minütigem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und 500 µl 75 %iges Ethanol zugegeben. Nach einer Minute wurde nochmals dekantiert, erneut drei Minuten zentrifugiert und der Rest abgeschüttet. Mit Hilfe des auf 37 °C vorgeheizten Wasserbades wurden letzte Reste des Ethanols entfernt, um eine durch das Ethanol verursachte Enzymhemmung zu verhindern.

Vor sich anschließender Photometermessung wurden die bereits in 30 µl DEPC-Wasser gelösten Pellets erneut 1 : 50 verdünnt.

2.2.1.1.3 Entfernung kontaminierender DNA

Die nun isolierte RNA wird anschließend mit RNase-freier DNase vollständig von kontaminierender genomischer DNA befreit. Dazu erfolgte ein DNase-Ansatz mit einer U DNase pro µg RNA:

		Beispiel:
Ges. Volumen RNA	x µl	49 µl
DNase	x µl	5 µl
RNasin	2,5 µl	2,5 µl
Mg-Puffer (10-fach konzentriert)	10 µl	10 µl
DEPC-Wasser	ad 100 µl	33,5 µl

Nach einer Inkubation von 45 Minuten bei 37 °C wurde der Ansatz ad 250 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt, geschüttelt und zur Inaktivierung des Enzyms einer erneuten Phenol / Chloroform-Extraktion mit halber Menge unterzogen, um die

DNase vollständig zu entfernen. Die durch Alkoholfällung gewonnenen Pellets wurden in 40 µl DEPC-Wasser aufgenommen und weiter 1 : 20 verdünnt.

2.2.1.1.4 Bestimmung der Konzentration der präparierten RNA

Bei der Konzentrationsbestimmung wurde die optische Dichte zur Abschätzung der RNA-Konzentration herangezogen. Dabei wurde mit Hilfe des Photometers die Absorption bei 260 nm bestimmt.

Folgende Formel wurde verwendet:

Konzentration = Koeffizient für RNA x Verdünnung x A 260

Dabei entspricht 1 OD 260 (A (260)) 40 µg / ml RNA.

2.2.1.1.5 Bestimmung der Qualität der präparierten RNA

Die Qualität der isolierten RNA wurde spektralphotometrisch und gelelektrophoretisch kontrolliert.

2.2.1.1.5.1 Spektralphotometrie

Die Qualitätsmessung der RNA erfolgte primär durch photometrische Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm und folgender Formel: *Qualität* = A 260 / A 280

Das Extraktionsverhältnis sollte bei guter RNA-Präparation größer 1,6 betragen; ansonsten muss von einer DNA-Verunreinigung ausgegangen und der DNase-Ansatz wiederholt werden.

2.2.1.1.5.2 Gelelektrophorese

Ist RNA in ausreichender Menge und Qualität vorhanden, schließt sich die Elektrophorese im horizontalen 1,5 %igen Agarosegel an. Dabei wird die zur Anode wandernde RNA der Größe nach aufgetrennt, da kleinere Moleküle schneller wandern als größere. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle ist proportional zum log 10 der Anzahl des Molekulargewichts. Je länger die Elektrophorese läuft, desto besser ist zwar die Auftrennung der unterschiedlich großen Moleküle, die Banden erscheinen allerdings unschärfer. Die Auftrennung der RNA in seine zwei typischen Banden, der 18S- und 28S-RNA, ist auch von der Agarosekonzentration des Gels abhängig, wobei sich hier eine Konzentration von 1,5 % bewährte.

Nach Gießen des Gels und Einlegen eines Kammes zur Bildung von Taschen für das spätere Einbringen des Probenmaterials muss das Gel gut erhärtet sein. Nach Entfernen des Kammes wird das Gel zusammen mit der Gelplatte in die Elektrophoresekammer gelegt und so viel 1 x TBE-Puffer zugegeben, dass das Gel gerade bedeckt ist.

Anschließend werden die Proben in die Taschen des Gels pipettiert. Dabei wurde ein µl Probe mit neun µl DEPC-Wasser und zwei µl „loading buffer“ versetzt.

Als Kontrolle wurden fünf µl „1 Kb DNA ladder“ verwendet.

Nach Einlaufen der Proben wurde der Stromfluss kurzzeitig unterbrochen, das Gel entnommen und für drei Minuten in Ethidiumbromid gelegt. Anschließend wurde es erneut in die Elektrophoresekammer gelegt und die Elektrophorese fortgesetzt. Das Ethidiumbromid hat den Effekt, dass die Banden im UV-Licht sichtbar werden. Durch Bindung des Ethidiumbromids an die RNA fluoresziert diese intensiv orange. Bei Arbeiten mit Ethidiumbromid müssen spezielle Handschuhe getragen werden, da es sehr krebserregend ist! Ebenso muss bedacht werden, dass Ethidiumbromid als Sondermüll einzustufen ist!

Die Qualitätskontrolle erfolgte mit Hilfe eines UV-Transilluminators, der in einem abgedunkelten Raum steht. Dabei ist ein Gesichtschutz vor den UV-Strahlen notwendig!

Bei qualitativ guter und intakter RNA sollten die Kriterien zweier deutlicher und scharf abgrenzbarer Banden der 18S- und 28S-rRNA erfüllt sein, die bei

Denaturierung der RNA nicht eindeutig zu sehen sind.

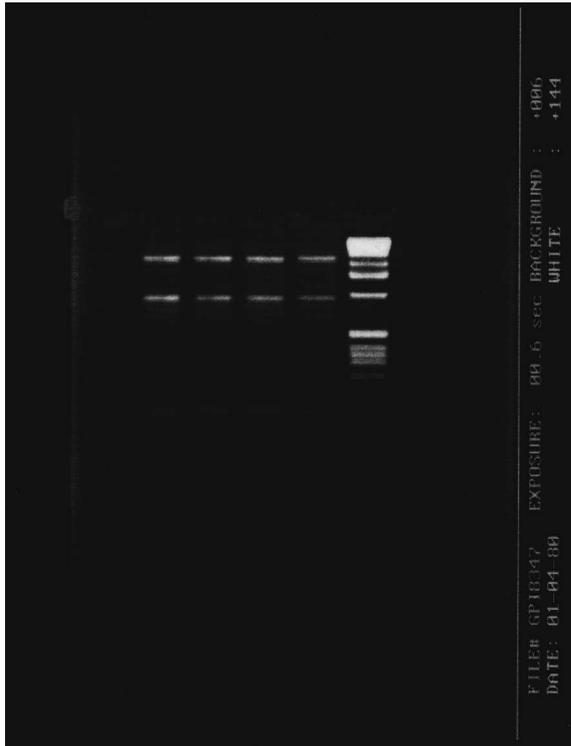


Abbildung 3: Gelelektrophoretische Darstellung der typischen Auftrennung der 18S- und 28S-Banden.

2.2.1.2 Überprüfung der DNA-Freiheit der isolierten RNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um eine Verunreinigung der RNA mit genomischer DNA auszuschließen, werden die Kontrollansätze dem so genannten PDH1-Test unterzogen. Der Nachweis genomischer DNA erfolgte nach der von Bauer et al. beschriebenen Methode. Dabei wurden bei der PCR-Reaktion 200 ng der isolierten RNA eingesetzt (entsprechend mit LiChrosolv vorverdünnt, sodass stets 200 ng RNA 10 µl Lösung entsprach). Weiterhin enthielt der Ansatz 100 µl dNTPs, 2,5 mM Magnesiumchlorid, 10 mM PCR-Puffer, 28 pmol der Primer PDH1-for (5'-GGTATGGATGAGGACCTGGA-3') und PDH1-rev (5'-CCTCCACAGCCCTCGACTAA-3'), eine Unit AmpliTaq Gold-Polymerase und entsprechend LiChrosolv, um einen Gesamtansatz von 50 µl zu erhalten. Die anschließende PCR-Reaktion erfolgte im DNA-Thermocycler (MJ Research). Der Ansatz wurde 40 x 30 Sekunden bei 95 °C, 30 Sekunden bei 60 °C und 30 Sekunden bei 72 °C inkubiert. Zusätzlich wurde eine Negativ- und Positiv-Kontrolle mitgeführt.

Der Nachweis des PCR-Produktes der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) mit insgesamt 185 Basenpaaren erfolgte durch Gelelektrophorese mit einem 2 %igem Agarosegel. Den je 10 µl Proben wurden zwei µl Auftragspuffer und ein 1-Kb-DNA-loader als Größenstandard beigemischt. Nach kurzzeitigem Laufen der Spannung im Methadonpuffer wurde diese unterbrochen, das Gel fünf Minuten in Methadonpuffer mit Ethidiumbromid eingelegt, anschließend mit Methadon gewaschen und erneut an die Spannung angelegt. Unter UV-Licht konnte das Ergebnis nun betrachtet und fotografiert werden. In der Regel wurden keine Verunreinigungen mit DNA festgestellt.

----- x ----- *Proben* ----- + - 1 kb

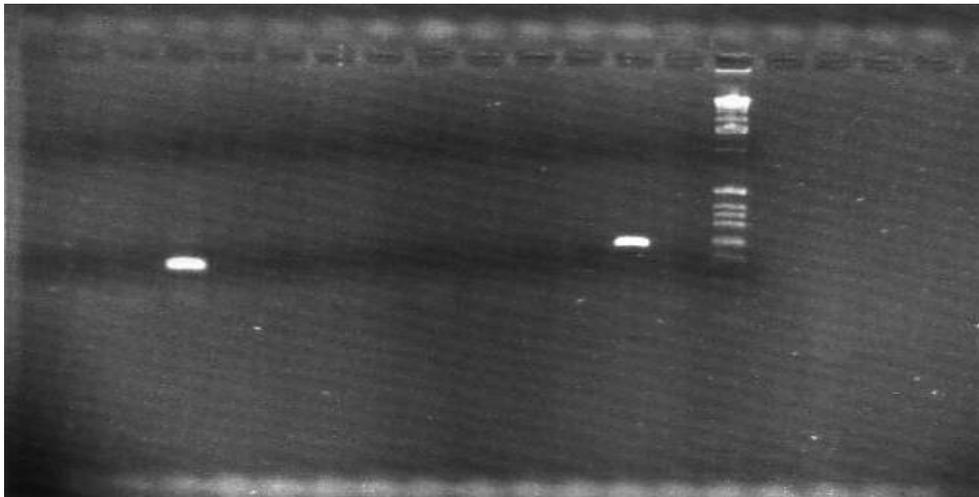


Abbildung 4: Gelelektrophoretische Darstellung der DNA-Freiheit der Proben. Links neben der Positivkontrolle wurden die Patientenproben aufgetragen. Zu erkennen ist eine Probe (mit x gekennzeichnet), die noch DNA enthält und eine deutliche Bande aufweist.

2.2.1.3 Entfernung kontaminierender DNA

Zeigt die Gelelektrophorese jedoch eine Kontamination mit DNA, muss diese entfernt werden, bevor die reverse Transkription erfolgen kann.

Folgender Ansatz ist dabei notwendig:

Gesamt-RNA	x µl
RNAsin	2,5 µl
10 x DNase-I-Puffer	10 µl
RNase-freie DNase I (Roche)	x µl
DEPC-Wasser	ad 100 µl

Dieser Ansatz wird gut, aber vorsichtig gemischt, 45 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, auf 250 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt und erneut einer Phenol / Chloroform-Extraktion mit den jeweils halbierten Mengen unterzogen.

2.2.1.4 Synthese der komplementären DNA (cDNA)

Bei der reversen Transkription wird durch die RNA-abhängige DNA-Polymerase der mRNA-Strang in den komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben. Da dieses Enzym zum Starten des Vorgangs ein Stück eines doppelsträngigen DNA:RNA-Hybrids mit einer freien 3'-OH-Gruppe benötigt, wurde einem Mikrogramm Gesamt-RNA zwei ng „random hexamer“-Primer (Roche Diagnostics, Mannheim) zugesetzt, ad 11 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt und 10 Minuten bei 68 °C inkubiert.

Anschließend wurde die Probe sofort auf Eis gestellt, kurz zentrifugiert und vier µl „5x first strand buffer“ (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM Kaliumchlorid, 15 mM Magnesiumchlorid), zwei µl 0,1 M DTT, ein µl 10 mM dNTP-Mix (bestehend aus 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), ein µl RNAsin-Ribonuklease-Inhibitor (= 40 U) und 1 µl Superscript II-RNase H⁻Reverse Transkriptase (= 200 U) zugesetzt. Zum Ausschluss einer DNA-Verunreinigung erfolgte eine analoge Kontrolle mit DEPC-Wasser anstelle der reversen Transkriptase. Nach Inkubation im MJ Research (10 Minuten bei 25 °C, 50 Minuten bei 42 °C und 10 Minuten bei 70 °C) wurden die Ansätze bei -80 °C eingefroren und gelagert.

2.2.2 Standardkurvenerstellung

Um die Quantifizierung mit dem TaqMan-System zu ermöglichen, müssen die Proben gegen einen entsprechenden Standard mit genau festgelegten Konzentrationen gemessen werden. Deshalb ist für die entsprechende Zielsequenz eine Standardkurvenerstellung notwendig.

2.2.2.1 Sequenzsuche

Die Sequenzsuche der einzelnen Genabschnitte erfolgte in der Datenbank der National Institutes of Health. Die DNA-Standards enthalten die entsprechende Sequenz der zu quantifizierenden Zielsequenz.

2.2.2.2 Sonden- und Primerdesign

Das möglichst optimale Sonden- und Primerdesign erfolgte mit Hilfe der Software „Primer Express“ Version 1.0 der Firma PE Applied Biosystems, Weiterstadt. Dabei mussten einige Kriterien berücksichtigt werden.

Bei der Auswahl der geeigneten Primer gab es strikte Regeln:

- Länge 18 bis 30 Basenpaare
- Guanin- und Cytosin-Gehalt: 20 bis 80 %
- Möglichst keine Poly(T)-Bereiche (Grund: unspezifische Bindungen)
- Möglichst keine palindromischen Sequenzabschnitte

Um die optimale Sonde zu erhalten, muss ein Strang ausgewählt werden, auf dem das 5'-Ende der Sonde nahe am 3'-Ende des PCR-Primers liegt, jedoch den Primer nicht überlappt. Ähnlich den Kriterien für die Primer gibt es auch für die Sonde Vorgaben wie Länge, GC-Gehalt und Schmelztemperatur.

Ebenso entscheidend für die Auswahl von Sonden und Primer ist, dass sowohl Sonde und Primer als auch die Primer untereinander keine Komplementarität aufweisen sollten. TaqMan-Primer wurden bei Thermo Hybaid (Ulm) und TaqMan-Sonden bei Eurogentec (Seraing, Belgien) synthetisiert.

2.2.2.3 Primerdesign für Klonierung

Beim Primerdesign für die Klonierung wurden die Primer ebenfalls mit dem „Primer Express“-Programm Version 1.0 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) ausgesucht. Diese nun entworfenen Primer amplifizieren Fragmente mit 500 bis 800 Basenpaaren und schließen die zuvor ausgewählten Sequenzen der TaqMan-Assaysysteme (sowohl Primer forward und reverse als auch die Sonde) ein.

2.2.2.4 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.2.2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die in vitro-Vervielfältigung spezifischer Desoxyribonukleinsäure (DNA) -Abschnitte ist mit Hilfe der DNA-Polymerase und zweier einzelsträngiger Primer möglich. Die 1985 von Kary Mullis entwickelte Methode wird als Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) bezeichnet und beruht auf der Eigenschaft der DNA-Polymerase, einzelsträngige DNA als Matrize für die Synthese eines neuen, komplementären Stranges zu benützen (Mullis et al., 76).

Die PCR erfolgt in 30 bis 50 sich ständig wiederholenden Zyklen. Ein Zyklus besteht dabei aus drei Abschnitten. Durch Erhitzen auf 94 bis 95 °C wird die DNA durch Zerstörung der Wasserstoffbrückenbindung denaturiert. Im nächsten Reaktionsschritt, dem sog. „Annealing“, lagern sich die beiden Primer bei Temperaturen zwischen 55 und 65 °C an die nun einzelsträngig vorliegende DNA, die als Matrize dient, an. Die dabei entstehenden kurzen doppelsträngigen Abschnitte dienen der DNA-Polymerase als Startpunkt. Im sog. Elongations- oder Extensionsschritt erfolgt anschließend die Synthese eines komplementären DNA-Stranges, indem die DNA-Polymerase freie Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate anlagert. Die Synthese erfolgte durch die Taq-Polymerase, dessen Temperaturoptimum bei 72 °C liegt. Durch erneute Denaturierung werden die beiden Stränge voneinander getrennt, und es kann mit Hilfe dieser neuen Matrizen erneut die Synthese gestartet werden. Dadurch kann idealerweise, d. h. bei 100 %iger Effizienz, eine Verdopplung der zu amplifizierenden Sequenz und somit eine exponentielle Anreicherung des Amplifikates entsprechender Länge erreicht werden.

Wegen der hohen Temperaturbelastungen setzt man bei der PCR eine

thermostabile DNA-Polymerase ein. In der Regel werden aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isolierte Taq-Polymerasen oder deren rekombinante Abkömmlinge verwendet (Chien et al., 1997; Saiki et al., 1994).

Das Vorgehen erfolgt nach dem Standardprotokoll für PCR-Reaktionen. Die optimalen Reaktionsbedingungen hinsichtlich Spezifität, Sensitivität, Effizienz und Reproduzierbarkeit variieren für jede PCR-Reaktion und müssen empirisch bestimmt werden.

Die Synthese der DNA-Fragmente für die nachfolgende Klonierung erfolgte mittels der Polymerase-Kettenreaktion aus humaner cDNA mit Hilfe der AmpliTaq Gold-Polymerase (Applied Biosystems, Weiterstadt). Dabei wurden die PCR-Reaktionsgemische in 0,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße angesetzt und die Reaktion in einem Thermocycler mit Deckelheizung durchgeführt. Ein typischer PCR-Standardansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl bestand aus:

10 µl	10 x Reaktionspuffer
1 µl	dNTP-Mix (bestehend aus dATP, dTTP, dGTP und dCTP; Stockkonzentration 1,25 mM)
0,75 µl	5'-Primer
0,75 µl	3'-Primer
0,25 µl	Taq-Polymerase
10 µl	cDNA (entspricht 1 µg)
ad 50 µl	Wasser

Dieser Ansatz wurde folgendem Programm unterzogen:

1. 10 Minuten 95 °C
2. 40 Zyklen mit:
 - 30 Sekunden 95 °C
 - 30 Sekunden 60 °C
 - 30 Sekunden 72 °C
3. 10 Minuten 72 °C

Die Überprüfung des PCR-Produktes erfolgte gelelektrophoretisch mit 1 %igem Agarosegel.

2.2.2.4.2 Klonierung

Für die Transformation müssen die zu klonierenden Sequenzen in einen Vektor eingebaut werden. Für diesen Zweck wurde das Topo TA Cloning-Kit der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande) verwendet. Er nützt die terminale Transferaseaktivität der Taq-Polymerase aus, durch die bei der Polymerase-Kettenreaktion an die 3'-Enden der Fragmente ein Adenosin-Rest angehängt wird. Komplementär dazu weist der mit dem Kit gelieferte linearisierte und die Topoisomerase anhängende pCR® 2.1-TOPO®-Klonierungsvektor an den 3'-Enden einen Thymidin-Überhang auf, sodass durch eine Basenpaarung die Insertion des PCR-Produktes möglich wird.

Nach gelelektrophoretischer Kontrolle des PCR-Produktes mit dem Nachweis einer diskreten einzelnen Bande wurden entsprechend der Stärke der Fluoreszenz zwischen 0,5 und vier µl PCR-Produkt mit sterilem Wasser ad vier µl aufgefüllt und ein µl pCR®-TOPO®-Vektor zugesetzt. Anschließend wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, ein µl „6 x TOPO®Cloning Stop Solution“ hinzu gegeben und die Probe auf Eis gestellt. Die „6 x TOPO®Cloning Stop Solution“ bewirkt die Ablösung der Topoisomerase von der DNA.



Abbildung 5: Gelelektrophoretische Kontrolle des PCR-Produktes am Beispiel von hCx40 und hCx43.

2.2.2.4.3 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation wurden TOP10F'-Zellen verwendet. Nach Zugabe von zwei µl Beta-Mercaptoethanol und zwei µl der TOPO®-Klonierungsreaktion, vorsichtigem Mischen, einer 30-minütigen Inkubation auf Eis, 30 Sekunden Hitzeschock bei 42 °C und nochmaliger Inkubation auf Eis wurden 250 µl SOC-Medium zupipettiert und der Ansatz 30 Minuten bei 37 °C in den horizontalen Luftschüttler gestellt. Anschließend wurden die Zellen 20 Sekunden zentrifugiert, 150 µl Überstand verworfen, ungefähr 100 µl aufgemischte Bakteriensuspension auf einer vorgewärmten Agarplatte ausgestrichen und über Nacht kopfüber im 37 °C-Wärmeschrank bebrütet. Diese Agarplatten enthielten bereits Ampicillin, IPTG und X-Gal, wie unter Kapitel Kulturmedien für Bakterien beschrieben. Diese speziell angefertigten Platten haben den Sinn, dass plasmidtragende Bakterien durch den Klonierungsvektor ampicillin- und kanamycinresistent sind und somit selektiert werden können. Ebenso enthält der Plasmid-Vektor die durch die multiplen Klonierungsschnittstellen unterbrochene Sequenz des lacZ-Gens, über das bei Transfektion in lac-negative Escherichia coli-Stämme eine Selektion der Bakterien mit erfolgreich kloniertem Insert mittels Blau-Weiß-Selektion durch Zusatz von IPTG / X-Gal zum Kulturmedium möglich ist.

Zur Analyse der positiven Klone wurden sieben weiße Kolonien (= plasmidtragende Bakterienkolonien) jeweils in drei ml LB-Medium, welches 50 µg / ml Ampicillin enthielt, gegeben und erneut über Nacht bei 37 °C im horizontalen Luftschüttler mit 200 UpM in 15 ml-Reaktionsgefäßen inkubiert.

Die Agarplatten können anschließend im Kühlschrank, mit Parafilm umwickelt, mehrere Wochen gelagert werden.

2.2.2.4.4 Isolierung und Reinigung der Plasmid-DNA

Die Gewinnung der Plasmid-DNA aus Bakterien umfasst drei Schritte:

1. Wachstum der Bakterienkultur nach Überimpfen einer Bakterienkolonie;
2. Ernte und Lyse der Bakterien;
3. Reinigung der Plasmid-DNA.

2.2.2.4.4.1 Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA (Miniprep)

Bevor die Plasmid-DNA-Isolierung in großem Maßstab erfolgen konnte, wurde primär Plasmid-DNA in kleinem Maßstab gewonnen und diese hinsichtlich der inserierten Sequenz durch Restriktionsanalyse getestet.

Das kationische Detergenz Cetyltrimmoniumbromid (CTAB) ermöglicht in Gegenwart niedriger NaCl-Konzentrationen (< 0,6 M) die Fällung von DNA, während Proteine und Polysaccharide in Lösung bleiben (Del Sal et al., 1989). Diese Eigenschaft wird bei der Isolierung geringer Mengen Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen genutzt.

Aus der aufgeschüttelten Übernachtungskultur wurden ein ml Bakteriensuspension zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wurde in 200 µl STET-Lösung (8 % (w / v) Sucrose, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA, 0,1 % Triton X-100) und vier µl Lysozym resuspendiert, fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 45 Sekunden bei 95 °C erhitzt. Die dabei denaturierten Proteine bildeten bei der anschließenden 15-minütigen Zentrifugation ein Pellet, das sich mit einem sterilen Zahnstocher entfernen ließ, während die Nukleinsäuren in Lösung blieben. Nach Zugabe von 20 µl einer 5 %igen CTAB-Lösung und einer Inkubation von drei Minuten bei Raumtemperatur fielen die im Überstand verbliebene Plasmid-DNA aus und wurde durch eine fünfminütige Zentrifugation pelletiert. Nach Lufttrocknen des Pellets und gründlicher Resuspendierung in 300 µl 1,2 M NaCl-Lösung konnte die Plasmid-DNA durch Zugabe des 2,5-fachen Volumens an 100 %igem Ethanol gefällt werden. Der durch die anschließende Zentrifugation gewonnene Überstand wurde verworfen, die DNA in der SpeedVac getrocknet und in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

Bei dieser Methode werden neben DNA auch große Mengen an RNA isoliert. Um vorhandene RNA zu entfernen und den Reinheitsgrad der Plasmid-DNA z. B. für die Sequenzierung zu erhöhen, wurde anschließend RNase zugesetzt. Danach erfolgte eine Phenol / Chloroform (1 : 1) - und eine Chloroform / Isoamylalkohol (24 : 1) -Extraktion sowie eine Ethanol-fällung.

2.2.2.4.4.2 Isolierung der Plasmid-DNA im großen Maßstab

Die Isolierung größerer Mengen (bis zu 500 µg) Plasmid-DNA (Maxipräparation) wurde mit Hilfe des QIAGEN® Plasmid-Kits (QIAGEN, Hilden) gemäß den Herstellervorschriften durchgeführt.

Dabei wurden die über Nacht bei 37 °C inkubierten beimpften LB-Agarplatten mit Ampicillin, IPTG und X-Gal am nächsten Morgen verwendet. Fünf ml LB-Medium mit 50 µg / ml zugesetztem Ampicillin wurde in einem 50 ml-Reaktionsgemisch beimpft und sechs bis acht Stunden bei 37 °C und 180 UpM geschüttelt. Anschließend wurden zwei bis drei ml dieser Kulturlösung in 200 ml LB / Ampicillin-Medium in einem 500 ml-Erlenmeyerkolben zugegeben. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht und Schütteln bei 180 UpM zur Belüftung der Kulturen erfolgte am nächsten Tag die Isolierung der Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAGEN-Plasmid-Maxi-Kits. Nach alkalischer Lyse der Bakterien wurde die Plasmid-DNA an ein Anionenaustauscherharz gebunden, gewaschen, anschließend eluiert und mit Isopropanol gefällt.

Das dabei entstandene DNA-Pellet wurde gut getrocknet und in Lösung in 500 µl „1 x TE-Puffer“ mit einem pH von 8,0 über Nacht bei 4 °C gelöst und inkubiert.

2.2.2.4.5 Hydrolytische Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen (Restriktionsverdau)

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische, aus zumeist vier bis acht Nukleotiden bestehende DNA-Sequenz erkennen und durch Spaltung der Phosphodiester-Bindungen die DNA an definierten Stellen schneiden. Die dabei entstehenden DNA-Fragmente enthalten eine 5'-Phosphat- und eine 3'-Hydroxygruppe.

Diese Enzyme wurden im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt, um Plasmidvektoren zu linearisieren, DNA-Fragmente für die Klonierung zu generieren und die Klone anschließend daraufhin zu kontrollieren, ob sie das gewünschte Insert enthalten. Dabei bestanden die Reaktionsansätze zum einen aus der in Wasser gelösten DNA, zum anderen aus 10 x Enzympuffer (Endkonzentration 1 x) und der auf die zu schneidende DNA-Menge abgestimmten Anzahl an Units der Restriktionsendonuklease.

Sowohl die Inkubationszeit als auch die Temperatur entsprach den Angaben des Herstellers für das jeweilige Enzym. Die Kontrolle erfolgte wiederum mit Hilfe der Gelelektrophorese.

2.2.2.4.6 Reinigung der DNA-Fragmente

DNA-Fragmente, die durch PCR oder Restriktionsverdau erhalten werden, müssen vor ihrer Weiterverarbeitung aufgereinigt werden. Proteine, Salze, nicht abgetrennte Primer und freie Nukleotide könnten enzymatische Reaktionen wie Sequenzierung oder Linearisierung hemmen.

Das einfachste und bekannteste Verfahren, Salze und Proteine zu entfernen, ist die Fällung der DNA mit Ethanol. Um Primer, die bei der Präzipitation mit Ethanol mitgefällt werden, zu entfernen, nützt man die Eigenschaft von Nukleinsäuren mit einer Mindestgröße von 100 Basenpaaren aus, sich in Gegenwart chaotroper Salze (z. B. Guanidinthiocyanat) spezifisch an Glas- oder Silica-Oberflächen zu binden.

Die durch mehrere Waschschrte gereinigte DNA kann nun mit Wasser eluiert werden und ist für weitere enzymatische Reaktionen verfügbar.

2.2.2.4.7 DNA-Sequenzierung

Ziel der Sequenzierung ist die Aufklärung der genauen Nukleotidabfolge. Die DNA-Sequenzierung erfolgt nach der Didesoxy-Kettenterminationsmethode von F. Sanger und Mitarbeitern mit Hilfe des „cycle sequencing“. Mit einer DNA-Polymerase wird, ähnlich dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion, aber nur von einem Primer ausgehend, der komplementäre Strang eines DNA-Einzelstranges synthetisiert. Den Nukleotiden sind in einem geringen Verhältnis (ca. 1 : 100) sog. Stopnukleotide beigemischt. Diese sind Didesoxynukleotide, an denen die zur Kettenverlängerung notwendige 3'-OH-Gruppe fehlt. Der zufällige Einbau eines dieser Stopnukleotide in den neusynthetisierten Strang führt dazu, dass kein weiteres dNTP angehängt werden kann und somit die Synthese abgebrochen wird. Dadurch entsteht eine Vielzahl von DNA-Strängen unterschiedlicher Größe, die sich in der Länge um jeweils eine Base unterscheiden, und die nach Hitzedenaturierung in einem hochauflösenden, denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt werden können (Sanger et al., 95).

Die vier den Basen Guanin, Cytosin, Thymin und Adenin entsprechenden

Stopnukleotide (sog. „Dye“-Terminatoren) sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die verschiedene Emissionsmaxima aufweisen. Die markierten DNA-Moleküle werden von einem Laser (Wellenlängenmaxima bei 488 und 512 nm) zur Fluoreszenz angeregt. Dieses emittierte Licht wird über ein Spiegelsystem durch eine CCD-Kamera über einen virtuellen Filter detektiert.

Die Sequenzierung lässt sich in fünf Arbeitsschritte unterteilen:

1. Probenaufarbeitung
2. Sequenzreaktion
3. Reinigen der Platten
4. Gießen des Gels
5. ABI PRISM

Zu 1) Probenaufarbeitung

Die DNA-Matrizen (templates) müssen so aufbereitet sein, dass alle störenden Nebenprodukte wie PCR-Primer, Salze, Ethanol, unspezifische Produkte u. ä. entfernt sind.

Zu 2) Sequenzreaktion

Für die Sequenzreaktion wurden zwischen 500 und 700 ng gereinigte Plasmid-DNA in sieben µl Wasser aufgenommen und zwei µl Ready-Mix (BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reactions mit AmpliTaq® DNA Polymerase FS, Applied Biosystems) sowie ein µl Oligonukleotidprimer (entspricht fünf µM) hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde im Thermocycler (PE GeneAmp 9600) folgendem PCR-Programm unterzogen:

25 Zyklen mit 10 Sekunden bei 95 °C,
 5 Sekunden bei 50 °C und
 4 Minuten bei 60 °C.

Um überschüssige „Dye“-Terminatoren, Enzym und Salze zu entfernen, mussten die Sequenzierungsprodukte mit drei-molarem Natriumacetat pH 5,2 und absolutem Ethanol gefällt, nach 30-minütiger Zentrifugation bei 12 000 UpM mit 75 %igem Ethanol nachgewaschen und nach erneutem Zentrifugieren getrocknet werden.

Unmittelbar vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben in drei µl Ladepuffer (25 mM EDTA pH 8,0 , 50 mg / ml Bluedextran / Formamid 1 : 5) aufgenommen, drei Minuten bei 95 °C denaturiert und auf Eis gestellt. Von jeder Probe wurden 1,5 µl geladen.

Zu 3) Reinigen der Platten

Die Platten müssen äußerst gründlich gesäubert werden, gegebenenfalls sogar mit NaOH. Anschließend werden sie mit demineralisiertem Wasser nachgereinigt und getrocknet.

Zu 4) Gießen des Gels

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte nach der Fragmentgröße mit harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen. Harnstoff wirkt denaturierend und verhindert die Ausbildung von Sekundärstrukturen der DNA, sodass die Beweglichkeit der DNA-Moleküle im elektrischen Feld ausschließlich von ihrer Größe bestimmt wird.

In dieser Arbeit wurde ein 5 %iges Polyacrylamid / sieben M Harnstoff-Gel mit folgender Zusammensetzung verwendet:

21,0 g Harnstoff

8,4 ml 30 %ige Acrylamid-Lösung

12 ml „5 x TBE-Puffer“

14 ml bidest. Wasser

Nach Lösen der Gelbestandteile auf der Rührplatte wurde die Lösung durch einen 0,2 µm-Filter gegeben und mind. fünf Minuten entgast. Anschließend wurde 350 µl 10 % APS-Lösung und 20 µl TEMED vorsichtig zupipettiert. Das Ammoniumpersulfat wirkt als Radikalbildner. Diese Lösung muss sofort verwendet und der Kamm eingesetzt werden.

Zu 5) ABI PRISM

Die elektrophoretische Auftrennung der bei der Sequenzreaktion entstandenen Produkte erfolgte mit einem ABI PRISM™ 377-DNA-Sequencer (Laufbedingungen: Laufpuffer „1 x TBE“, 48 Watt, 50 °C, acht Stunden) in 5 %igen Polyacrylamidgelen (Geldicke: 0,2 mm, Länge: 36 cm). Die Sammlung und Auswertung der Daten wurde mit den Programmen „ABI PRISM™ Data Collection“ und „ABI PRISM™ Sequencing Analysis 3.2“ durchgeführt.

2.2.2.4.8 Linearisierung des Plasmids

Für die Linearisierung des Plasmids ist ein Restriktionsemzym notwendig, das nur einmal im Plasmid schneidet, jedoch nicht in der inserierten Sequenz. Dabei wurden

Enzyme der Firma Biolabs verwendet.

Nach Einsetzen von 50 µl Plasmid-DNA zur Linearisierung erfolgte anschließend eine gelelektrophoretische Kontrolle.

2.2.2.4.9 Genaue absolute Quantifizierung

Für absolute Quantifizierungen ist es erforderlich, die absolute Kopienzahl des Standards möglichst genau zu kennen. Nach der Subklonierung des cDNA-Fragments in einen Plasmidvektor, Transformation kompetenter Bakterien, Kultivierung, Linearisierung des Plasmids und Reinigung wird möglichst genau die OD 260, d. h. die Absorption des Lichtes bei der Wellenlänge 260 nm, bestimmt.

Um eine Standardreihe generieren zu können, benötigt man die genaue Ausgangskonzentration der Plasmide in der Stocklösung (Matrizen-Moleküle / µl). Mittels einer seriellen 10-fach-Verdünnung für den interessierenden Kopienbereich kann anschließend jeweils ein größeres Volumen hergestellt, portioniert und dann bei -20 °C langfristig gelagert werden. Für jedes Experiment wird dann jeweils ein Set von Standard-Aliquots eingesetzt, das auch langfristig eine genaue Quantifizierung erlaubt.

2.2.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

2.2.3.1 Vorbemerkungen

Die Bestimmung der Kopienzahl einer bestimmten Ziel-DNA bzw. -RNA aus einem Nukleinsäure-Pool hat für viele Anwendungen in der biomedizinischen Forschung eine große Bedeutung. Dies betrifft nicht nur die Titerbestimmung bei infektiösen Erkrankungen, sondern auch die Bestimmung der Gen dosis oder der Genexpression.

Durch die annähernd exponentielle Amplifikation einer Zielsequenz während der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eignet sich diese Technologie neben dem qualitativen Nachweis auch für quantitative Analysen kleinster Kopienzahlen (Ferre, 39).

Die Effizienz einer Polymerase-Kettenreaktion ist der Theorie nach gleich eins, tatsächlich werden jedoch Werte unter eins erreicht. Üblicherweise liegen die Effizienzen zwischen dem 15. und dem 30. Zyklus bei 0,7 bis 0,8 (Wang et al., 121).

Beeinflusst wird die Effizienz von folgenden Faktoren:

- Kinetik der Primer-Anlagerung (Primerlänge und –sequenz)
- Konzentration der Reaktionskomponenten (Magnesium-Ionen, dNTPs, Primer, AmpliTaq-DNA-Polymerase)
- Zyklenzahl und –aufbau
- Struktur der Zielsequenz
- Länge der Zielsequenz (kürzere Fragmente besitzen in der Regel eine höhere Effizienz)

Voraussetzung für eine Quantifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion ist daher die Bestimmung des Bereichs, in dem sie exponentiell, d. h. quantitativ arbeitet. In dieser exponentiellen Phase ist die Kopienzahl direkt proportional zur Startkopienzahl. Mit Hilfe eines externen Standards und der mit ihm erstellten Standardkurve können die Kopienzahlen bestimmt werden.

Die quantitative Untersuchung der Genexpressionen im Herzgewebe erfolgte mittels einer quantitativen Polymerase-Kettenreaktion, dem sog. TaqMan-PCR-Assay. Der Vorteil der TaqMan-Chemie besteht darin, dass Post-PCR-Schritte wie Hybridisierungsreaktionen oder Gelelektrophoresen zum spezifischen Nachweis der Amplifikate eingespart werden. Durch Wegfallen zusätzlicher Arbeitsschritte wird ein sehr präzises Ergebnis bei der Quantifizierung erreicht.

2.2.3.2 Real-Time TaqMan™-PCR

Bei dieser Methode wird die Amplifikation eines spezifischen PCR-Produktes mit Hilfe einer fluorogenen Sonde nachgewiesen. Dabei handelt es sich um ein Oligonukleotid, das mit zwei verschiedenen Farbstoffen (Reporter- und Quencherfarbstoff) markiert ist und sich an die zu amplifizierende Sequenz anlagert. Die chemisch intakte Sonde kann nicht zur Fluoreszenz angeregt werden, da die Fluoreszenz des am 5'-Ende hängenden Reporter-Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum sogenannten Quencher am 3'-Ende durch Fluoreszenz-

Energietransfer (FET) unterdrückt ist. Während der Extensionsphase der Polymerase-Kettenreaktion wird das 5'-Ende der spezifisch an die entsprechende Einzelstrang-DNA gebundenen Sonde verdrängt und durch die 5'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase hydrolytisch gespalten. Dadurch wird die räumliche Nähe zwischen Reporter- und Quencherfarbstoff aufgehoben, sodass der Reporterfarbstoff bei einer Wellenlänge von 488 nm zur Fluoreszenz angeregt wird. Der Anstieg des Reportersignals im Verlauf einer PCR ist somit der Produkt-Akkumulation direkt proportional und damit quantitativ. Mit Hilfe des ABI PRISM™ 7700-Sequence-Detektor und der ABI PRISM™ Sequenz-Software (Version 1.6.3) wird die mit jedem Zyklus steigende Fluoreszenz gemessen und ausgewertet (Schild, 1999).

2.2.3.3 Quantifizierungsstrategie

Die Quantifizierung einer isolierten m-RNA besteht aus zwei Teilen. Zuerst erfolgte die reverse Transkription, in der die m-RNA in cDNA umgeschrieben wird. Diese cDNA wurde anschließend einer Polymerase-Kettenreaktion unterzogen, vervielfältigt und somit quantifiziert. Neben Cx40, Cx43, ANP und BNP wurde parallel eine Standardkurve erstellt. In dieser Arbeit wurden die Kontrollen des endogenen Standards in getrennten Reaktionsgefäßen amplifiziert (externen Standard). Als endogene Kontrollen dienten hGH und 18s-rRNA. Schließlich erfolgte die endogene Kontrolle jedoch durch 18s-rRNA, da nach Literaturangaben hGH bei Herzerkrankungen kompensatorisch ebenso erhöht sein könnte. Mit deren Hilfe war somit eine relative Quantifizierung möglich. Um mögliche Fehler bei der Bestimmung auszuschließen, wurde somit unterschiedliche Effizienz bzw. unterschiedliche Gesamtmenge an RNA, die zuvor in die RT eingesetzt wurde, ausgeglichen.

2.2.3.4 Vorbereitungen

Die aus Herzgewebe isolierte RNA wurde, wie oben beschrieben, photometrisch quantifiziert und jeweils gleiche Mengen für die reverse Transkription eingesetzt. Die in -80 °C eingefrorenen, 1 : 15 verdünnten RT-Ansätze wurden aufgetaut und gut vorgemischt.

Für die Standardkurve mussten die für die entsprechende Sequenz notwendigen Konzentrationen aus dem bereits vorbereiteten Stock durch Verdünnung hergestellt werden.

Die TaqMan™-PCR wurde mit Hilfe des ABI Prism™ Sequenz Detection System (7700 SDS) durchgeführt. Die für die jeweilige PCR-Reaktion unterschiedlichen optimalen Bedingungen wurden empirisch bestimmt.

Um eine reproduzierbare Quantifizierung zu erreichen, ist eine sorgfältige Standardisierung und Optimierung der Reaktion, aber auch sämtlicher sie betreffender Parameter unbedingt erforderlich. Dem dient die Verwendung eines Master-Mixes, um in allen Ansätzen die gleiche Konzentration der Einzelbestandteile zu gewährleisten. Ebenso wurden für jede Zielsequenz die entsprechende optimale Magnesium- und Primerkonzentration nach Empfehlungen der Firma Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt optimiert (Schild, 96).

Ein Ansatz der TaqMan™-PCR mit einem Gesamtvolumen von 50 µl umfasste:

RT-Ansatz bzw. Standardverdünnung	x
10 x PCR-Puffer	1 x
Magnesiumchlorid	5,0 mM
dATP	200 µM
dUTP	200 µM
dCTP	200 µM
dGTP	200 µM
Primer for.	900 nM
Primer rev.	900 nM
Amperase	0,5 U
AmpliTaq Gold	1,25 U
Sonde	200 nM
LiChrosolv®-Wasser	x

Das Temperaturprogramm für die Polymerase-Kettenreaktion bestand aus zwei Minuten bei 50 °C, 10 Minuten bei 95 °C und anschließend 40 Zyklen mit jeweils 15 Sekunden bei 95 °C und einer Minute bei 60 °C.

2.2.3.5 Durchführung

Die Amplifikation aller Proben für die entsprechende Zielsequenz und der Standardkurve erfolgte in getrennten Reaktionsgefäßen. Gleiches gilt für die endogene Kontroll-18s-rRNA mit entsprechender Standardkurve. Jede Probe wurde doppelt, der DNA-Standard (stets in sechs Verdünnungsstufen im Bereich von 10^2 bis 10^8 Startkopien) und die Nullkontrolle wurden dreifach amplifiziert. Ein Beispiel der Bestückung der Tubes ist in Abbildung 6 und der Erstellung einer Standardkurve am Beispiel des hBNP ist in Abbildung 7 dargestellt. Die gesamte TaqMan™-PCR erfolgte in einem geschlossenen System, d. h. es waren keine Zwischenschritte notwendig, die eine mögliche Fehlerquelle sein können.

Die RT-Ansätze für alle zu untersuchenden Zielsequenzen wurden 1 : 15, die der 18s-rRNA wegen der hohen Expressionsrate zusätzlich 1 : 1000 verdünnt.

NTC A1	NTC A2	NTC A3	STND A4 1.0e+02	STND A5 1.0e+02	STND A6 1.0e+02	STND A7 1.0e+02	STND A8 1.0e+02	STND A9 1.0e+02	STND A10 1.0e+04	STND A11 1.0e+04	STND A12 1.0e+04
STND B1 1.0e+05	STND B2 1.0e+05	STND B3 1.0e+05	STND B4 1.0e+06	STND B5 1.0e+06	STND B6 1.0e+06	STND B7 1.0e+07	STND B8 1.0e+07	STND B9 1.0e+07	STND B10 1.0e+08	STND B11 1.0e+08	STND B12 1.0e+08
UNKN 76 1.8e+04	UNKN 76 2.1e+04	UNKN 77 1.3e+05	UNKN 77 1.5e+05	UNKN 78 1.5e+04	UNKN 78 1.3e+04	UNKN 79 2.2e+02	UNKN 79 2.0e+02	UNKN 80 8.2e+03	UNKN 80 9.0e+03	UNKN 81 3.0e+04	UNKN 81 3.5e+04
UNKN 82 4.0e+04	UNKN 82 4.4e+04	UNKN 83 4.8e+03	UNKN 83 4.4e+03	UNKN 84 2.1e+04	UNKN 84 1.9e+04	UNKN 85 1.4e+04	UNKN 85 1.6e+04	UNKN 86 5.5e+02	UNKN 86 6.5e+02	UNKN 87 7.3e+04	UNKN 87 7.6e+04
UNKN 12 1.8e+04	UNKN 12 1.8e+04	UNKN 12 1.8e+04	UNKN 13 1.3e+04	UNKN 13 1.3e+04	UNKN 13 1.3e+04	UNKN 23 1.2e+04	UNKN 23 1.1e+04	UNKN 23 1.2e+04	UNKN 25 3.0e+04	UNKN 25 2.6e+04	UNKN 25 3.2e+04
UNKN 31 3.7e+05	UNKN 31 3.6e+05	UNKN 31 3.3e+05	UNKN 69 8.0e+00	UNKN 69 4.6e+00	UNKN 69 7.1e+00	UNKN 75 1.0e+05	UNKN 75 9.9e+04	UNKN 75 8.8e+04			

Abbildung 6: Bestückung der Tubes am Beispiel des hBNP, A1 bis A3 entsprechen den Nullproben, A4 bis B12 den Standardverdünnungen 102 bis 108, die übrigen den zu untersuchenden Proben (in diesem Fall Proben 76 bis 87 doppelt und Wiederholerproben dreifach).

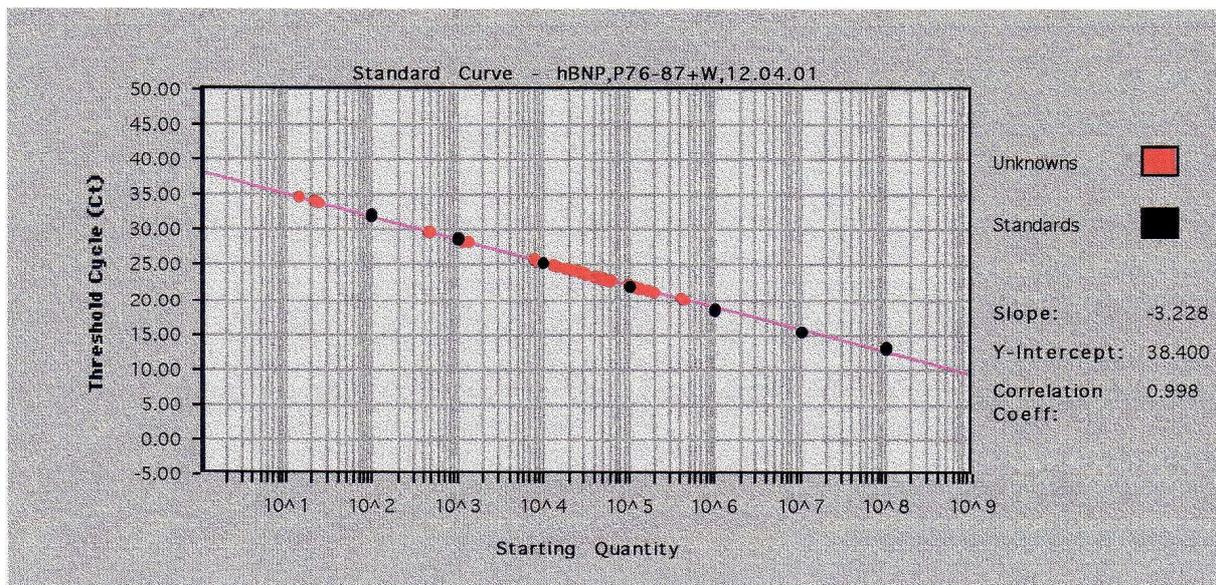


Abbildung 7: Standardkurve am Beispiel des hBNP

2.2.3.6 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der ABI PRISM™ Sequence Detection-Software Version 1.6. Neben der quantitativen Bestimmung wurde ebenso die Qualität bewertet. Die doppelt bestimmten Proben ergaben zwei C_T-Werte. Diese durften nicht mehr als 0.3 C_T variieren (siehe Beispiel Abbildung 8), ansonsten war eine Wiederholung der Messung notwendig.

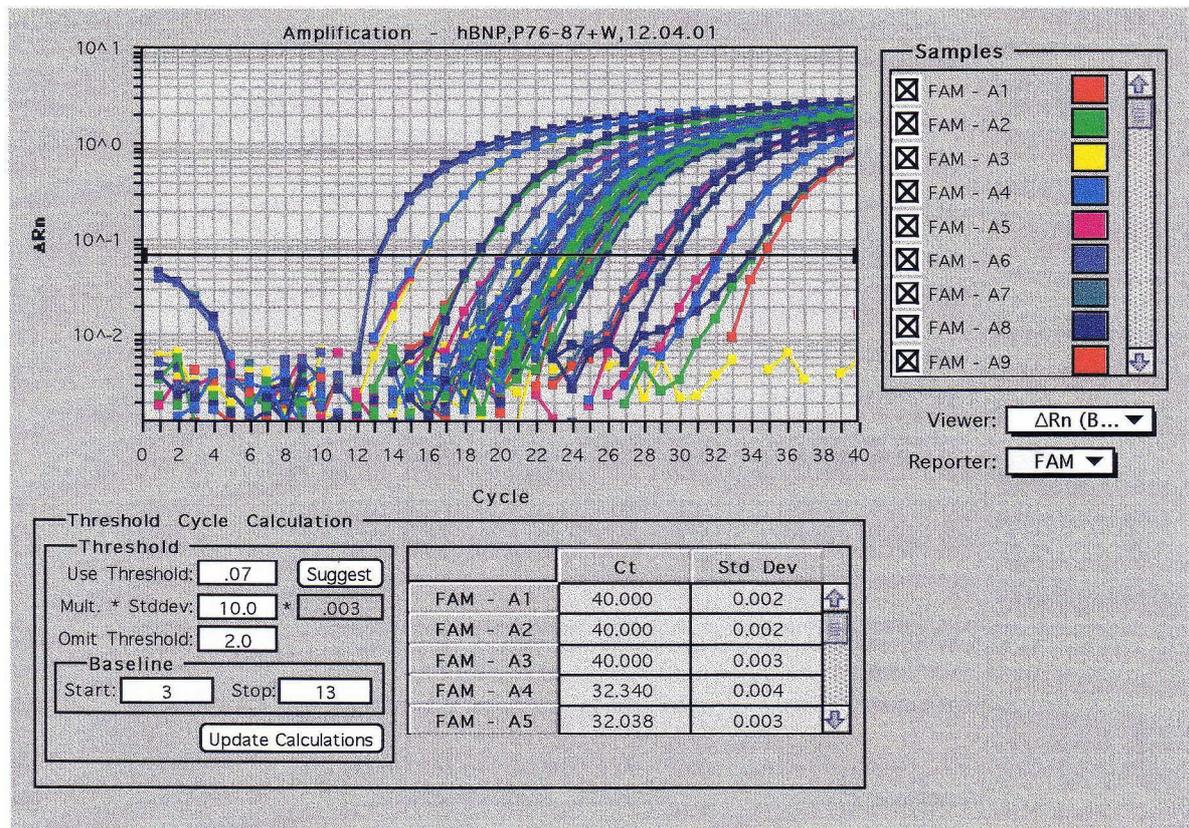


Abbildung 8: Amplifikation am Beispiel des hBNP, die C_T -Werte wurden auf 2 Stellen hinter dem Komma auf- bzw. abgerundet. Die C_T -Werte von A1 bis A3 (Nullproben) ergaben alle 40.00, die Werte von A4 bis A6 (Standardverdünung 10^2) 32.34, 32.04 und 32.14. Mindestens 2 Werte dürfen nicht mehr als 0.3 variieren, ansonsten muss die Messung wiederholt werden.

Die Effizienz der RT wurde durch die Quantifizierung der 18S-rRNA kontrolliert und die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung entsprechend korrigiert. Dabei wurde die bestimmte Kopienzahl der entsprechenden Zielsequenz durch die Kopienzahl der 18s-rRNA dividiert. Wegen der im Vergleich zu 18s-rRNA niedrigen Expressionshöhe der zu untersuchenden Zielsequenzen wurde die ermittelte Kopienzahl von hCx40, hCx43, hANP und hBNP vor der Relativierung mit 10^3 multipliziert.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Das heterogene Patientenkollektiv setzte sich aus Kindern (19 Proben), Jugendlichen (sieben Proben) und Erwachsenen (50 Proben) zusammen, die eine schwere Herzerkrankung aufwiesen und einer Herztransplantation bedurften. Das Alter dieser Patienten war zwischen vier Monaten und 61 Jahren. Die erste Gruppe setzte sich aus verschiedenen Herzvitien wie Atriumseptumdefekt (ASD), Ventrikelseptumdefekt (VSD), atrio-ventrikulärer Septumdefekt (AVSD), hypoplastisches Linksherzsyndrom (HLHS) und persistierenden Ductus arteriosus (PDA) zusammen. Diese Patienten hatten teilweise trotz operativer Eingriffe im Vorfeld wie Schrittmachereinsatz oder Herzklappenersatz eine eingeschränkte Pumpfunktionsstörung und bedurften dringend einer Herztransplantation. Neben der ersten Gruppe der Herzvitien hatte der Großteil der Patienten eine dilatative Kardiomyopathie. Diese Gruppe der dilatativen Kardiomyopathie konnte mit Hilfe des NYHA-Grades der damit verbundenen Herzinsuffizienz in zwei weitere Gruppen unterteilt werden (NYHA 3 = DCM 3 und NYHA 4 = DCM 4). Diese Einteilung erfolgte durch den behandelnden Arzt, der sich nach den Richtlinien der New York Heart Association (NYHA) für die Klassifizierung richtete. Ein weiterer Teil des Patientenkollektives hatte eine ischämische Kardiomyopathie. In dieser Gruppe, wie auch in der Gruppe der Herzvitien, sind fast alle als Schweregrad NYHA 4 klassifiziert worden.

Trotz des Mangels an gesunden Herzen für die Forschung ergab sich die seltene Möglichkeit aus zwei explantierten Herzen, die nicht zur Transplantation kamen, Proben aus allen vier Herzkammern zu erhalten. Auch wenn die Anzahl mit insgesamt acht Proben (je zwei Proben für LA, LV, RA und RV) sehr gering ist, wurden diese in der Betrachtung der Genexpression herzkranker und –gesunder Probanden in diese Arbeit mit einbezogen und stets vergleichend dargestellt.

Tabelle 1: Gestellte Hauptdiagnosen

Gestellte Hauptdiagnose	Anzahl der Patienten	Anzahl der Proben
DCM 3	12	24
DCM 4	8	22
ICM	4	11
Vitium	5	17
gesund	2	8

Das Verhältnis der herzkranken Patienten männlich zu weiblich war mit 23 zu 6 deutlich mit verstärkter Vertretung des männlichen Geschlechtes.

Die in der Tabelle 2 angegebenen Probenzahlen sind als Gesamtprobenzahl entsprechend der Erkrankung zu sehen, die jeweils in linken Vorhof (LA), linken Ventrikel (LV), rechten Vorhof (RA) und rechten Ventrikel (RV) unterteilt wurden.

Tabelle 2: Einteilung der Proben in 4 Gruppen

Hauptdiagnose	Probenzahl	LA	LV	RA	RV
DCM 3	24	4	10	4	6
DCM 4	22	5	8	4	5
ICM	11	2	4	2	3
Vitium	17	3	4	4	5
gesund	8	2	2	2	2

Alle Angaben sind aus der Probenliste im Anhang ersichtlich (Zu beachten ist dabei, dass die Probennummer weder der laufenden Nummer noch der Patientenummer entspricht).

3.2 Connexine

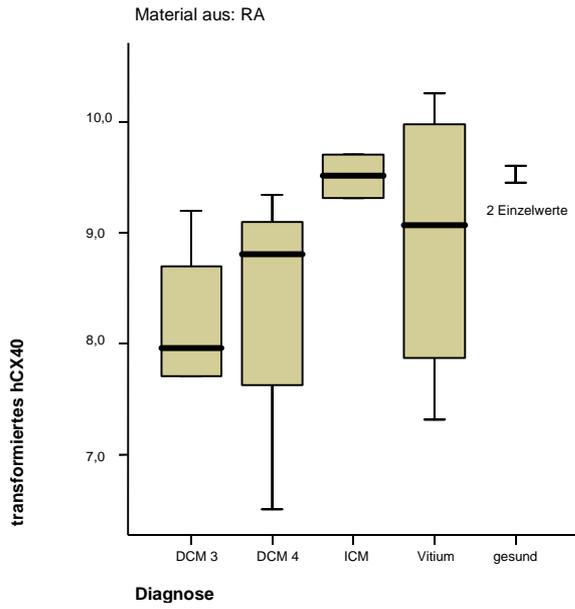
3.2.1 hCx40 und hCx43-Transformation

Aufgrund der anfangs nicht normalverteilten Messwerte (siehe oben) wurden diese nach Multiplikation mit dem Faktor 1000 einmalig logarithmiert. Die dabei erhaltenden Werte waren anschließend normalverteilt und konnten somit einer Varianzanalyse unterzogen werden.

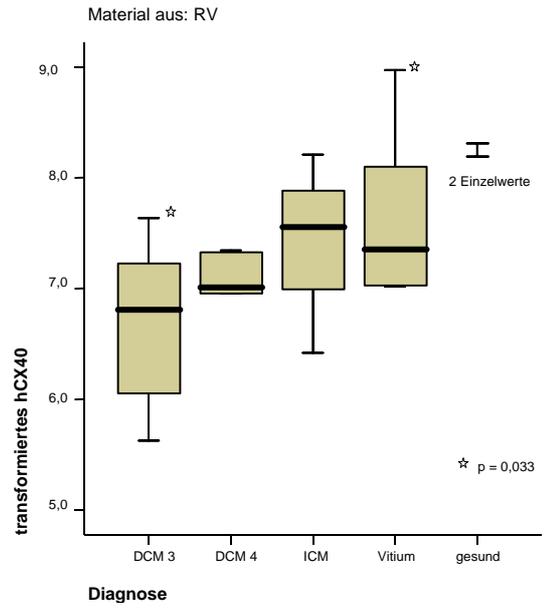
3.2.2 Explorative Datenanalyse der hCx40-Expression bei verschiedenen Erkrankungen in den rechten und linken Vorhöfen und Hauptkammern

Die explorative Datenanalyse stellt die unterschiedlichen Genexpressionen von hCx40 in vier verschiedenen Lokalisationen (rechter und linker Vorhof bzw. rechte und linke Hauptkammer) bei verschiedenen Herzerkrankungen optisch dar. Dabei ist bereits eine differente Expression von hCx40 bei einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM 3 und DCM 4) im Vergleich zur ischämischen Kardiomyopathie, aber auch zum Vitium in den verschiedenen Lokalisationen in unterschiedlichem Ausmaß zu erkennen.

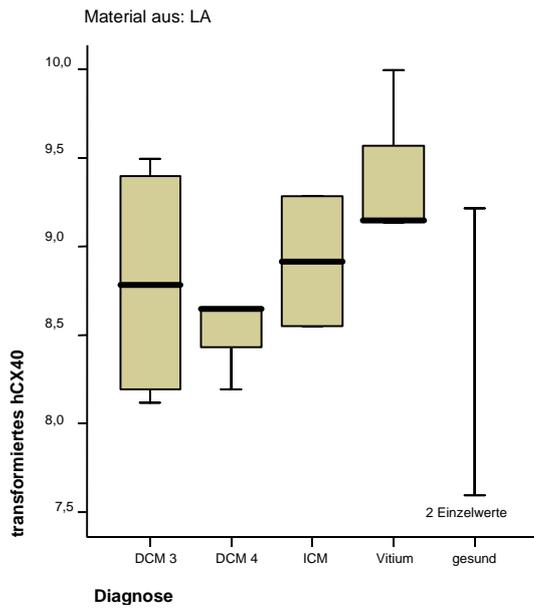
a:



b:



c:



d:

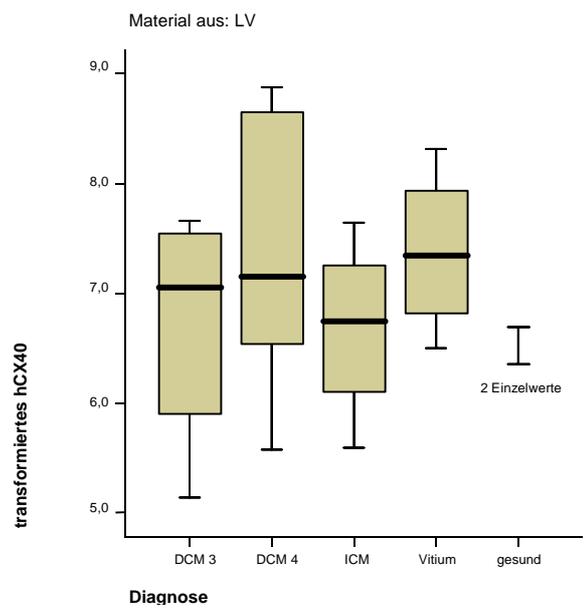


Abbildung 9: Boxplots für Messwerte von hCx40 nach Transformation für DCM 3, DCM 4, ICM, Vitium und gesund in a: RA, b: RV, c: LA und d: LV.

Tabelle 3: Analyse transformiertes hCx40

	Median	1. Quartil	3. Quartil	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
DCM 3							
RA	7,9639	7,7120	8,9515	8,2091	0,6999	7,7100	9,1987
RV	6,8971	5,9526	7,3362	6,6971	0,7427	5,6258	7,6419
LA	8,7866	8,1600	9,4462	8,7976	0,7008	8,1232	9,4939
LV	7,0490	5,7509	7,5671	6,7458	0,9573	5,1370	7,6589
DCM 4							
RA	8,8105	7,0714	9,2280	8,3700	1,2668	6,5094	9,3493
RV	7,0133	6,5938	7,3359	6,9745	0,4537	6,2260	7,3446
LA	8,6472	8,3125	8,8811	8,6069	0,3388	8,1932	9,1106
LV	7,1562	6,5101	8,7421	7,3926	1,2279	5,5791	8,8738
ICM							
RA	9,5170	9,3215	9,7125	9,5170	0,2765	9,3215	9,7125
RV	7,5619	6,4182	8,2098	7,3967	0,9072	6,4182	8,2098
LA	8,9174	8,5504	9,2844	8,9174	0,5190	8,5504	9,2844
LV	6,7410	5,8455	7,4474	6,6780	0,8461	5,5910	7,6389
Vitium							
RA	9,0722	7,5984	10,1238	8,9315	1,3186	7,3173	10,2642
RV	7,3591	7,0252	8,5388	7,6974	0,8384	7,0183	8,9735
LA	9,1488	9,1355	9,9956	9,4266	0,4928	9,1355	9,9956
LV	7,3445	6,6571	8,1238	7,3751	0,7622	6,4959	8,3156

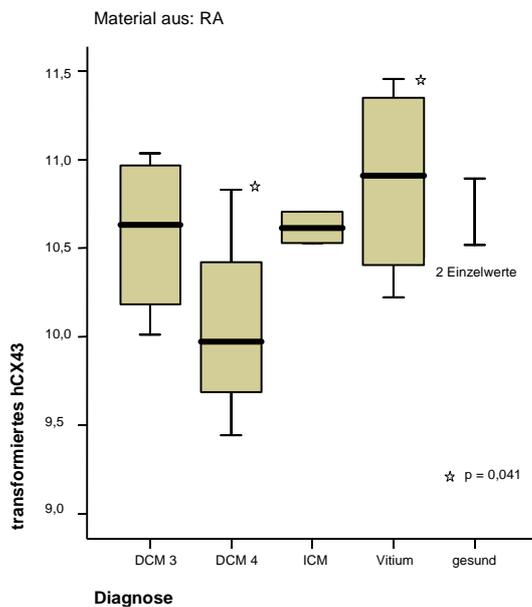
Mit dem Ziel, einen signifikanten Unterschied der Genexpression von hCx40 bei den genannten verschiedenen Erkrankungen in den entsprechenden Lokalisationen des Herzens zu untersuchen, wurde die einfaktorielle Varianzanalyse zur Testung herangezogen.

Die Untersuchungen der rechtsatrialen, linksatrialen und linksventrikulären Myokardproben zeigten keine differente Genexpression von hCX40. Im Gegensatz dazu ergab die Untersuchung der rechtsventrikulären Myokardproben zwischen den Gruppen DCM 3 und Vitium mit $p = 0,033$ einen signifikanten Unterschied der Genexpression von hCx40. Bei weiterer Betrachtung der Myokardproben herzkranker Patienten im Vergleich zu gesunden Patienten war interessant,

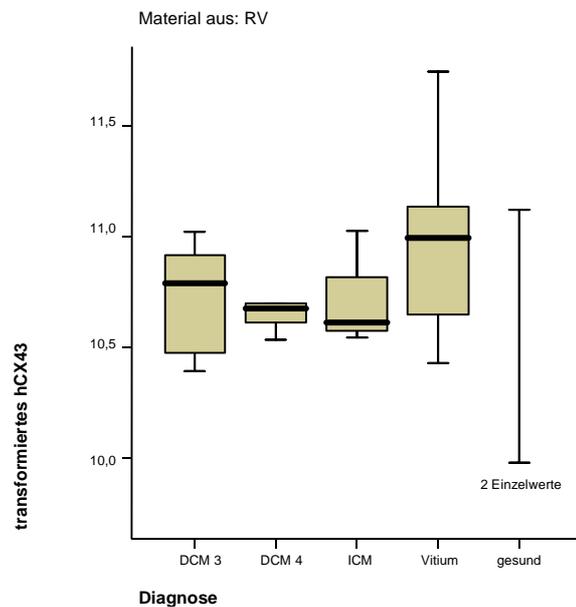
wiederum nur im rechten Ventrikel eine erniedrigte Expression von hCX40 bei Patienten mit DCM 3 und DCM 4 darzustellen, welches bei ICM und Vitium nicht der Fall war (siehe Anhang). In beiden Vorhöfen und linkem Ventrikel war keine signifikant veränderte Genexpression von hCX40 zu erkennen.

3.2.3 Explorative Datenanalyse der hCx43-Expression bei verschiedenen Erkrankungen in den rechten und linken Vorhöfen und Hauptkammern

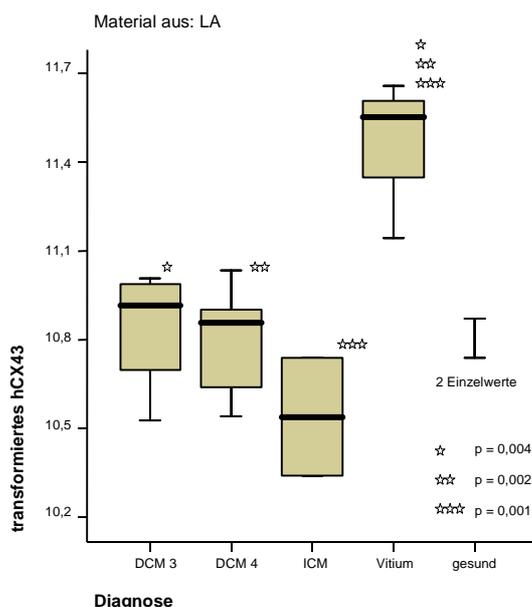
a:



b:



c:



d:

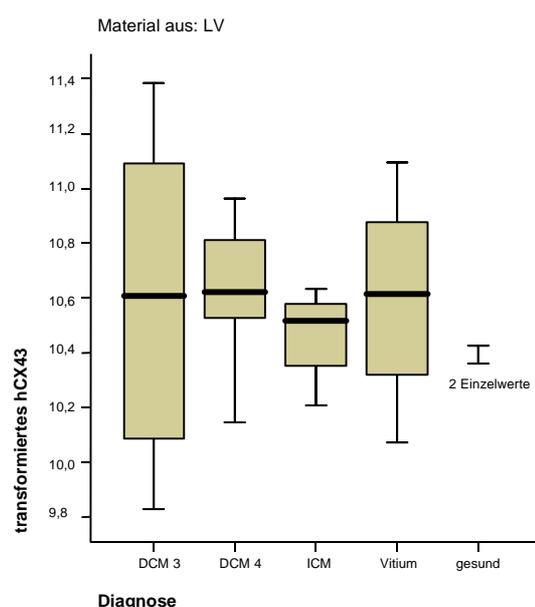


Abbildung 10: Boxplots für Messwerte von hCx43 nach Transformation für DCM 3, DCM4, ICM, Vitium und gesund in a: RA, b: RV, c: LA und d: LV.

Tabelle 4: Analyse transformiertes hCx43

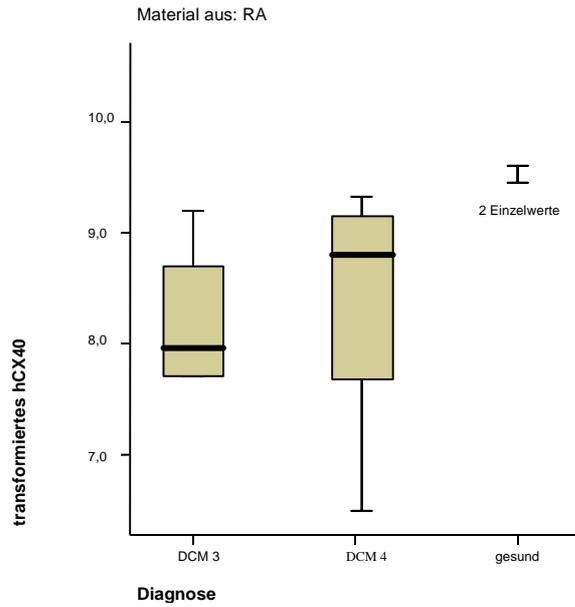
	Median	1. Quartil	3. Quartil	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
DCM 3							
RA	10,6302	10,0976	11,0041	10,5773	0,4784	10,0104	11,0384
RV	10,7903	10,4574	10,9449	10,7329	0,2577	10,3977	11,0227
LA	10,9175	10,6124	10,9973	10,8424	0,2182	10,5271	11,0075
LV	10,6071	10,0813	11,1092	10,6178	0,5272	9,8303	11,3843
DCM 4							
RA	9,9735	9,5656	10,6274	10,0555	0,5759	9,4430	10,8321
RV	10,6783	10,5777	10,7726	10,6758	0,1128	10,5385	10,8427
LA	10,8595	10,5910	10,9695	10,7961	0,2011	10,5413	11,0350
LV	10,6226	10,4982	10,8478	10,6284	0,2530	10,1477	10,9637
ICM							
RA	10,6166	10,5279	10,7053	10,6166	0,1255	10,5279	10,7053
RV	10,6130	10,5468	11,0291	10,7297	0,2615	10,5468	11,0291
LA	10,5396	10,3395	10,7397	10,5396	0,2830	10,3395	10,7397
LV	10,5146	10,2805	10,6063	10,4671	0,1828	10,2064	10,6330
Vitium							
RA	10,9118	10,3136	11,4050	10,8768	0,5734	10,2246	11,4589
RV	10,9946	10,5432	11,4422	10,9931	0,5049	10,4329	11,7482
LA	11,5553	11,1446	11,6616	11,4538	0,2730	11,1446	11,6616
LV	10,6129	10,1959	10,9852	10,5980	0,4193	10,0720	11,0942

Die hCx43-mRNA-Expression differierte signifikant in beiden Vorhöfen (RA und LA), nicht jedoch in den Hauptkammern (RV und LV). Dabei stach die hCx43-mRNA-Expression des Vitium eindeutig hervor. Während im rechten Atrium eine Signifikanz der unterschiedlichen Genexpression zwischen Vitium und DCM 4 mit einem p-Wert von 0,041 zu beobachten war, konnte im linken Atrium eine deutlich erhöhte mRNA-Genexpression des Vitium gegenüber allen weiteren hier untersuchten Herzerkrankungen (DCM 3 mit einem p-Wert von 0,004, DCM 4 mit einem p-Wert von 0,002 und ICM mit einem p-Wert von 0,001) dargestellt werden. Im Vergleich zu den Genexpressionen der gesunden Probanden war die bei Patienten mit einem Vitium ebenso deutlich höher zu erkennen (siehe Anhang).

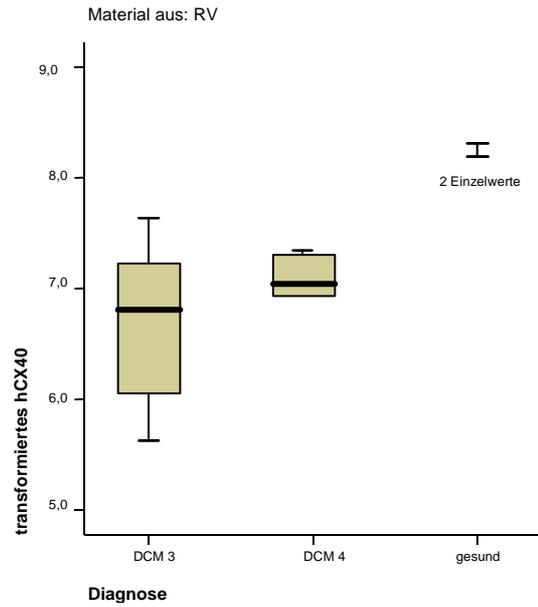
3.2.4 Zusammenhang zwischen dem Grad der Herzinsuffizienz (NYHA 3 und 4) und der Genexpression von hCx40 und hCx43 bei DCM

Eine weitere zu klärende Frage war das Bestehen eines möglichen Zusammenhanges zwischen dem Grad der Herzinsuffizienz und der mRNA-Genexpression der Connexine hCx40 und hCx43 bei dilatativer Kardiomyopathie. Während dieser zwischen der hCx43-mRNA-Expression und dem Grad der Herzinsuffizienz weder optisch zu erkennen war (siehe Abb. 12) noch die statistische Analyse eine signifikant differente Genexpression erbrachte, zeigten herzgesunde Probanden im Vergleich zu herzkranken Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie an rechtsventrikulären Myokardproben eine höhere Genexpression von hCx40. Die Untersuchung von mRNA-Expressionsunterschieden innerhalb der Gruppe der dilatativen Kardiomyopathien, d. h. zwischen dem Schweregrad NYHA 3 und NYHA 4, ergaben allerdings keinen signifikanten Unterschied im mRNA-Expressionsniveau von hCx40 (siehe Abb. 11 und Anhang).

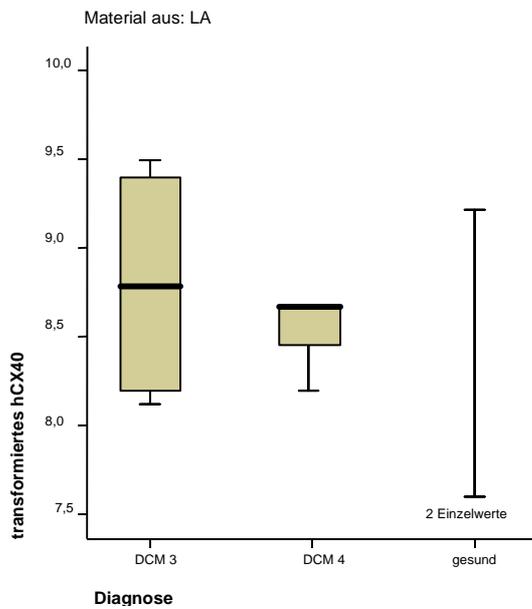
a:



b:



c:



d:

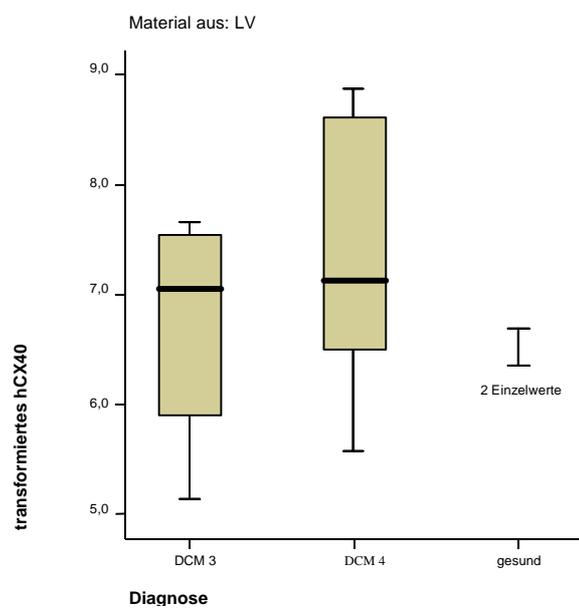
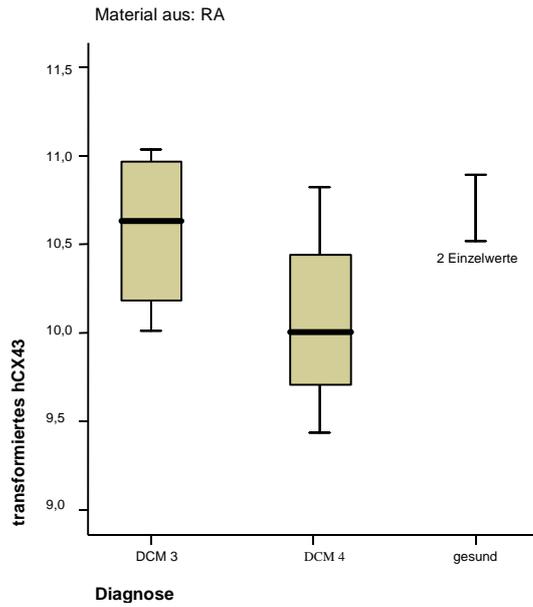
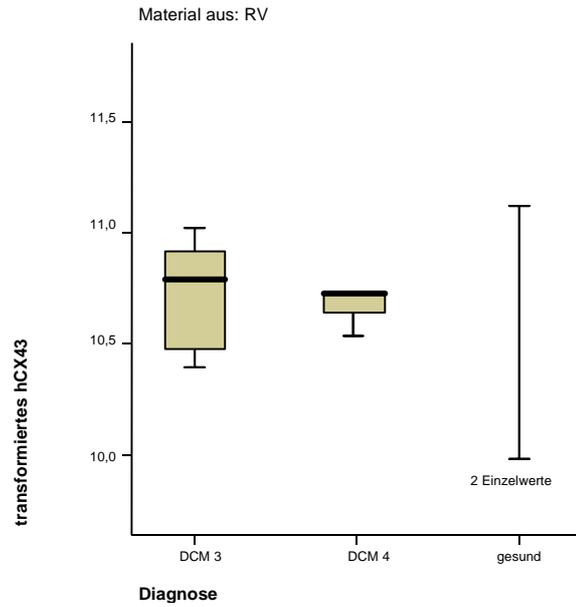


Abbildung 11: Zusammenhang zwischen dem Grad der Herzinsuffizienz und der m-RNA-Expression von hCx40 in a: RA, b: RV, c: LA und d: LV.

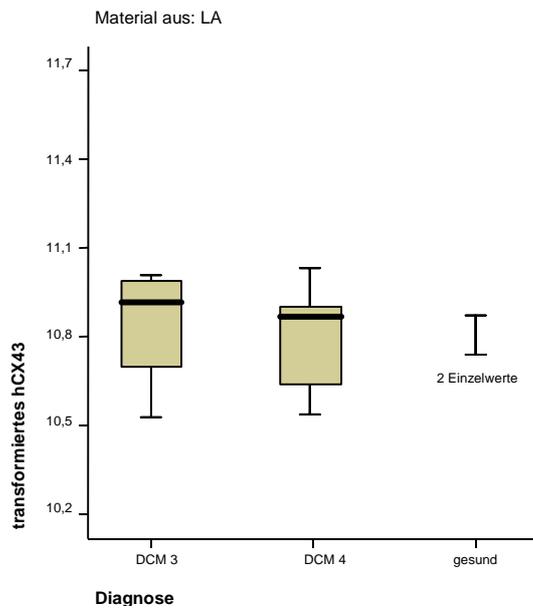
a:



b:



c:



d:

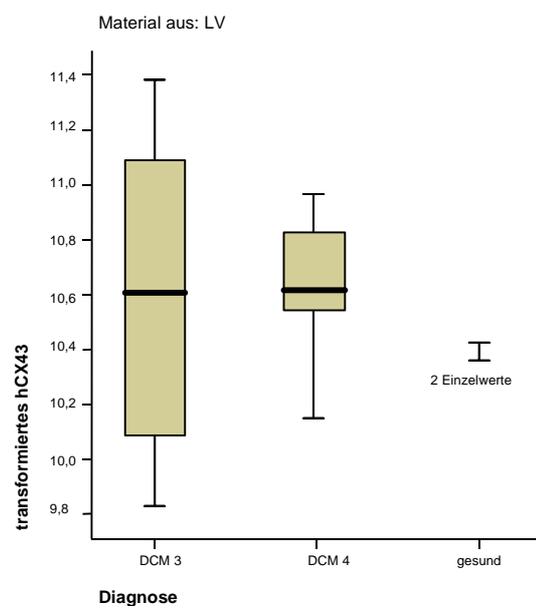


Abbildung 12: Zusammenhang zwischen dem Grad der Herzinsuffizienz und der m-RNA-Expression von hCx43 in a: RA, b: RV, c: LA und d: LV.

3.2.5 Zusammenhang zwischen hCx40- und hCx43-Genexpression

Die Korrelation nach Pearson ergab mit $p = 0,02$ eine direkte Proportionalität der gesamten Proben zwischen hCx40- und hCx43-mRNA-Expression. Nach Unterteilung der Proben in die bekannten Lokalisationen zeigte sich in den links- und rechtsatrialen Vorhöfen (Signifikanz mit $p = 0,002$ in RA und $p = 0,04$ in LA) ein deutlicher direkter Zusammenhang, jedoch nicht in der linken und rechten Hauptkammer (siehe Abb. 13 und 14 sowie Anhang).

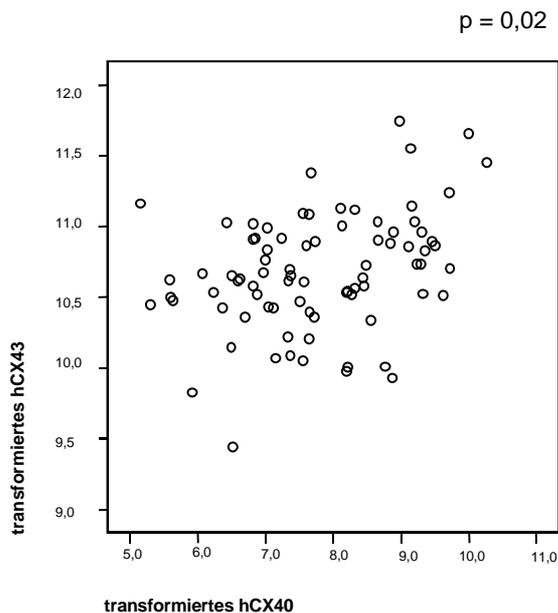
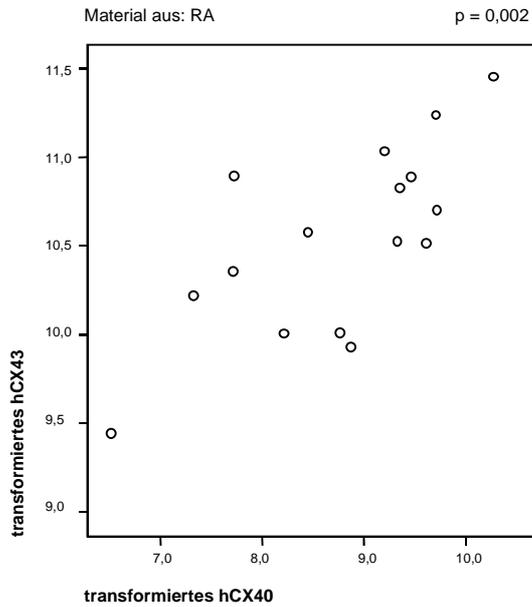
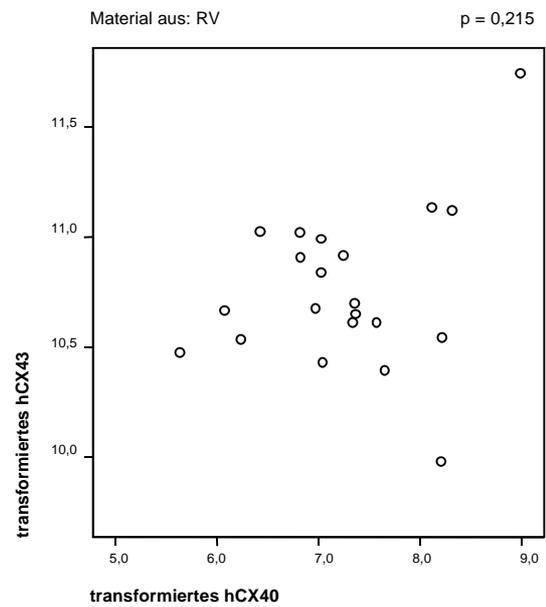


Abbildung 13: Korrelationsdiagramm zwischen hCx40- und hCx43-m-RNA-Expression (transformiert), gesamt (ohne Unterteilungen in die einzelnen Lokalisationen).

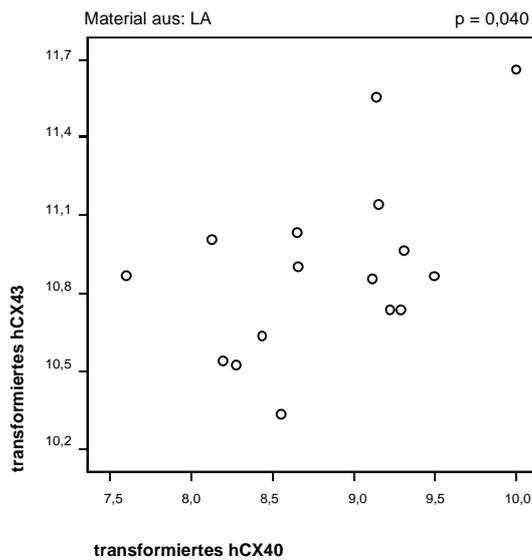
a.



b.



c.



d.

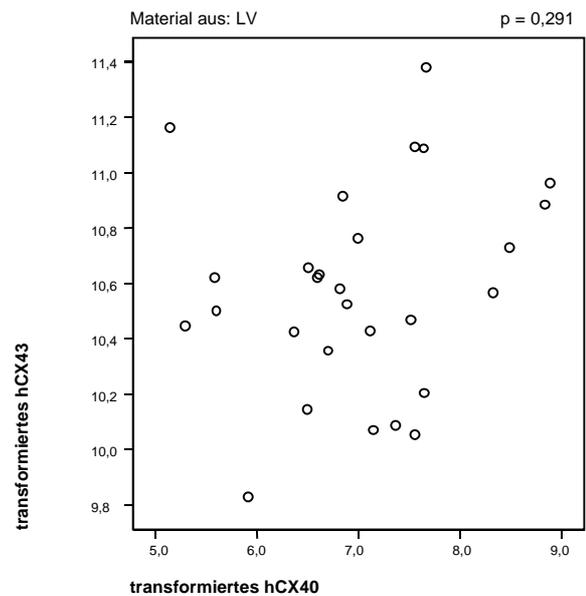


Abbildung 14: Korrelationsdiagramme zwischen hCx40- und hCx43-mRNA-Expression (transformiert), Unterteilungen in die einzelnen Lokalisationen, a: Material aus RA, b: Material aus RV, c: Material aus LA, d: Material aus LV.

3.2.6 Zusammenhang zwischen hämodynamischen Parametern und Genexpression von hCx40 und hCx43

Die Ergebnisse der Analyse der möglichen Zusammenhänge zwischen der mRNA-Expression von hCx40 bzw. hCx43 und der hämodynamischen Parameter Herzindex

und PA-Druck zeigen Tabellen 5 und 6. Die berechneten Korrelationskoeffizienten wiesen keinen bzw. nur schwachen Zusammenhang auf und waren auf dem 5 %-Niveau statistisch nicht auffällig.

Tabelle 5: Rangkorrelationsanalyse nach Spearman zwischen hCx40-mRNA-Expression (transformiert) und hämodynamischen Parametern (a: Herzindex, b: PA-Druck).

Hämodynam. Parameter	Kammern	Anzahl	Korrelationskoeffizient	p-Wert
Herzindex	RA	10	0,486	0,154
	RV	14	-0,141	0,631
	LA	10	0,340	0,336
	LV	21	-0,139	0,547
PA-Druck	RA	9	-0,350	0,356
	RV	12	0,510	0,090
	LA	11	-0,337	0,311
	LV	21	-0,194	0,400

Tabelle 6: Rangkorrelationsanalyse nach Spearman zwischen hCx43-mRNA-Expression (transformiert) und hämodynamischen Parametern (a: Herzindex, b: PA-Druck).

Hämodynam. Parameter	Kammern	Anzahl	Korrelationskoeffizient	p-Wert
Herzindex	RA	10	0,267	0,455
	RV	14	0,341	0,233
	LA	10	0,571	0,084
	LV	21	-0,055	0,812
PA-Druck	RA	9	-0,100	0,798
	RV	12	-0,161	0,618
	LA	11	-0,428	0,189
	LV	21	-0,150	0,518

3.3 Natriuretische Peptide

3.3.1 hANP und hBNP-Transformation

Bei den natriuretschen Peptiden ergaben sich ebenso wie bei den Connexinen keine normalverteilten Meßwerte. Nach Multiplikation mit 1000 und zweimaligem Wurzelziehen dieser Werte ergaben sich jedoch normalverteilte Werte, die in die Varianzanalyse eingehen konnten.

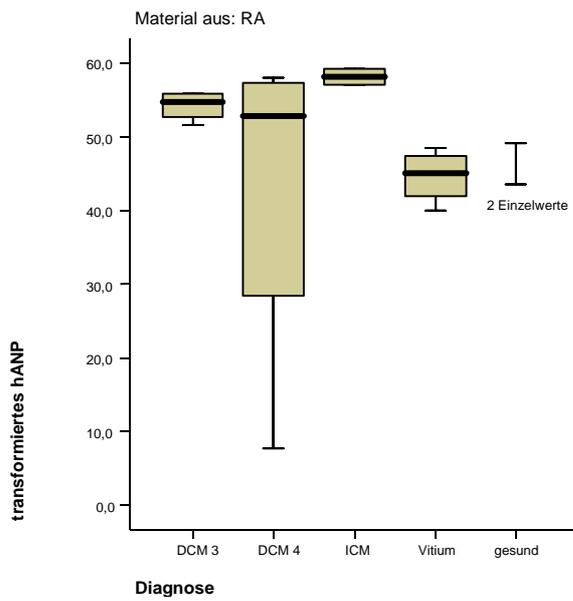
Die Fragestellung, inwieweit die mRNA-Expression von hANP und hBNP bei dilatativer oder ischämischer Kardiomyopathie bzw. bei Vitium im Vergleich zu der gesunder Probanden verändert ist, wurde in der explorativen Datenanalyse optisch und der anschließenden Varianzanalyse statistisch dargestellt und beantwortet.

3.3.2 Explorative Datenanalyse der hANP-Expression bei verschiedenen Erkrankungen in den rechten und linken Vorhöfen und Hauptkammern

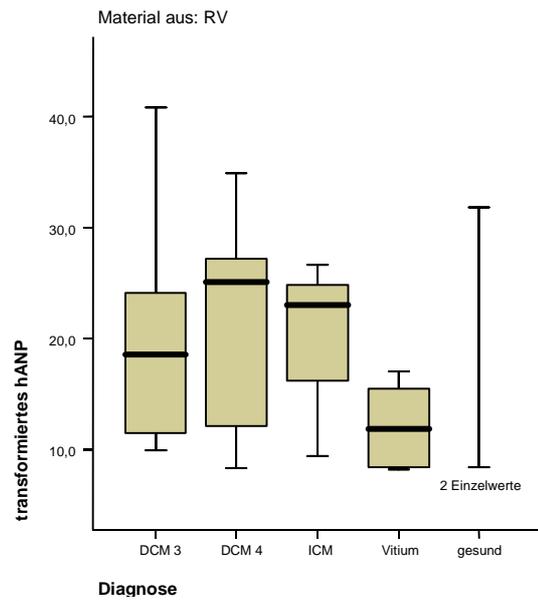
Weder in den links- bzw. rechtsatrialen noch in den links- bzw. rechtsventrikulären Herzgeweben war eine differente hANP-mRNA-Expression auf dem 5 %-Niveau zu erkennen.

Die Ergebnisse der Analyse sind in der Abbildung 15, der Tabelle 7 und im Anhang wiedergegeben.

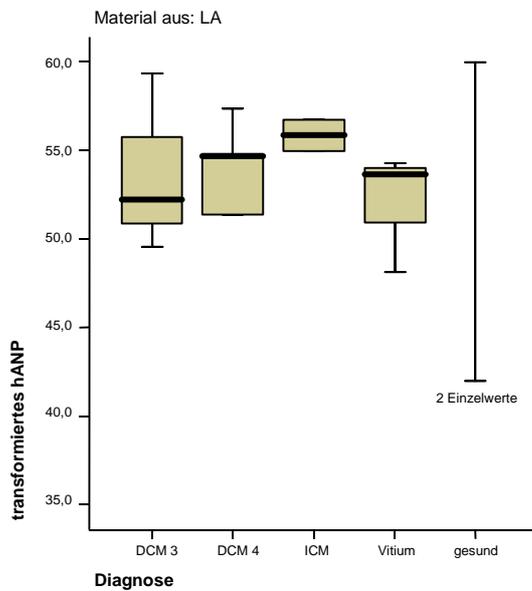
a:



b:



c:



d:

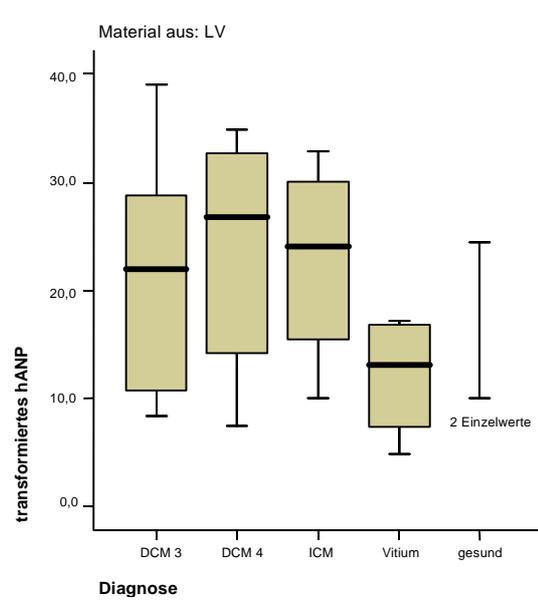


Abbildung 15: Boxplots für Messwerte von hANP nach Transformation für DCM 3, DCM4, ICM, Vitium und gesund in a: RA, b: RV, c: LA und d: LV.

Tabelle 7: Analyse transformiertes hANP

	Median	1. Quartil	3. Quartil	Mittelwert	Standard-abweichung	Minimum	Maximum
DCM 3							
RA	54,7599	52,1239	55,8223	54,2354	2,0075	51,5404	55,8813
RV	18,5432	11,0849	28,2893	20,5759	11,3866	9,9508	40,8547
LA	52,2116	50,2053	57,5744	53,3304	4,2141	49,5366	59,3620
LV	21,9524	10,3436	29,2927	21,2480	10,0047	8,4189	39,0086
DCM 4							
RA	52,8743	17,9904	57,6673	42,8440	23,8091	7,6150	58,0124
RV	25,1336	10,1744	31,0772	21,5274	11,0662	8,2736	34,9137
LA	54,6904	43,8430	56,0708	50,9036	8,4248	36,3224	57,3639
LV	26,7506	11,9202	33,6888	23,6876	10,7331	7,4322	34,8885
ICM							
RA	58,1742	57,0883	59,2601	58,1742	1,5357	57,0883	59,2601
RV	23,0067	9,3828	26,6366	19,6754	9,0965	9,3828	26,6366
LA	55,8493	54,9885	56,7101	55,8493	1,2173	54,9885	56,7101
LV	24,0850	12,7507	31,4712	22,7690	9,7957	10,0519	32,8539
Vitium							
RA	45,1032	40,9799	47,9091	44,6641	3,6191	39,9929	48,4570
RV	11,8827	8,2872	16,2635	12,1968	4,0275	8,1783	17,0098
LA	53,6444	48,1537	54,3057	52,0346	3,3772	48,1537	54,3057
LV	13,1174	6,1206	16,9884	12,0755	5,8145	4,8733	17,1939

3.3.3 Explorative Datenanalyse der hBNP-Expression bei verschiedenen Erkrankungen in den rechten und linken Vorhöfen und Hauptkammern

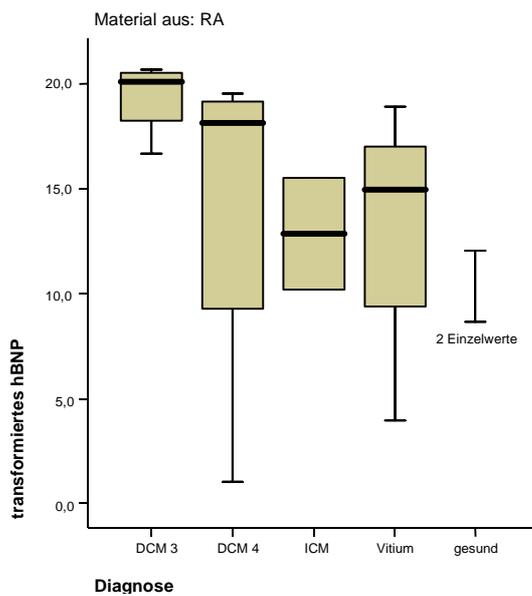
Die Untersuchungen der rechtsatrialen und linksventrikulären Herzgewebe zeigten keine Differenz der hBNP-mRNA-Expressionen zwischen den verschiedenen Herzerkrankungen bzw. vergleichend zu gesunden Probanden.

Im Gewebe der rechten Herzkammer war jedoch bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie NYHA 4 im Gegensatz zu Patienten mit einem Vitium eine

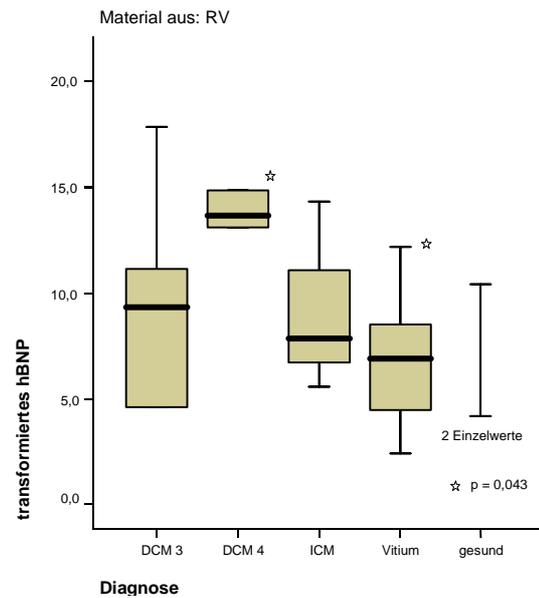
signifikant erhöhte Expression des hBNP zu erkennen (p-Wert 0,043).

Im linksatrialen Herzgewebe zeigte sich bei Vergleich zu gesunden Probanden eine erhöhte Expression bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie NYHA 3. (Wegen der niedrigen Anzahl der gesunden Proben wurde auf die Angabe des p-Wertes verzichtet). Die Ergebnisse der Analyse sind in der Abbildung 16, der Tabelle 8 und im Anhang wiedergegeben.

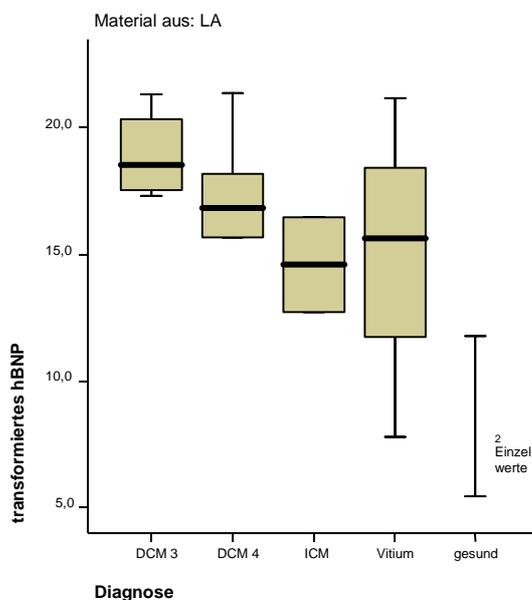
a:



b:



c:



d:

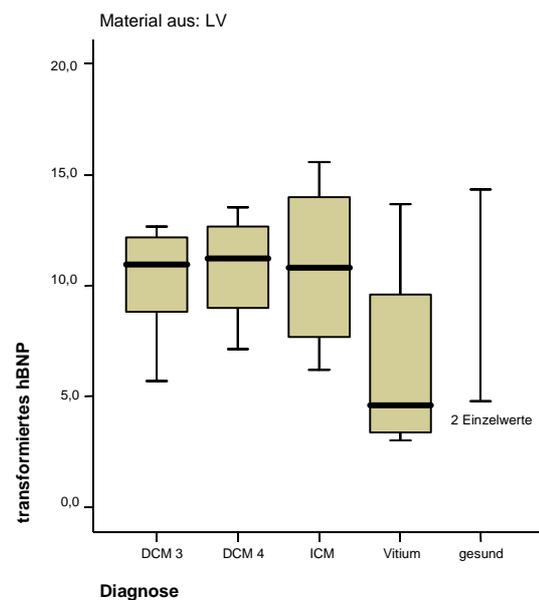


Abbildung 16: Boxplots für Messwerte von hBNP nach Transformation für DCM 3, DCM4, ICM, Vitium und gesund in a: RA, b: RV, c: LA und d: LV.

Tabelle 8: Analyse transformiertes hBNP

	Median	1. Quartil	3. Quartil	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
DCM 3							
RA	20,1001	17,4487	20,6193	19,3894	1,8575	16,6563	20,7011
RV	9,3263	4,6055	12,8238	9,4788	4,9200	4,5980	17,8736
LA	18,5474	17,4337	20,8242	18,9351	1,8082	17,3125	21,3331
LV	10,9403	8,0477	12,2986	10,3822	4,0217	3,5958	18,2611
DCM 4							
RA	18,1689	5,1453	19,3547	14,2230	8,8525	1,000	19,5541
RV	13,6456	9,1899	17,6109	13,4494	5,3995	5,2980	20,3827
LA	17,8218	10,6638	19,7821	15,5427	5,9251	5,6567	21,3784
LV	11,2078	8,0689	13,0922	10,9177	4,6851	2,6806	18,8983
ICM							
RA	12,8659	10,1980	15,5338	12,8659	3,7730	10,1980	15,5338
RV	7,8172	5,5305	14,3448	9,2309	4,5740	5,5305	14,3448
LA	14,5939	12,7120	16,4758	14,5939	2,6614	12,7120	16,4758
LV	10,8100	6,9433	14,7800	10,8444	4,0477	6,2039	15,5537
Vitium							
RA	14,9365	6,6534	17,9576	13,1825	6,4530	3,9253	18,9317
RV	6,9029	3,4097	10,3381	6,8797	3,7735	2,3828	12,1881
LA	15,6312	7,7997	21,1730	14,8680	6,7192	7,7997	21,1730
LV	4,6006	3,2011	11,6291	6,4769	4,9101	3,0299	13,6766

3.3.4 Zusammenhang zwischen dem Grad der Herzinsuffizienz (NYHA 3 und 4) und der Genexpression von hANP und hBNP bei DCM

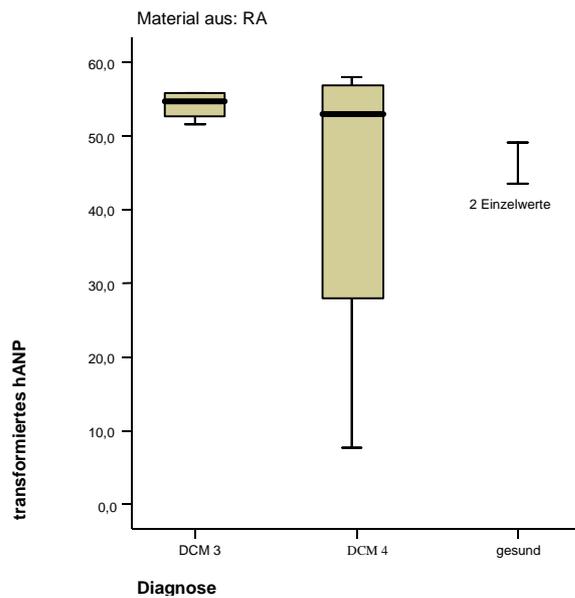
Erstaunlicherweise war eine differente mRNA-ANP-Expression bei Patienten mit unterschiedlich stark ausgeprägter Herzinsuffizienz weder optisch in der explorativen Datenanalyse noch statistisch in der Varianzanalyse zu erkennen (siehe Abbildung 17 und Anhang).

Bei weiterer Betrachtung der differentiellen mRNA-BNP-Expression ist diese zwischen DCM 3 und gesund im linksatrialen Herzgewebe auffallend (Wegen der niedrigen

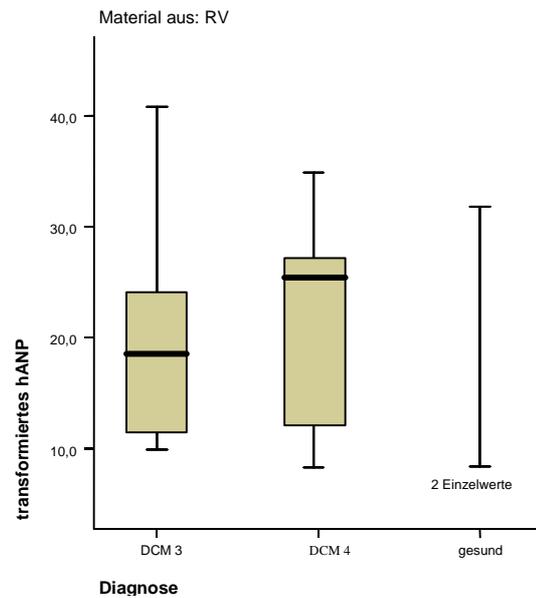
Anzahl der gesunden Proben wurde auf die Angabe des p-Wertes verzichtet). Eine ähnliche Tendenz deutet sich ebenso im rechten Vorhof bei dilatativer Kardiomyopathie hin. Keine Änderung der mRNA-BNP-Expression in Abhängigkeit von der Herzinsuffizienz zeigte die Betrachtung der links- bzw. rechtsventrikulären Myokardproben.

Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 18 und im Anhang wiedergegeben.

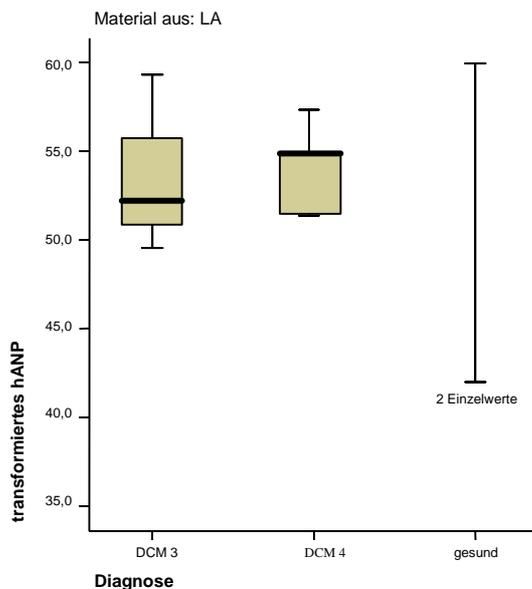
a:



b:



c:



d:

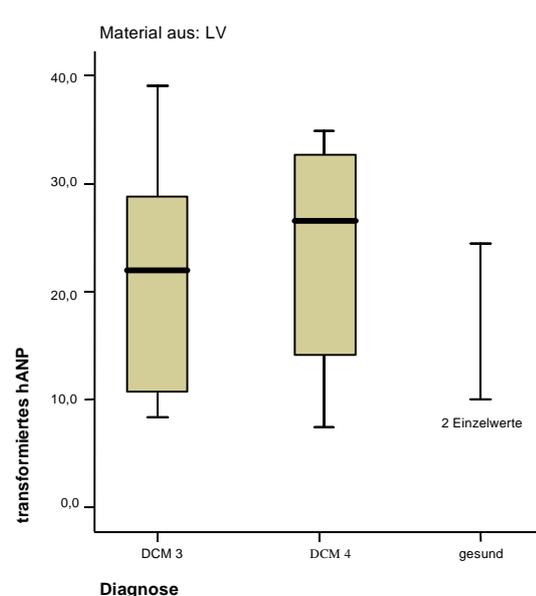
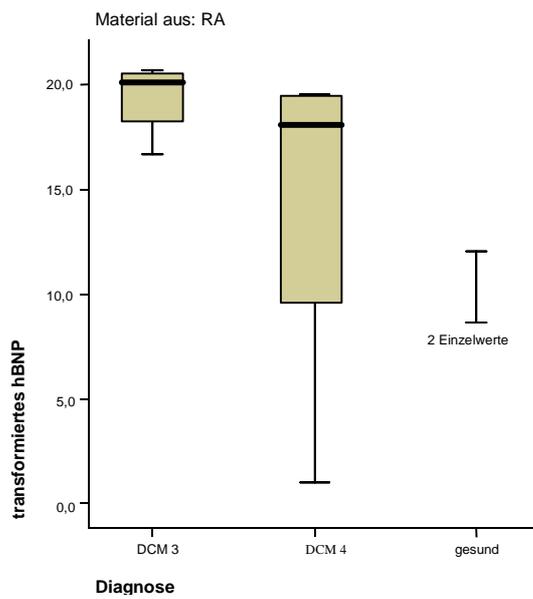
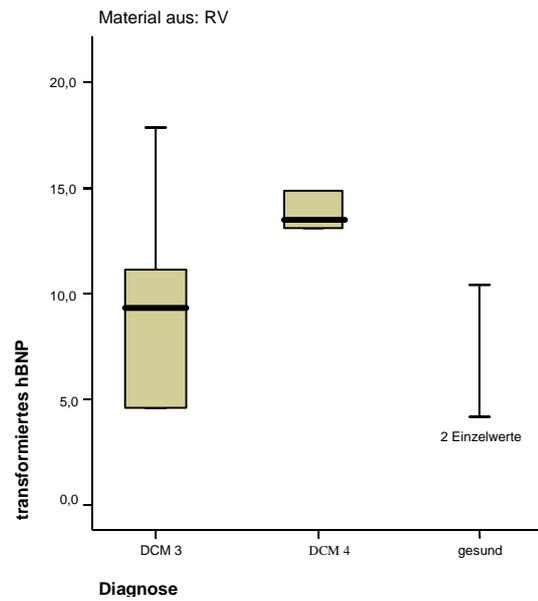


Abbildung 17: Zusammenhang zwischen dem Grad der Herzinsuffizienz und der m-RNA-Expression von hANP in a: RA, b: RV, c: LA und d: LA.

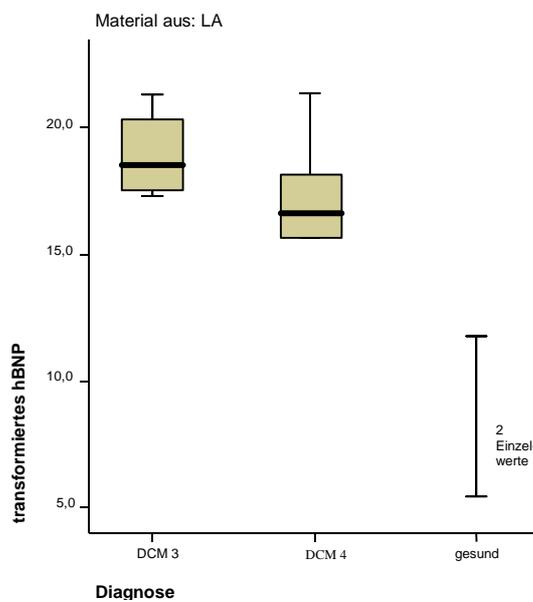
a:



b:



c:



d:

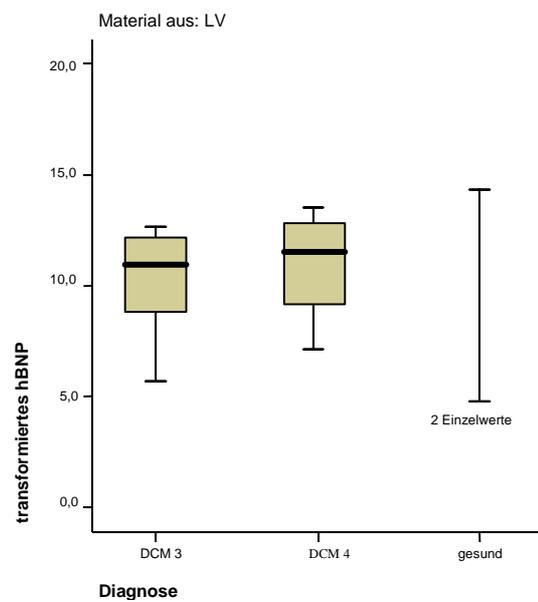


Abbildung 18: Zusammenhang zwischen dem Grad der Herzinsuffizienz und der m-RNA-Expression von hBNP in a: RA, b: RV, c: LA und d: LA.

3.3.5 Zusammenhang zwischen hANP- und hBNP-Genexpression

In einer zusätzlichen Untersuchung wurde der Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression von ANP und BNP mit Hilfe einer Rangkorrelation nach PEARSON analysiert. Der hochpositive Korrelationskoeffizient für das linksventrikuläre ($r = 0,806$ und $p = 0,000$) und das linksventrikuläre ($r = 0,862$ und $p = 0,000$) Myokard deutet auf einen starken Zusammenhang hin. Ein schwächerer, dennoch starker und eindeutiger Zusammenhang zwischen mRNA-Expression von ANP und BNP errechnete sich für das rechtsatriale Myokard ($r = 0,737$ und $p = 0,001$). Das Ergebnis der Analyse veranschaulichen Abbildungen 19 und 20.

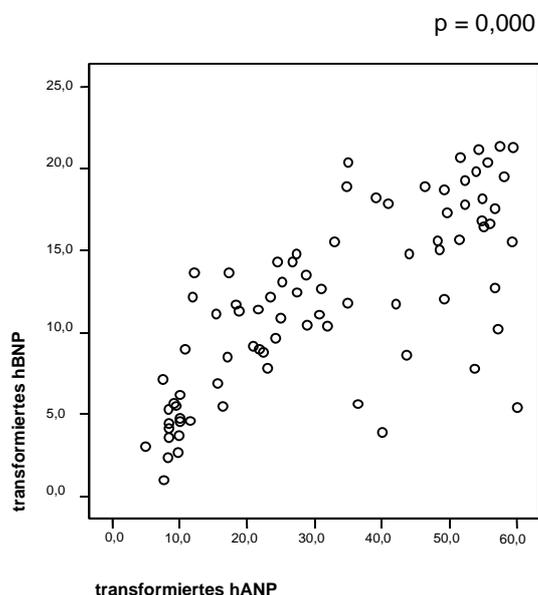
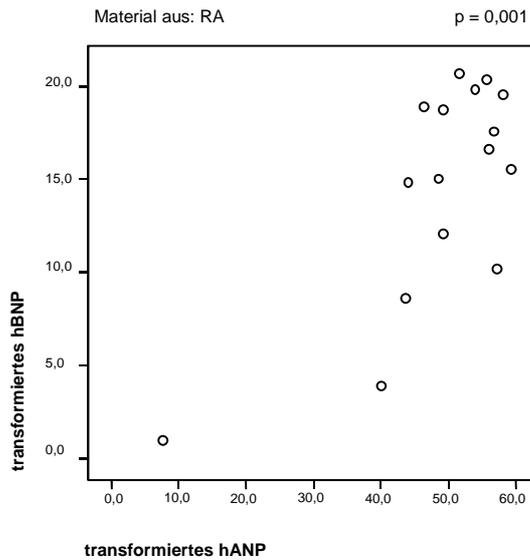
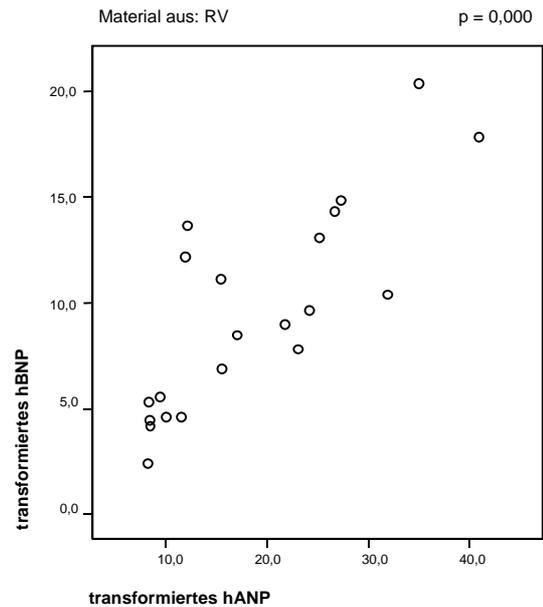


Abbildung 19: Korrelationsdiagramm zwischen hANP- und hBNP-mRNA-Expression (transformiert), gesamt (ohne Unterteilungen in die einzelnen Lokalisationen).

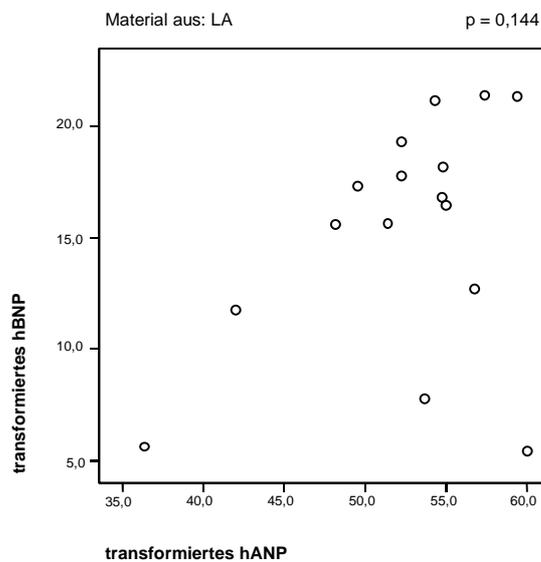
a:



b:



c:



d:

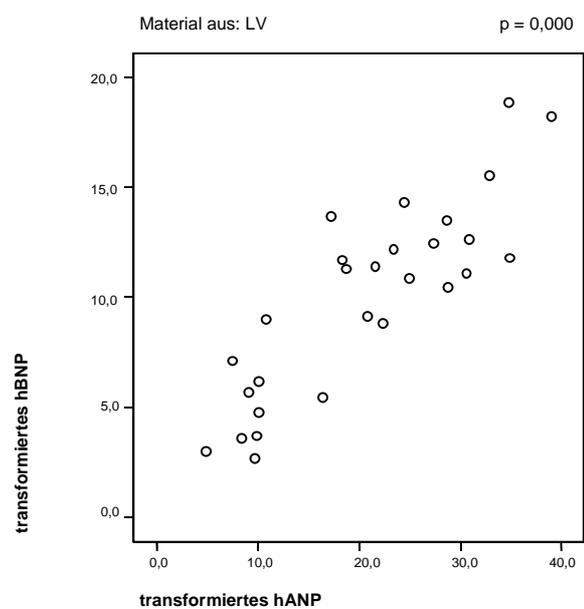


Abbildung 20: Korrelationsdiagramme zwischen hANP- und hBNP-mRNA-Expression (transformiert), Unterteilungen in die einzelnen Lokalisationen, a: Material aus RA, b: Material aus RV, c: Material aus LA, d: Material aus LV.

3.3.6 Zusammenhang zwischen hämodynamischen Parametern und Genexpression von hANP und hBNP

Entsprechend der Ergebnisse der hCX-Untersuchungen ergaben auch die Korrelationskoeffizienten im Fall der ANP und BNP-Expression keinen bzw. nur

leichten Zusammenhang mit den hämodynamischen Parametern Herzindex und PA-Druck (siehe Tabellen 9 und 10).

Tabelle 9: Rangkorrelationsanalyse nach Spearman zwischen hANP-mRNA-Expression (transformiert) und hämodynamischen Parametern (a: Herzindex, b: PA-Druck).

Hämodynam. Parameter	Kammern	Anzahl	Korrelationskoeffizient	p-Wert
Herzindex	RA	10	0,462	0,179
	RV	14	-0,062	0,834
	LA	10	0,176	0,626
	LV	21	-0,282	0,216
PA-Druck	RA	9	-0,117	0,765
	RV	12	0,070	0,829
	LA	11	-0,241	0,474
	LV	21	-0,137	0,555

Tabelle 10: Rangkorrelationsanalyse nach Spearman zwischen hBNP-mRNA-Expression (transformiert) und hämodynamischen Parametern (a: Herzindex, b: PA-Druck).

Hämodynam. Parameter	Kammern	Anzahl	Korrelationskoeffizient	p-Wert
Herzindex	RA	10	0,523	0,121
	RV	14	-0,057	0,846
	LA	10	0,188	0,602
	LV	21	-0,047	0,840
PA-Druck	RA	9	-0,533	0,139
	RV	12	0,035	0,914
	LA	11	-0,460	0,154
	LV	21	-0,230	0,317

4 Diskussion

4.1 Connexine

4.1.1 Vorbemerkung

Gap Junctions spielen im Herzen für die elektrische Kopplung der Myokardzellen eine bedeutende Rolle und ermöglichen somit eine koordinierte Muskelkontraktion, sind allerdings auch involviert in der Entwicklung von Rhythmusstörungen (Yeager, 130).

Herzgewebe haben eine strikte räumliche Verteilung der Gap Junction-Kanäle. Es wird zunehmend klarer, dass eine Störung der Gap Junction-Expression, der Verteilung und der Funktion eine wichtige Rolle bei Herzerkrankungen spielt (Donaldson et al., 34).

4.1.2 Interpretation der Ergebnisse

Zahlreiche Autoren wie Dupont et al. (36), Barker und Gourdie (4), Kaprielien et al. (58), Peters et al. (83), Smith et al. (103) und Sepp et al. (97) berichten über eine veränderte Expression bzw. Anordnung von hCx40 und hCx43 in Herzgeweben erwachsener Patienten mit fortgeschrittenen ischämischen bzw. hypertrophen Kardiomyopathien.

Smith et al. (103), Sepp et al. (97) und Kaprielian et al. (58) konnten an terminal insuffizienten Herzen erwachsener Patienten am ventrikulären Herzmuskel ein veränderte Anordnung, Peters et al. (83) und Dupont et al. (36) eine zusätzlich verminderte Expression von hCx43 beobachten. Im Gegensatz zu Dupont et al. (36), der ein erniedrigtes hCx43-mRNA-Expressions- und Proteinniveau bei terminal herzinsuffizienten Patienten mit DCM und ICM im linken Ventrikel feststellen konnte, zeigten die in dieser Arbeit erlangten Untersuchungsergebnisse bei Patienten mit DCM (NYHA 3 und 4) und ICM sowohl im links- und rechtsartialen als auch im links- und rechtsventrikulären Myokard keine Veränderung des hCx43-mRNA-

Expressionsniveaus. Jedoch beobachteten Dupont et al. in der gesunden Vergleichsgruppe eine deutliche Inhomogenität der mRNA-Expression von hCx43. Eine derartige Variabilität des mRNA-Expressionsniveaus in diesem Untersuchungsgut erklärt möglicherweise die fehlende Expressionsänderung.

Auffallend war jedoch die deutliche linksatriale erhöhte mRNA-Expression von hCx43 in der Gruppe der Herzvitien. Eine Erklärung könnte in der Organogenese und der bereits embryonalen starken Belastung des linken Atriums liegen. Entsprechend zu diesem Ergebnis konnten Gros und Jongsana (47) bei Mäusen mit Überexpression des Cx43 sowie Herzmissbildungen als auch eine Herzdilatation und Chen et al. (16) mittels Immunfluoreszenz in hypertrophiertem Herzgewebe bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern eine erhöhte hCx43 feststellen. Die hier verwendeten Gewebeproben wurden vor allem aus insuffizienten Herzen von Patienten mit Links-Rechts-Shunt Vitien (meist beinhaltend VSD und ASD) gewonnen. Hierbei wird der linke Vorhof aufgrund des erhöhten pulmonalen Herzzeitvolumens belastet. Dies könnte die erhöhte hCx43 Expression ebenfalls erklären.

Neben einem erniedrigten linksventrikulären hCx43-mRNA-Expressionsniveau bei terminal herzinsuffizienten Patienten mit DCM und ICM konnten Dupont et al. (36) ausschließlich bei Patienten mit ICM (nicht bei Patienten mit DCM) eine erhöhte hCx40-mRNA-Expression in den Ventrikeln (in LV stärker als in RV) erkennen. In immunzytochemischen Untersuchungen zeigten sie eine vermehrte Cx40-Proteinexpression besonders in den an die Purkinje-Fasern angrenzenden Monozyten des Arbeitsmyokards und äußerten die Vermutung einer kompensatorisch erhöhten Cx40-Expression auf die erniedrigte Cx43-Expression.

Die Analyse hier ergab eine Erniedrigung der hCx40-mRNA-Expression im rechten Vorhof und Ventrikel bei Patienten mit DCM im Vergleich zu gesunden Probanden. Während die erniedrigte hCx40-mRNA-Expression in RV statistisch belegt ist, kann dies im RA beim direkten Vergleich zu gesunden Probanden mit Hilfe der explorativen Datenanalyse optisch dargestellt werden (siehe Abbildung 8). Dies ist insofern interessant, nachdem hCx40 sowohl im Reizleitungssystem als auch im Arbeitsmyokard des Vorhofs nachzuweisen und das Hauptconnexin für das Reizleitungssystem darstellt (Bruzzone et al., 12; Chen et al., 16; Davis et al., 25 und Saez et al., 92). Laut Vozzi et al. wird es jedoch am stärksten im rechten Atrium exprimiert. Somit ist die hier ermittelte Erniedrigung der hCx40-mRNA-Expression im

Zusammenhang mit einer terminalen dilatativen Kardiomyopathie erstaunlich und entspricht den Ergebnissen von Saez et al. (92), welche bei Modellen mit Vorhofflimmern eine reduzierte Expression von hCx40 und keine Änderung der Expression von hCx43 beobachten konnten. Bei dilatativer Kardiomyopathie ist möglicherweise die Reizleitung durch die extreme Dilatation bei NYHA 3 und 4 stark beeinträchtigt und eventuell eine erhöhte Expression von hCx40 und hCx43 nicht mehr effizient und somit auch nicht vorhanden.

Da im Bereich des Eintritts der Purkinjefasern in den Arbeitsmyokard beide Connexine hCx40 und hCx43 exprimiert werden und parallel homotypische Gap Junction-Kanäle ausbilden (Donaldson et al. 34), bestätigt die positive Korrelation von hCx40- und hCx43-mRNA-Expression als weiteres in der Korrelationsanalyse ermittelte Ergebnis mit einem p-Wert von 0,002 am stärksten auftretend im rechten Atrium diese Aussage, da bei einer Herzerkrankung (vor allem DCM und ICM) die Reizleitung, und in diesem Fall das gesamte Gerüst der Gap Junction-Kanäle (bestehend vor allem im rechten Atrium aus hCX40 und hCX43-Proteine) gestört ist.

Keinen Zusammenhang erbrachte die Untersuchung der Abhängigkeit des mRNA-Expressionsniveaus von den hämodynamischen Parametern Herzindex und PA-Druck. Nachdem zu den hier verwendeten gesunden Proben keine ausreichende Angaben zu weiteren hämodynamischen Parametern bekannt waren, wäre eine weitere Untersuchung mit Kenntnis einiger Parameter zum optimalen Vergleich zu denen von Herzerkrankten wünschenswert.

4.2 Natriuretische Peptide

4.2.1 Vorbemerkung

Der kompensatorische Mechanismus von ANP und BNP bei Herzinsuffizienz erfolgt durch mannigfaltige Wirkungen dieser Peptide wie Natriurese, Diurese, Vasodilatation und Suppression von Renin-Angiotensin-Aldosteron bzw. sympathischem System (de Bold et al., 29) und spielt dadurch in der Regulation des zirkulierenden intravasalen Volumens eine bedeutende Rolle (Levin et al. 65; Rodeheffer et al., 89).

Im gesunden Herzen wird BNP im Gegensatz zu ANP, das vor allem in den Vorhöfen

gebildet wird, in kleineren Mengen im Vorhof, jedoch ausgeprägter im Ventrikel exprimiert (Hosoda et al., 52; Mukoyama et al., 75; Takahasi et al., 108; Tsutamo et al., 110; Yasue et al., 129).

4.2.2 Interpretation der Ergebnisse

Bei Herzerkrankungen wurden bereits Veränderungen der ANP- und BNP-mRNA-Expression bzw. Erhöhung der ANP- bzw. BNP-Plasmaspiegel nachgewiesen.

Bei chronischer Herzinsuffizienz konnten Mukoyama et al. (75) eine Erhöhung der ANP-mRNA-Expression im Atrium und im Ventrikel beobachten. Auch eine erhöhte atriale und ventrikuläre Sekretion von ANP wiesen Yasue et al. (129) nach. Mit einer deutlichen Erhöhung der BNP-Expression und -Sekretion reagiert vor allem der Ventrikel bei chronischer Herzinsuffizienz (Mukoyama et al., 75; Yasue et al.; 129). Burnett et al. (15) war es möglich eine mit der Schwere der Herzinsuffizienz korrelierende Plasmakonzentrationserhöhung nachzuweisen.

Während bereits zahlreiche Studien über den Zusammenhang zwischen dem Grad einer Herzinsuffizienz und der Plasmakonzentrationen von ANP und BNP bestehen (Burnett et al., 15; de Bold et al. 28; Mukoyama et al., 75; Levin et al., 65; Mair et al., 68; Wei et al., 122; Yasue et al., 128), gibt es leider nur sehr wenige Autoren, die über eine erhöhte mRNA-Expression der natriuretischen Peptide berichten. So konnten Takahasi et al. (108) bei terminal herzinsuffizienten Patienten im Vergleich zu gesunden Herzproben eine erhöhte mRNA-Expression im linken Ventrikel nachweisen. Diese vorliegende Untersuchung ergab wie bei Hystad et al. (54) bei dilatativer Kardiomyopathie keine BNP-mRNA-Expressionserhöhung im linken bzw. rechten Ventrikel, jedoch war mit einer statistischen Auffälligkeit im linken Atrium und eine Tendenz ohne Erreichen des Signifikanzniveaus auch im rechten Atrium zu beobachten. Eine erhöhte BNP-mRNA-Expression konnten auch Doyama et al. (35) im rechten Vorhof bei erhöhter Druckbelastung des Herzens beobachten. Nachdem BNP hauptsächlich im Ventrikel synthetisiert wird, ist eine mögliche zusätzlich erhöhte Expression im Atrium bei starker Belastung des Herzens in Erwägung zu ziehen. Keine Unterschiede zeigte die Analyse der BNP-mRNA-Expression bei ischämischer Kardiomyopathie bzw. bei Vitium als auch die ANP-mRNA-Expression bei DCM, ICM und Vitium. Die Erklärung könnte in der bereits angesprochenen Variabilität der mRNA-Expression liegen. Bei den Herzvitien ist allerdings ebenfalls zu berücksichtigen, dass die BNP-Konzentration bei gesunden

Kindern grundsätzlich höher liegt als bei gesunden Erwachsenen (Ationu et al., 3) und somit der Vergleich mit Proben erwachsener Probanden nicht optimal ist. Vergleichbare Daten sind leider nicht vorhanden, da derzeit noch keine Untersuchungen von gesunden bzw. herzkranken Kindern mit Feststellung der Veränderung der mRNA-Expression erfolgt sind.

Eine deutliche Korrelation zwischen der ANP- und BNP-mRNA-Expression war in dieser Arbeit zu erkennen. Dieses Ergebnis bekräftigt die Aussagen von Takahashi et al. (108) und Doyama et al. (35), dass im linken Ventrikel bzw. rechten Atrium ein positiver Zusammenhang der Expression von ANP und BNP bei terminaler Herzinsuffizienz besteht. Wir konnten nicht nur im linken Ventrikel, sondern auch im rechten Ventrikel und rechten Atrium eine starke Signifikanz mit einem p-Wert von 0,000 bis 0,001 feststellen, auch im linken Atrium deutete sich dieser Zusammenhang an ($p = 0,144$).

Yasue et al. (129) konnten nicht nur eine Erhöhung des ANP- und BNP-Plasmaspiegels bei DCM beobachten, sondern auch eine signifikant positive Korrelation des ANP-Spiegels zu hämodynamischen Parametern wie PCWP (pulmonaler Druck) und LVEDP (linksventrikulärer enddiastolischer Druck). Die höchste positive Korrelation von ANP und BNP zeigte sich dabei mit LVESVI (linksventrikuläres enddiastolisches Volumen-Index), woraufhin sich der Verdacht einer ANP- und BNP-Synthese vom linken Ventrikel entwickelte. Ebenso war die ANP-Synthese zum Herzindex negativ korreliert. Auch de Boer et al. (26) konnte bei Patienten mit idiopathischer Kardiomyopathie eine Korrelation der ANP- bzw. BNP-Expression mit hämodynamischen Parametern wie LVEDP und PA-Druck feststellen. Die hier vorgenommene Untersuchung zur Ermittlung eines möglichen Zusammenhangs der ANP- bzw. BNP-mRNA-Expression bei DCM, ICM und Vitium zu Herzindex und PA-Druck zeigte keine Signifikanz. Dies kann neben der möglichen Variabilität auch daran liegen, dass die medikamentöse Behandlung die Regelkreise beeinflusst haben.

5 Zusammenfassung

Die heutzutage nicht selten auftretenden Erkrankungen des Herzens unterschiedlicher Ausprägung bzw. Genese steigerten in den letzten Jahrzehnten das Interesse über das Wissen des genauen Funktionszustands der Herzmuskelzelle. Mit dem Ziel eines differenzierten quantitativen Nachweises von Transkripten bei verschiedenen Herzerkrankungen bzw. gegenüber herzgesunder Probanden und damit einer unterschiedlichen Aktivität von Connexin 40 und 43 bzw. ANP und BNP als pathophysiologische Gene wurden in der vorliegenden Arbeit Herzmuskelproben aus rechtem und linkem Atrium bzw. Ventrikel mittels der quantitativen PCR untersucht. Dieses Material stammte von herzkranken Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen mit Vitium, ICM und DCM. Leider konnte aus ethischen Gründen nicht bei jedem Patienten genügend Herzgewebe aus allen vier Kammern entnommen werden. Somit gestaltete sich das Patientenkollektiv zwar als heterogen, aber trotzdem als sehr interessant. Erfreulicherweise gab sich zusätzlich die seltene Gelegenheit Herzgewebe explantierter Herzen zu erhalten, dies sogar aus allen vier Herzkammern. Wegen der jedoch niedrigen Anzahl von insgesamt 8 Proben gesunder Probanden (je 2 Gewebeproben aus LA, LV, RA und RV) startete ich neben der Darstellung teils signifikant differenter Genexpressionen in Herzgeweben zwischen verschiedenen Herzerkrankungen in unterschiedlichen Kammern einen Vergleich der differentiellen Expression zwischen gesunden und herzkranken Probanden. Nach Isolierung und Reinigung der RNA, Bestimmung der Konzentration und Qualität der präparierten RNA mittels Spektralphotometrie und Gelelektrophorese erfolgte die Synthese der komplementären DNA. Die für die quantitative notwendige Standardkurvenerstellung setzte sich aus Sonden- und Primerdesign, Klonierung, Transformation kompetenter Bakterien, hydrolytische Spaltung der Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen, DNA-Sequenzierung zur Aufklärung der genauen Nukleotidabfolge, Linearisierung des Plasmids und anschließende absolute Quantifizierung zusammen.

Mit Hilfe der Real-Time TaqManTM-PCR konnte in dieser Arbeit ein deutlich reduziertes rechtsartiales und rechtsventrikuläres hCx40-mRNA-Expressionsniveau bei Patienten mit terminaler dilatativer Kardiomyopathie dargestellt werden, während die Expression im linken Atrium und Ventrikel unverändert blieben. Die erwartete

mögliche kompensatorische Erhöhung der hCx43-mRNA-Expression war nicht zu beobachten. Ebenso zeigten die Analysen bei Gewebeproben bei Patienten mit Herzvitien eine noch nicht eindeutig erklärbare linksatriale Expressionserhöhung des hCx43. Dieses Phänomen wurde bereits von diverse Autoren in Mäuse-Modellen und bei Untersuchungen an hypertrophiertem Herzgewebe von Kindern mit angeborenen Herzfehlern ebenfalls beschrieben. Weiterhin konnte eine positive Korrelation der hCx40- und hCx43-mRNA-Expression in beiden Vorhöfen (rechts > links) dargestellt werden, welches die Co-Existenz und das Zusammenspiel der beiden Connexine bestärkt, jedoch die Theorie einer möglichen kompensatorisch gegensätzlichen Ausprägung der Expression widerlegt.

Weiterhin bestätigte sich durch die hier erlangten Ergebnisse eine erhöhte BNP-mRNA-Expression bei stärkerer Belastung des Herzens. Die statistisch signifikant erhöhte Expression von BNP im linken Atrium bei dilatativer Kardiomyopathie ist als Folge einer erhöhten Belastung des Herzens zu sehen. Mir et al. (71) sind der Meinung, dass der BNP-Spiegel im Plasma demnächst eine hilfreiche Verlaufskontrolle bei verschiedenen Behandlungsmethoden bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie sein könnte. Die Bestimmung der mRNA-Expression wäre ebenso eine Möglichkeit, jedoch aufgrund verschiedener noch nicht klar definierter Fremdeinflüsse wie Variabilität der „Basis-mRNA-Expression“ und Medikamentenwirkung auf die Expression sind derzeit weitere Forschungen diesbezüglich sicherlich noch erforderlich. Auf Medikation vor der Durchführung der notwendigen Herztransplantation wurde in dieser Arbeit bewußt verzichtet, da dies zu weiteren Unterteilungen der ohnehin recht kleinen Gruppen und somit zu weiterer Reduktion der Gruppennzahlen geführt hätte. Dies wäre allerdings ein guter Ansatz eines weiteren Forschungsziels.

Ruskoaho et al. (97) sind davon überzeugt, dass mit Hilfe einer frühen Identifizierung der Patienten, die ein hohes Risiko besitzen, eine kardiovaskuläre Erkrankung zu entwickeln, mit Hilfe der Bestimmung der Plasmaspiegel eine rasche, dem Spiegel angepasste Behandlung, und somit ein besseres Outcome zu ermöglichen. Vielleicht ist dies nicht nur durch Plasmaspiegel, sondern auch mit Hilfe der mRNA-Bestimmung dieser Peptide eine künftige Möglichkeit, Patienten mit Verdacht auf Entwicklung einer kardiovaskulären Erkrankung früh zu erkennen und rasch einer optimalen Therapie zu unterziehen.

Eine mögliche neue Behandlungsstrategie mit natriuretischen Peptiden zur

Verhinderung der Entwicklung einer Herzhypertrophie und Kontrolle der Manifestation einer kardiovaskulären Erkrankung ist ebenso in Erwägung zu ziehen. Ebenfalls besteht die Möglichkeit einer Therapie mit NEP-Inhibitoren (Inhibitoren der neutralen Endopeptidase), die den Plasmaspiegel der natriuretischen Peptide erhöht. Eine Kombination mit einem ACE-Hemmer, der zusätzlich Angiotensin II vermindert, ist dies eventuell die zukünftige Therapie zur positiven Beeinflussung des Verlaufes der Erkrankung (Brockhoff et al., 11; Wilkins et a., 126). Brockhoff et al. (11) berichten von einer weiteren erfolgsversprechenden Substanzgruppe (duale Metalloproteaseninhibitoren). Diese ist in der Lage, den ANP-Abbau zu blockieren und zugleich das Angiotensin-Converting-Enzym zu inhibieren. Die ersten Ergebnisse von klinischen Untersuchungen mit dieser Substanzgruppe erweisen sich in der Tat als vielversprechend. Dazu ist jedoch eine möglichst frühe und umfangreiche Diagnostik im Vorfeld erforderlich, während die Bestimmung der Aktivität pathophysiologischer Gene wie Connexin 40 und 43 bzw. ANP und BNP mittels TaqManTM-PCR für die Plasma-Spiegel-Bestimmungen nach weiteren Forschungen sicherlich in Zukunft eine gute ergänzende Untersuchungsmöglichkeit wäre.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit weitere Einblicke in die Genexpression pathophysiologisch relevanter kardialer Gene bei Erwachsenen mit dilatativer bzw. ischämischer Kardiomyopathie und herzinsuffizienten Kindern mit Herzfehlern geben. Nachdem diese Ergebnisse zwar oftmals denen verschiedener Autoren entsprechen, die in der Literatur vorhandenen Daten aber teilweise noch sehr widersprüchlich erscheinen und weitere genauere Einblicke in die pathologischen Vorgänge auf dieser Ebene bedürfen, sind weitere Analysen mit höherer Probenzahl und gründlicher Diagnostik im Vorfeld mittels standardisierter Prüfung hämodynamischer Parameter (auch in der Vergleichsgruppe der herzgesunden Patienten) dringend erforderlich. Neben Herzindex und PA-Druck wären weitere Parameter wie echokardiographisch bestimmte Verkürzungsfraction oder linksventrikulärer enddiastolischer Druck und eine zusätzliche histologische Untersuchung aller Proben (auch der herzgesunden Vergleichsgruppe) mit Sicherheit eine wichtige zusätzliche Information und eine Möglichkeit der Expression korrelierender Diagnostik.

6 Anhang

6.1 Tabellen

Tabelle 1: Gestellte Hauptdiagnosen

Tabelle 2: Einteilung der Proben in 4 Gruppen

Tabelle 3: Analyse transformiertes hCx40

Tabelle 4: Analyse transformiertes hCx43

Tabelle 5: Rangkorrelationsanalyse nach Spearman zwischen hCx40-mRNA-Expression (transformiert) und hämodynamischen Parametern (a: Herzindex, b: PA-Druck).

Tabelle 6: Rangkorrelationsanalyse nach Spearman zwischen hCx43-mRNA-Expression (transformiert) und hämodynamischen Parametern (a: Herzindex, b: PA-Druck).

Tabelle 7: Analyse transformiertes hANP

Tabelle 8: Analyse transformiertes hBNP

Tabelle 9: Rangkorrelationsanalyse nach Spearman zwischen hANP-mRNA-Expression (transformiert) und hämodynamischen Parametern (a: Herzindex, b: PA-Druck).

Tabelle 10: Rangkorrelationsanalyse nach Spearman zwischen hBNP-mRNA-Expression (transformiert) und hämodynamischen Parametern (a: Herzindex, b: PA-Druck).

6.2 Abbildungen

- Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Connexins.
- Abbildung 2: Darstellung der Struktur der Familie der natriuretischen Peptide, a: ANP, b: BNP, c: CNP.
- Abbildung 3: Gelelektrophoretische Darstellung der typischen Auftrennung der 18S- und 28S-Banden.
- Abbildung 4: Gelelektrophoretische Darstellung der DNA-Freiheit der Proben.
- Abbildung 5: Gelelektrophoretische Kontrolle des PCR-Produktes am Beispiel von hCx40 und hCx43.
- Abbildung 6: Bestückung der Tubes am Beispiel des hBNP.
- Abbildung 7: Standardkurve am Beispiel des hBNP.
- Abbildung 8: Amplifikation am Beispiel des hBNP.
- Abbildung 9: Boxplots für Messwerte von hCx40 nach Transformation für DCM 3, DCM 4, ICM, Vitium und gesund in a: RA, b: RV, c: LA und d: LV.
- Abbildung 10: Boxplots für Messwerte von hCx43 nach Transformation für DCM 3, DCM4, ICM, Vitium und gesund in a: RA, b: RV, c: LA und d: LV.
- Abbildung 11: Zusammenhang zwischen dem Grad der Herzinsuffizienz und der m-RNA-Expression von hCx40 in a: RA, b: RV, c: LA und d: LV.
- Abbildung 12: Zusammenhang zwischen dem Grad der Herzinsuffizienz und der m-RNA-Expression von hCx43 in a: RA, b: RV, c: LA und d: LV.
- Abbildung 13: Korrelationsdiagramm zwischen hCx40- und hCx43-mRNA-Expression (transformiert), gesamt (ohne Unterteilungen in die einzelnen Lokalisationen).
- Abbildung 14: Korrelationsdiagramme zwischen hCx40- und hCx43-mRNA-Expression (transformiert), Unterteilungen in die einzelnen Lokalisationen, a: Material aus RA, b: Material aus RV, c: Material aus LA, d: Material aus LV.
- Abbildung 15: Boxplots für Messwerte von hANP nach Transformation für DCM 3, DCM4, ICM, Vitium und gesund in a: RA, b: RV, c: LA und d: LV.

- Abbildung 16: Boxplots für Messwerte von hBNP nach Transformation für DCM 3, DCM4, ICM, Vitium und gesund in a: RA, b: RV, c: LA und d: LV.
- Abbildung 17: Zusammenhang zwischen dem Grad der Herzinsuffizienz und der m-RNA-Expression von hANP in a: RA, b: RV, c: LA und d: LA.
- Abbildung 18: Zusammenhang zwischen dem Grad der Herzinsuffizienz und der m-RNA-Expression von hBNP in a: RA, b: RV, c: LA und d: LA.
- Abbildung 19: Korrelationsdiagramm zwischen hANP- und hBNP-mRNA-Expression (transformiert), gesamt (ohne Unterteilungen in die einzelnen Lokalisationen).
- Abbildung 20: Korrelationsdiagramme zwischen hANP- und hBNP-mRNA-Expression (transformiert), Unterteilungen in die einzelnen Lokalisationen, a: Material aus RA, b: Material aus RV, c: Material aus LA, d: Material aus LV.

6.3 Sequenzen

6.3.1 Sequenz der 18s rRNA

10	20	30	40	50
CGCTGCTCCT	CCCGTCGCCG	TCCGGGCCCG	TCCGTCCGTC	CGTCCGTCGT
60	70	80	90	100
CCTCCTCGCT	NNNNCGGGGC	GCCGGGCCCG	TCCTCACNGG	CCCCCGNNNN
110	120	130	140	150
NGTCCNGGCC	CGTCGGGGCC	TCGCCGCGCT	CTACCTTACC	TACCTGGTTG
160	170	180	190	200
ATCCTGCCAG	TGACATATGC	TTGTCTCAAA	GATTAAGCCA	TGCATGTCTA
210	220	230	240	250
AGTACGCACG	GCCGGTACAG	TGAAACTGCG	AATGGCTCAT	TAAATCAGTT
260	270	280	290	300
ATGGTTCCTT	TGGTCGCTCG	CTCCTCTCCT	ACTTGGATAA	CTGTGGTAAT
310	320	330	340	350
TCTAGAGCTA	ATACATGCCG	ACGGGCGCTG	ACCCCCTTCG	CGGGGGGGAT
360	370	380	390	400
GCGTGCATTT	ATCAGATCAA	AACCAACCCG	GTCAGCCCCT	CTCCGGCCCC
410	420	430	440	450
GGCCGGGGGG	CGGGCGCCGG	CGGCTTTGGT	GACTCTAGAT	AACCTCGGGC
460	470	480	490	500
CGATCGCACG	CCCCCGTGG	CGGCGACGAC	CCATTCGAAC	GTCTGCCCTA
510	520	530	540	550
TCAACTTTCG	ATGGTAGTCG	CCGTGCCTAC	CATGGTGACC	ACGGGTGACG
560	570	580	590	600
GGGAATCAGG	GTTTCGATTCC	GGAGAGGGAG	CCTGAGAAAC	GGCTACCACA
610	620	630	640	650
TCCAAGGAAG	GCAGCAGGCG	CGCAAATTAC	CCACTCCCGA	CCCGGGGAGG
660	670	680	690	700
TAGTGACGAA	AAATAACAAT	ACAGGACTCT	TTCGAGGCC	TGTAATTGGA
710	720	730	740	750
ATGAGTCCAC	TTTAAATCCT	TTAACGAGGA	TCCATTGGAG	GGCAAGTCTG
760	770	780	790	800
GTGCCAGCAG	CCGCGGTAAT	TCCAGCTCCA	ATAGCGTATA	TTAAAGTTGC

810	820	830	840	850
TGCAGTTAAA	AAGCTCGTAG	TTGGATCTTG	GGAGCGGGCG	GGCGGTCCGC
860	870	880	890	900
CGCGAGGCGA	GCCACCGCCC	GTCCCCGCC	CTTGCCTCTC	GGCGCCCCCT
910	920	930	940	950
CGATGCTCTT	AGCTGAGTGT	CCCGCGGGGC	CCGAAGCGTT	TACTTTGAAA
960	970	980	990	1000
AAATTAGAGT	GTTCAAAGCA	GGCCCCGAGCC	GCCTGGATAC	CGCAGCTAGG
1010	1020	1030	1040	1050
AATAATGGAA	TAGGACCGCG	GTTCTATTTT	GTTGGTTTTC	GGAAGTGGAG
1060	1070	1080	1090	1100
CCATGATTAA	GAGGGACGGC	CGGGGGCATT	CGTATTGCGC	CGCTAGAGGT
1110	1120	1130	1140	1150
GAAATTCCTT	GGACCGGCGC	AAGACGGACC	AGAGCGAAAG	CATTTGCCAA
1160	1170	1180	1190	1200
GAATGTTTTT	ATTAATCAAG	AACGAAAGTC	GGAGGTTCTGA	AGACGATCAG
1210	1220	1230	1240	1250
ATACCGTCGT	AGTTCCGACC	ATAAACGATG	CCGACCGGCG	ATGCGGGCGGC
1260	1270	1280	1290	1300
GTTATTCCCA	TGACCCGCCG	GGCAGCTTCC	GGGAAACCAA	AGTCTTTGGG
1310	1320	1330	1340	1350
TTCCGGGGGG	AGTATGGTTG	CAAAGCTGAA	ACTTAAAGGA	ATTGACGGAA
1360	1370	1380	1390	1400
GGGCACCACC	AGGAGTGGAG	CCTGCGGCTT	AATTTGACTC	AACACGGGAA
1410	1420	1430	1440	1450
ACCTCACCCG	GCCCCGACAC	GGACAGGATT	GACAGATTGA	TAGCTCTTTC
1460	1470	1480	1490	1500
TCGATTCCGT	GGGTGGTGGT	GCATGGCCGT	TCTTAGTTGG	TGGAGCGATT
1510	1520	1530	1540	1550
TGTCTGGTTA	ATTCCGATAA	CGAACGAGAC	TCTGGCATGC	TAAGTAGTTA
1560	1570	1580	1590	1600
CGCGACCCCC	GAGCGGTCCG	CGTCCCCCAA	CTTCTTAGAG	GGACAAGTGG
1610	1620	1630	1640	1650
CGTTCAGCCA	CCCGAGATTG	AGCAATAACA	GGTCTGTGAT	GCCCTTAGAT
1660	1670	1680	1690	1700
GTCCGGGGCT	GCACGCGCGC	TAACTGACT	GGCTCAGCGT	GTGCCTACCC
1710	1720	1730	1740	1750
TACGCCGGCA	GGCGCGGGTA	ACCCGTTGAA	CCCCATTCGT	GATGGGGATC
1760	1770	1780	1790	1800
GGGGATTGCA	ATTATTCCCC	ATGAACGAGG	AATTCCCAGT	AAGTGCGGGT

1810	1820	1830	1840	1850
CATAAGCTTG	CGTTGATTAA	GTCCTGCCC	TTGTACACA	CCGCCCGTCG
1860	1870	1880	1890	1900
CTACTACCGA	TTGGATGGTT	TAGTGAGGCC	CTCGGATCGG	CCCCGCCGGG
1910	1920	1930	1940	1950
GTCGGCCAC	GGCCCTGGCG	GAGCGCTGAG	AAGACGGTCG	AACTTGACTA
1960	1970	1980	1990	2000
TCTAGAGGAA	GTAAGTCG	TAACAAGGTT	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA
2010	2020	2030	2040	2050
AGGATCATT	ACGGAGCCCG	GACGGCGGCC	CGCGGCGGCG	CCGCGCCGCG
2060	2070	2080	2090	2100
CTTCCCTCCG	CACACCACC	CCCCACCGC	GACGGCGCGT	GCGGGCGGGG
2110	2120	2130	2140	2150
CCGTGCCCGT	TCGTTCGCTC	GCTCGTTCGT	TCGCCGCCCG	GCCCGGCCCG
2160	2170	2180	2190	2200
GAGAGCCGAG	AACTCGGGAG	GGAGACGGGG	GAGAGAGAGA	GAGAGAGAGA
2210	2220	2230		
GAGAGAGAGA	GAGAGAGAGA	GAAAGAAGGG	CGTGT	

6.3.2 Sequenz des hCx40

10	20	30	40	50
ATGGGCGATT	GGAGCTTCCT	GGGAAATTC	CTGGAGGAAG	TACACAAGCA
60	70	80	90	100
CTCGACCGTG	GTAGGCAAGG	TCTGGCTCAC	TGTCCTCTTC	ATATTCCGTA
110	120	130	140	150
TGCTCGTGCT	GGGCACAGCT	GCTGAGTCTA	CCTGGGGGGA	TGAGCAGGCT
160	170	180	190	200
GATTTCCGGT	GTGATACGAT	TCAGCCTGGC	TGCCACAATG	TCTGCTACGA
210	220	230	240	250
CCAGGCTTTC	CCCATCTCCC	ACATTCGCTA	CTGGGTGCTG	CAGATCATCT
260	270	280	290	300
TCGTCTCTAC	GCCCTCTCTG	GTGTACATGG	GCCACGCCAT	GCACACTGTG
310	320	330	340	350
CGCATGCAGG	AGAAGCGCAA	GCTACGGGAG	GCCGAGAGGG	CCAAAGAGGT
360	370	380	390	400
CCGGGGCTCT	GGCTCTTACG	AGTACCCGGT	GGCAGAGAAG	GCAGAACTGT
410	420	430	440	450
CCTGCTGGGA	GGAAGGGAAT	GGAAGGATTG	CCCTCCAGGG	CACTCTGCTC

460	470	480	490	500
AACACCTCTG	TGTGCAGCAT	CCTGATCCGC	ACCACCATGG	AGGTGGGSTT
510	520	530	540	550
CATTGTGGGC	CAGTACTTCA	TCTACGGAAT	CTTCCTGACC	ACCCTGCATG
560	570	580	590	600
TCTGCCGCAG	GAGTCCCTGT	CCCCACCCGG	TCAACTGTTA	CGTATCCCGG
610	620	630	640	650
CCCACAGAGA	AGAATGTCTT	CATTGTCTTT	ATGCTGGCTG	TGGCTGCACT
660	670	680	690	700
GTCCCTCCTC	CTTAGCCTGG	CTGAACTCTA	CCACCTGGGC	TGGAAGAAGA
710	720	730	740	750
TCAGACAGCG	ATTTGTCAAA	CCGCGGCAGT	ACATGGCTAA	GTGCCAGCTT
760	770	780	790	800
TCTGGCCCTC	TGTGGGCTAT	AGTCCAGAGC	TGCACACCAC	CCCCCGACTT
810	820	830	840	850
TAATCAGTGC	CTGGAGAATG	GTCCTGGGGG	AAAATTCTTC	AATCCCTTCA
860	870	880	890	900
GCAATAATAT	GGCCTCCCAA	CAAAACACAG	ACAACCTGGT	CACCGAGCAA
910	920	930	940	950
GTACGAGGTC	AGGAGCAGAC	TCCTGGGGAA	GGTTTCATCC	AGGTTTCGTTA
960	970	980	990	1000
TGGCCAGAAG	CCTGAGGTGC	CCAATGGAGT	CTCACCAGGT	CACCGCCTTC
1010	1020	1030	1040	1050
CCCATGGCTA	TCATAGTGAC	AAGCGACGTC	TTAGTAAGGC	CAGCAGCAAG
1060	1070			
GCAAGGTCAG	ATGACCTATC	AGTGTGA		

6.3.3 Sequenz des hCx43

10	20	30	40	50
ACAAAAAAGC	TTTTACGAGG	TATCAGCACT	TTTCTTTCAT	TAGGGGGAAG
60	70	80	90	100
GCGTGAGGAA	AGTACCAAAC	AGCAGCGGAG	TTTTAAACTT	TAAATAGACA
110	120	130	140	150
GGTCTGAGTG	CCTGAACTTG	CCTTTTCATT	TTACTTCATC	CTCCAAGGAG
160	170	180	190	200
TTCAATCACT	TGGCGTGACT	TCACTACTTT	TAAGCAAAAAG	AGTGGTGCCC
210	220	230	240	250
AGGCAACATG	GGTGACTGGA	GCGCCTTAGG	CAAACCTCCTT	GACAAGGTTT
260	270	280	290	300
AAGCCTACTC	AACTGCTGGA	GGGAAGGTGT	GGCTGTCAGT	ACTTTTCATT

310	320	330	340	350
TTCCGAATCC	TGCTGCTGGG	GACAGCGGTT	GAGTCAGCCT	GGGGAGATGA
360	370	380	390	400
GCAGTCTGCC	TTTCGTTGTA	ACACTCAGCA	ACCTGGTTGT	GAAAATGTCT
410	420	430	440	450
GCTATGACAA	GTCTTTCCCA	ATCTCTCATG	TGCGCTTCTG	GGTCCTGCAG
460	470	480	490	500
ATCATATTTG	TGTCTGTACC	CACACTCTTG	TACCTGGCTC	ATGTGTTCTA
510	520	530	540	550
TGTGATGCGA	AAGGAAGAGA	AACTGAACAA	GAAAGAGGAA	GAACTCAAGG
560	570	580	590	600
TTGCCCAAAC	TGATGGTGTC	AATGTGGACA	TGCACTTGAA	GCAGATTGAG
610	620	630	640	650
ATAAAGAAGT	TCAAGTACGG	TATTGAAGAG	CATGGTAAGG	TGAAAATGCG
660	670	680	690	700
AGGGGGGTTG	CTGCGAACCT	ACATCATCAG	TATCCTCTTC	AAGTCTATCT
710	720	730	740	750
TTGAGGTGGC	CTTCTTGCTG	ATCCAGTGGT	ACATCTATGG	ATTCAGCTTG
760	770	780	790	800
AGTGCTGTTT	ACACTTGCAA	AAGAGATCCC	TGCCCACATC	AGGTGGACTG
810	820	830	840	850
TTTCCTCTCT	CGCCCCACGG	AGAAAACCAT	CTTCATCATC	TTCATGCTGG
860	870	880	890	900
TGGTGTCCCT	GGTGTCCCTG	GCCTTGAATA	TCATTGAACT	CTTCTATGTT
910	920	930	940	950
TTCTTCAAGG	GCGTTAAGGA	TCGGGTTAAG	GGAAAGAGCG	ACCCTTACCA
960	970	980	990	1000
TGCGACCAGT	GGTGCGCTGA	GCCCTGCCAA	AGACTGTGGG	TCTCAAAAAT
1010	1020	1030	1040	1050
ATGCTTATTT	CAATGGCTGC	TCCTCACCAA	CCGCTCCCCT	CTCGCCTATG
1060	1070	1080	1090	1100
TCTCCTCCTG	GGTACAAGCT	GGTFACTGGC	GACAGAAACA	ATTCTTCTTG
1110	1120	1130	1140	1150
CCGCAATTAC	AACAAGCAAG	CAAGTGAGCA	AAACTGGGCT	AATTACAGTG
1160	1170	1180	1190	1200
CAGAACAAAA	TCGAATGGGG	CAGGCGGGAA	GCACCATCTC	TAACTCCCAT
1210	1220	1230	1240	1250
GCACAGCCTT	TTGATTTCCC	CGATGATAAC	CAGCCTTCTA	AAAAACTAGC
1260	1270	1280	1290	1300
TGCTGGACAT	GAATTACAGC	CACTAGCCAT	TGTGGACCAG	CGACCTTCAA

1310	1320	1330	1340	1350
GCAGAGCCAG	CAGTCGTGCC	AGCAGCAGAC	CTCGGCCTGA	TGACCTGGAG
1360	1370	1380	1390	1400
ATCTAGATAC	AGGCTTGAAA	GCATCAAGAT	TCCACTCAAT	TGTGGAGAAG
1410	1420	1430	1440	1450
AAAAAAGGTG	CTGTAGAAAAG	TGCACCAGGT	GTTAATTTTG	ATCCGGTGGA
1460	1470	1480	1490	1500
GGTGGTACTC	AACAGCCTTA	TTCATGAGGC	TTAGAAAACA	CAAAGACATT
1510	1520	1530	1540	1550
AGAATACCTA	GGTTCACTGG	GGGTGTATGG	GGTAGATGGG	TGGAGAGGGA
1560	1570	1580	1590	1600
GGGGATAAGA	GAGGTGCATG	TTGGTATTTA	AAGTAGTGGA	TTCAAAGAAC
1610	1620	1630	1640	1650
TTAGATTATA	AATAAGAGTT	CCATTAGGTG	ATACATAGAT	AAGGGCTTTT
1660	1670	1680	1690	1700
TCTCCCCGCA	AACACCCCTA	AGAATGGTTC	TGTGTATGTG	AATGAGCGGG
1710	1720	1730	1740	1750
TGGTAATTGT	GGCTAAATAT	TTTTGTTTTA	CCAAGAAACT	GAAATAATTC
1760	1770	1780	1790	1800
TGGCCAGGAA	TAAATACTTC	CTGAACATCT	TAGGTCTTTT	CAACAAGAAA
1810	1820	1830	1840	1850
AAGACAGAGG	ATTGTCCTTA	AGTCCCTGCT	AAAACATTCC	ATTGTTAAAA
1860	1870	1880	1890	1900
TTTGCACTTT	GAAGGTAAGC	TTTCTAGGCC	TGACCCTCCA	GGTGTCAATG
1910	1920	1930	1940	1950
GACTTGTGCT	ACTATATTTT	TTTATTCTTG	GTATCAGTTT	AAAATTCAGA
1960	1970	1980	1990	2000
CAAGGCCAC	AGAATAAGAT	TTTCCATGCA	TTTGCAAATA	CGTATATTCT
2010	2020	2030	2040	2050
TTTTCCATCC	ACTTGACAAA	TATCATTACC	ATCACTTTTT	CATCATTCT
2060	2070	2080	2090	2100
CAGCTACTAC	TCACATTCAT	TTAATGGTTT	CTGTAAACAT	TTTTAAGACA
2110	2120	2130	2140	2150
GTTGGGATGT	CACTTAACAT	TTTTTTTTTT	TGAGCTAAAG	TCAGGGAATC
2160	2170	2180	2190	2200
AAGCCATGCT	TAATATTTAA	CAATCACTTA	TATGTGTGTC	GAAGAGTTTG
2210	2220	2230	2240	2250
TTTTGTTTGT	CATGTATTGG	TACAAGCAGA	TACAGTATAA	ACTCACAAAC
2260	2270	2280	2290	2300
ACAGATTTGA	AAATAATGCA	CATATGGTGT	TCAAATTTGA	ACCTTTCTCA
2310	2320	2330	2340	2350
TGGATTTTTG	TGGTGTGGGC	CAATATGGTG	TTTACATTAT	ATAATTCCTG

2360	2370	2380	2390	2400
CTGTGGCAAG	TAAAGCACAC	TTTTTTTTTC	TCCTAAAATG	TTTTCCCTG
2410	2420	2430	2440	2450
TGTATCCTAT	TATGGATACT	GGTTTTGTTA	ATTATGATTC	TTTATTTTCT
2460	2470	2480	2490	2500
CTCCTTTTTT	TAGGATATAG	CAGTAATGCT	ATTACTGAAA	TGAATTTCT
2510	2520	2530	2540	2550
TTTTCTGAAA	TGTAATCATT	GATGCTTGAA	TGATAGAATT	TTAGTACTGT
2560	2570	2580	2590	2600
AAACAGGCTT	TAGTCATTAA	TGTGAGAGAC	TTAGAAAAAA	TGCTTAGAGT
2610	2620	2630	2640	2650
GGACTATTAA	ATGTGCCTAA	ATGAATTTTG	CAGTAACTGG	TATTCTTGGG
2660	2670	2680	2690	2700
TTTTCTACT	TAATACACAG	TAATTCAGAA	CTTGTATTCT	ATTATGAGTT
2710	2720	2730	2740	2750
TAGCAGTCTT	TTGGAGTGAC	CAGCAACTTT	GATGTTTGCA	CTAAGATTTT
2760	2770	2780	2790	2800
ATTTGGAATG	CAAGAGAGGT	TGAAAGAGGA	TTCAGTAGTA	CACATACAAC
2810	2820	2830	2840	2850
TAATTTATTT	GAACTATATG	TTGAAGACAT	CTACCAGTTT	CTCCAAATGC
2860	2870	2880	2890	2900
CTTTTTTAAA	ACTCATCACA	GAAGATTGGT	GAAAATGCTG	AGTATGACAC
2910	2920	2930	2940	2950
TTTTCTTCTT	GCATGCATGT	CAGCTACATA	AACAGTTTTG	TACAATGAAA
2960	2970	2980	2990	3000
ATTACTAATT	TGTTTGACAT	TCCATGTAA	ACTACGGTCA	TGTTTACGCTT
3010	3020	3030	3040	3050
CATTGCATGT	AATGTAGACC	TAGTCCATCA	GATCATGTGT	TCTGGAGAGT
3060	3070	3080		
GTTCTTTATT	CAATAAAGTT	TTAATTTAGT	ATAAACAT	

6.3.4 Sequenz des hGH

10	20	30	40	50
GTCGCCAGCC	GAGCCACATC	GCTCAGAACA	CCTATGGGGA	AGGTGAAGGT
60	70	80	90	100
CGGAGTCAAC	GGATTTGGTC	GTATTGGGCG	CCTGGTCACC	AGGGCTGCTT
110	120	130	140	150
TTAACTCTGG	TAAAGTGGAT	ATTGTTGCCA	TCAATGACCC	CTTCATTGAC
160	170	180	190	200
CTCAACTACA	TGGTTTACAT	GTTCCAATAT	GATTCCACCC	ATGGCAAATT

210	220	230	240	250
CCATGGCACC	GTCAAGGCTG	AGAACGGGAA	GCTTGTGATC	AATGGAAATC
260	270	280	290	300
CCATCACCAT	CTTCCAGGAG	CGAGATCCCT	CCAAAATCAA	GTGGGGCGAT
310	320	330	340	350
GCTGGCGCTG	AGTACGTCGT	GGAGTCCACT	GGCGTCTTCA	CCACCATGGA
360	370	380	390	400
GAAGGCTGGG	GCTCATTTGC	AGGGGGGAGC	CAAAAGGGTC	ATCATCTCTG
410	420	430	440	450
CCCCCTCTGC	TGATGCCCCC	ATGTTTCGTCA	TGGGTGTGAA	CCATGAGAAG
460	470	480	490	500
TATGACAACA	GCCTCAAGAT	CATCAGCAAT	GCCTCCTGCA	CCACCAACTG
510	520	530	540	550
CTTAGCACCC	CTGGCCAAGG	TCATCCATGA	CAACTTTGGT	ATCGTGGAAG
560	570	580	590	600
GACTCATGAC	CACAGTCCAT	GCCATCACTG	CCACCCAGAA	GACTGTGGAT
610	620	630	640	650
GGCCCCCTCCG	GGAAACTGTG	GCGTGATGGCC	GCGGGGCTC	TCCAGAACAT
660	670	680	690	700
CATCCCTGCC	TCTACTGGCG	CTGCCAAGGC	TGTGGGCAAG	GTCATCCCTG
710	720	730	740	750
AGCTGAACGG	GAAGCTCACT	GGCATGGCCT	TCCGTGTCCC	CACTGCCAAC
760	770	780	790	800
GTGTCAGTGG	TGGACCTGAC	CTGCCGTCTA	GAAAAACCTG	CCAAATATGA
810	820	830	840	850
TGACATCAAG	AAGGTGGTGA	AGCAGGCGTC	GGAGGGCCCC	CTCAAGGGCA
860	870	880	890	900
TCCTGGGCTA	CACTGAGCAC	CAGGTGGTCT	CCTCTGACTT	CAACAGCGAC
910	920	930	940	950
ACCCACTCCT	CCACCTTTGA	CGCTGGGGCT	GGCATTGCC	TCAACGACCA
960	970	980	990	1000
CTTTGTCAAG	CTCATTTCTT	GGTATGACAA	CGAATTTGGC	TACAGCAACA
1010	1020	1030	1040	1050
GGGTGGTGGGA	CCTCATGGCC	CACATGGCTT	CCAAGGAGTA	AGACCCCTGG
1060	1070	1080	1090	1100
ACCACCAGCC	CCAGCAAGAG	CACAAGAGGA	AGAGAGAGAC	CCTCACTGCT
1110	1120	1130	1140	1150
GGGGAGTCCC	TGCCCACTC	AGTCCCCCAC	CACACTGAAT	CTCCCCTCCT
1160	1170	1180	1190	1200
CACAGTTGCC	ATGTAGACCC	TTGAAGAGGG	GAGGGGCCTA	GGGCGCCGCA
1210	1220	1230		
CCTTGTCATG	TACCTCAATA	AAGTACCTGG	ACTTACC	

6.3.5 Sequenz des hANP

10	20	30	40	50
TGGCGAGGGA	CAGACGTAGG	CCAAGAGAGG	GGAACCAGAG	AGGAACCAGA
60	70	80	90	100
GGGGAGAGAC	AGAGCAGCAA	GCAGTGGATT	GCTCCTTGAC	GACGCCAGCA
110	120	130	140	150
TGAGCTCCTT	CTCCACCACC	ACCGTGAGCT	TCCTCCTTTT	ACTGGCATTG
160	170	180	190	200
CAGCTCCTAG	GTCAGACCAG	AGCTAATCCC	ATGTACAATG	CCGTGTCCAA
210	220	230	240	250
CGCAGACCTG	ATGGATTTTCA	AGAATTTGCT	GGACCATTTG	GAAGAAAAGA
260	270	280	290	300
TGCCTTTAGA	AGATGAGGTC	GTGCCCCAC	AAGTGCTCAG	TGAGCCGAAT
310	320	330	340	350
GAAGAAGCGG	GGGCTGCTCT	CAGCCCCCTC	CCTGAGGTGC	CTCCCTGGAC
360	370	380	390	400
CGGGGAAGTC	AGCCCAGCCC	AGAGAGATGG	AGGTGCCCTC	GGGCGGGGCC
410	420	430	440	450
CCTGGGACTC	CTCTGATCGA	TCTGCCCTCC	TAAAAAGCAA	GCTGAGGGCG
460	470	480	490	500
CTGCTCACTG	CCCCTCGGAG	CCTGCGGAGA	TCCAGCTGCT	TCGGGGGCAG
510	520	530	540	550
GATGGACAGG	ATTGGAGCCC	AGAGCGGACT	GGGCTGTAAC	AGCTTCCGGT
560	570	580	590	600
ACTGAAGATA	ACAGCCAGGG	AGGACAAGCA	GGGCTGGGCC	TAGGGACAGA
610	620	630	640	650
CTGCAAGAGG	CTCCTGTCCC	CTGGGGTCTC	TGCTGCATTT	GTGTCATCTT
660	670	680	690	700
GTTGCCATGG	AGTTGTGATC	ATCCCATCTA	AGCTGCAGCT	TCCTGTCAAC
710	720	730	740	750
ACTTCTCACA	TCTTATGCTA	ACTGTAGATA	AAGTGTTTGG	ATGGTGACTT
760	770	780	790	800
CCTCGCCTCT	CCCACCCCAT	GCATTAAATT	TTAAGGTAGA	ACCTCACCTG
810	820	830	840	
TTACTGAAAG	TGGTTTGAAA	GTGAATAAAC	TTCAGCACCA	TGGAC

6.3.6 Sequenz des hBNP

10	20	30	40	50
GGCAGGCTGA	GGGCAGGTGG	GAAGCAAACC	CGGACGCATC	GCAGCAGCAG
60	70	80	90	100
CAGCAGCAGC	AGAAGCAGCA	GCAGCAGCCT	CCGCAGTCCC	TCCAGAGACA

110	120	130	140	150
TGGATCCCCA	GACAGCACCT	TCCCGGGCGC	TCCTGCTCCT	GCTCTTCTTG
160	170	180	190	200
CATCTGGCTT	TCCTGGGAGG	TCGTTCCCAC	CCGCTGGGCA	GCCCCGGTTC
210	220	230	240	250
AGCCTCGGAC	TTGGAAACGT	CCGGGTTACA	GGAGCAGCGC	AACCATTTGC
260	270	280	290	300
AGGGCAAACCT	GTCGGAGCTG	CAGGTGGAGC	AGACATCCCT	GGAGCCCCTC
310	320	330	340	350
CAGGAGAGCC	CCCGTCCCAC	AGGTGTCTGG	AAGTCCCGGG	AGGTAGCCAC
360	370	380	390	400
CGAGGGCATC	CGTGGGCACC	GCAAAATGGT	CCTCTACACC	CTGCGGGCAC
410	420	430	440	450
CACGAAGCCC	CAAGATGGTG	CAAGGGTCTG	GCTGCTTTGG	GAGGAAGATG
460	470	480	490	500
GACCGGATCA	GCTCCTCCAG	TGGCCTGGGC	TGCAAAGTGC	TGAGGCGGCA
510	520	530	540	550
TTAAGAGGAA	GTCCTGGCTG	CAGACACCTG	CTTCTGATTC	CACAAGGGGC
560	570	580	590	600
TTTTTCCTCA	ACCCTGTGGC	CGCCTTTGAA	GTGACTCATT	TTTTTAATGT
610	620	630	640	650
ATTTATGTAT	TTATTTGATT	GTTTTATATA	AGATGGTTTC	TTACCTTTGA
660	670	680	690	
GCACAAAATT	TCCACGGTGA	AATAAAGTCA	ACATTATAAG	CT

6.4 Varianzanalysen

6.4.1 Varianzanalyse hCx40

6.4.1.1 Post-Hoc-Test ohne Unterteilung in Lokalisationen

Diagnose	Diagnose	Mittlere Differenz	Standardfehler	Signifikanz
DCM3	DCM4	-,4318	,3501	,221
	ICM	-,4779	,4319	,272
	Vitium	-,9301	,3828	,017
	Gesund	-,8602	,4842	,080
DCM4	DCM3	,4318	,3501	,221
	ICM	-,0461	,4380	,916
	Vitium	-,4984	,3897	,205
	Gesund	-,4284	,4897	,384
ICM	DCM3	,4779	,4319	,272
	DCM4	,0461	,4380	,916
	Vitium	-,4523	,4646	,333
	Gesund	-,3823	,5511	,490
Vitium	DCM3	,9301	,3828	,017
	DCM4	,4984	,3897	,205
	ICM	,4523	,4646	,333
	Gesund	,0699	,5136	,892
Gesund	DCM3	,8602	,4842	,080
	DCM4	,4284	,4897	,384
	ICM	,3823	,5511	,490
	Vitium	-,0699	,5136	,892

6.4.1.2 Post-Hoc-Test mit Unterteilung in Lokalisationen

Material aus	Diagnose	Diagnose	Mittlere Differenz	Standardfehler	Signifikanz
RA	DCM3	DCM4	-,1608	,7258	,829
		ICM	-1,3079	,8889	,169
		Vitium	-,7224	,7258	,341
		Gesund	-1,3243	,8889	,164
	DCM4	DCM3	,1608	,7258	,829
		ICM	-1,1471	,8889	,223

		Vitium	-,5615	,7258	,455
		Gesund	-1,1634	,8889	,217
	ICM	DCM3	1,3079	,8889	,169
		DCM4	1,1471	,8889	,223
		Vitium	,5856	,8889	,524
		Gesund	-,0164	1,0264	,988
	Vitium	DCM3	,7224	,7258	,341
		DCM4	,5615	,7258	,455
		ICM	-,5856	,8889	,524
		Gesund	-,6019	,8889	,512
	Gesund	DCM3	1,3243	,8889	,164
		DCM4	1,1634	,8889	,217
		ICM	,0164	1,0264	,988
		Vitium	,6019	,8889	,512
RV	DCM3	DCM4	-,2774	,4294	,527
		ICM	-,6996	,5014	,182
		Vitium	-1,0004	,4294	,033
		Gesund	-1,556	,5790	,016
	DCM4	DCM3	,2774	,4294	,527
		ICM	-,4221	,5179	,427
		Vitium	-,7229	,4485	,127
		Gesund	-1,2785	,5933	,047
	ICM	DCM3	,6996	,5014	,182
		DCM4	,4221	,5179	,427
		Vitium	-,3008	,5179	,569
		Gesund	-,8564	,6473	,204
	Vitium	DCM3	1,0004	,4294	,033
		DCM4	,7229	,4485	,127
		ICM	,3008	,5179	,569
		Gesund	-,5556	,5933	,363
	Gesund	DCM3	1,5560	,5790	,016
		DCM4	1,2785	,5933	,047
		ICM	,8564	,6473	,204
		Vitium	,5556	,5933	,363
LA	DCM3	DCM4	,1907	,4048	,647
		ICM	-,1198	,5226	,823
		Vitium	-,6290	,4609	,200
		Gesund	,3893	,5226	,472
	DCM4	DCM3	-,1907	,4048	,647
		ICM	-,3105	,5049	,551
		Vitium	-,8198	,4407	,090
		Gesund	,1986	,5049	,702
	ICM	DCM3	,1198	,5226	,823
		DCM4	,3105	,5049	,551
		Vitium	-,5093	,5509	,375
		Gesund	,5091	,6034	,417

LV	Vitium	DCM3	,6290	,4609	,200
		DCM4	,8198	,4407	,090
		ICM	,5093	,5509	,375
		Gesund	1,0183	,5509	,092
	Gesund	DCM3	-,3893	,5226	,472
		DCM4	-,1986	,5049	,702
		ICM	-,5091	,6034	,417
		Vitium	-1,0183	,5509	,092
	DCM3	DCM4	-,6467	,4717	,184
		ICM	,0678	,5883	,909
		Vitium	-,6293	,5883	,296
		Gesund	,2219	,7703	,776
	DCM4	DCM3	,6467	,4717	,184
		ICM	,7146	,6090	,253
		Vitium	,0174	,6090	,977
		Gesund	,8686	,7862	,281
	ICM	DCM3	-,0678	,5883	,909
		DCM4	-,7146	,6090	,253
		Vitium	-,6971	,7032	,332
		Gesund	,1541	,8613	,860
	Vitium	DCM3	,6293	,5883	,296
		DCM4	-,0174	,6090	,977
		ICM	,6971	,7032	,332
		Gesund	,8512	,8613	,333
	Gesund	DCM3	-,2219	,7703	,776
		DCM4	-,8686	,7862	,281
		ICM	-,1541	,8613	,860
		Vitium	-,8512	,8613	,333

6.4.2 Varianzanalyse hCx43

6.4.2.1 Post-Hoc-Test ohne Unterteilung in Lokalisationen

Diagnose	Diagnose	Mittlere Differenz	Standardfehler	Signifikanz
DCM3	DCM4	,1042	,11861	,383
	ICM	,0982	,1463	,504
	Vitium	-,2744	,1297	,038
	Gesund	,0632	,1641	,701
DCM4	DCM3	-,1042	,1186	,383
	ICM	-,0060	,1484	,968
	Vitium	-,3785	,1320	,005

ICM	Gesund	-,0410	,1659	,806
	DCM3	-,0982	,1463	,504
	DCM4	,0060	,1484	,968
	Vitium	-,3726	,1574	,020
Vitium	Gesund	-,0350	,1867	,852
	DCM3	,2744	,1297	,038
	DCM4	,3785	,1320	,005
	ICM	,3726	,1574	,020
Gesund	Gesund	,3376	,1740	,056
	DCM3	-,0632	,1641	,701
	DCM4	,0410	,1659	,806
	ICM	,0350	,1867	,852
	Vitium	-,3376	,1740	,056

6.4.2.2 Post-Hoc-Test mit Unterteilung in Lokalisationen

Material aus	Diagnose	Diagnose	Mittlere Differenz	Standardfehler	Signifikanz
RA	DCM3	DCM4	,5218	,3539	,168
		ICM	-,0393	,4334	,929
		Vitium	-,2995	,3539	,415
		Gesund	-,1285	,4334	,772
	DCM4	DCM3	-,5218	,3539	,168
		ICM	-,5611	,4334	,222
		Vitium	-,8213	,3539	,041
		Gesund	-,6502	,4334	,162
	ICM	DCM3	,0393	,4334	,929
		DCM4	,5611	,4334	,222
		Vitium	-,2602	,4334	,560
		Gesund	-,0892	,5005	,862
	Vitium	DCM3	,2995	,3539	,415
		DCM4	,8213	,3539	,041
		ICM	,2602	,4334	,560
		Gesund	,1710	,4334	,701
	Gesund	DCM3	,1285	,4334	,772
		DCM4	,6502	,4334	,162
		ICM	,0892	,5005	,862
		Vitium	-,1710	,4334	,701
RV	DCM3	DCM4	,0571	,2240	,802
		ICM	,0032	,2615	,990
		Vitium	-,2602	,2240	,262
		Gesund	,1804	,3020	,559

LA	DCM4	DCM3	-,0571	,2240	,802
		ICM	-,0539	,2701	,844
		Vitium	-,3173	,2339	,194
		Gesund	,1233	,3094	,696
	ICM	DCM3	-,0032	,2615	,990
		DCM4	,0539	,2701	,844
		Vitium	-,2634	,2701	,344
		Gesund	,1772	,3376	,607
	Vitium	DCM3	,2602	,2240	,262
		DCM4	,3173	,2339	,194
		ICM	,2634	,2701	,344
		Gesund	,4407	,3094	,174
	Gesund	DCM3	-,1804	,3020	,559
		DCM4	-,1233	,3094	,696
		ICM	-,1772	,3376	,607
		Vitium	-,4407	,3094	,174
	DCM3	DCM4	,0463	,1490	,762
		ICM	,3028	,1924	,144
		Vitium	-,6114	,1696	,004
		Gesund	,0374	,1924	,849
	DCM4	DCM3	-,0463	,1490	,762
		ICM	,2565	,1858	,195
		Vitium	-,6577	,1622	,002
		Gesund	-,0089	,1858	,963
	ICM	DCM3	-,3028	,1924	,144
		DCM4	-,2565	,1858	,195
		Vitium	-,9142	,2028	,001
		Gesund	-,2654	,2221	,257
	Vitium	DCM3	,6114	,1696	,004
		DCM4	,6577	,1622	,002
		ICM	,9142	,2028	,001
		Gesund	,6488	,2028	,008
	Gesund	DCM3	-,0374	,1924	,849
		DCM4	,0089	,1858	,963
		ICM	,2654	,2221	,257
		Vitium	-,6488	,2028	,008
LV	DCM3	DCM4	-,0105	,1871	,956
		ICM	,1507	,2334	,525
		Vitium	,0198	,2334	,933
		Gesund	,2247	,3056	,470
DCM4	DCM3	,0105	,1871	,956	
	ICM	,1612	,2416	,511	
	Vitium	,0303	,2416	,901	
	Gesund	,2352	,3119	,458	
ICM	DCM3	-,1507	,2334	,525	
	DCM4	-,1612	,2416	,511	

	Vitium	-,1309	,2790	,643
	Gesund	,0740	,3416	,830
Vitium	DCM3	-,0198	,2334	,933
	DCM4	-,0303	,2416	,901
	ICM	,1309	,2790	,643
	Gesund	,2049	,3416	,555
Gesund	DCM3	-,2247	,3056	,470
	DCM4	-,2352	,3119	,458
	ICM	-,0740	,3416	,830
	Vitium	-,2049	,3416	,555

6.4.3 Varianzanalyse hANP

6.4.3.1 Post-Hoc-Test ohne Unterteilung in Lokalisationen

Diagnose	Diagnose	Mittlere Differenz	Standardfehler	Signifikanz
DCM3	DCM4	-,9402	5,3947	,862
	ICM	-2,4522	6,6548	,714
	Vitium	4,1720	5,8988	,482
	Gesund	-1,7451	7,4615	,816
DCM4	DCM3	,9402	5,3947	,862
	ICM	-1,5121	6,7492	,823
	Vitium	5,1122	6,0051	,397
	Gesund	-,8050	7,5458	,915
ICM	DCM3	2,4522	6,6548	,714
	DCM4	1,5121	6,7492	,823
	Vitium	6,6243	7,1586	,358
	Gesund	,7071	8,4925	,934
Vitium	DCM3	-4,1720	5,8988	,482
	DCM4	-5,1122	6,0051	,397
	ICM	-6,6243	7,1586	,358
	Gesund	-5,9172	7,9141	,457
Gesund	DCM3	1,7451	7,4615	,816
	DCM4	,8050	7,5458	,915
	ICM	-,7071	8,4925	,934
	Vitium	5,9172	7,9141	,457

6.4.3.2 Post-Hoc-Test mit Unterteilung in Lokalisationen

Material aus	Diagnose	Diagnose	Mittlere Differenz	Standardfehler	Signifikanz
RA	DCM3	DCM4	11,3914	8,9683	,230
		ICM	-3,9388	10,9839	,727
		Vitium	9,5713	8,9683	,309
		Gesund	7,9170	10,9839	,486
	DCM4	DCM3	-11,3914	8,9683	,230
		ICM	-15,3302	10,9839	,190
		Vitium	-1,8201	8,9683	,843
		Gesund	-3,4744	10,9839	,758
	ICM	DCM3	3,9388	10,9839	,727
		DCM4	15,3302	10,9839	,190
		Vitium	13,5101	10,9839	,244
		Gesund	11,8558	12,6831	,370
	Vitium	DCM3	-9,5713	8,9683	,309
		DCM4	1,8201	8,9683	,843
		ICM	-13,5101	10,9839	,244
		Gesund	-1,6543	10,9839	,883
	Gesund	DCM3	-7,9170	10,9839	,486
		DCM4	3,4744	10,9839	,758
		ICM	-11,8558	12,6831	,370
		Vitium	1,6543	10,9839	,883
RV	DCM3	DCM4	-,9514	6,1368	,879
		ICM	,9006	7,1662	,902
		Vitium	8,3791	6,1368	,191
		Gesund	,4374	8,2748	,959
	DCM4	DCM3	,9514	6,1368	,879
		ICM	1,8520	7,4012	,806
		Vitium	9,3305	6,4096	,165
		Gesund	1,3888	8,4792	,872
	ICM	DCM3	-,9006	7,1662	,902
		DCM4	-1,8520	7,4012	,806
		Vitium	7,4785	7,4012	,327
		Gesund	-,4632	9,2515	,961
	Vitium	DCM3	-8,3791	6,1368	,191
		DCM4	-9,3305	6,4096	,165
		ICM	-7,4785	7,4012	,327
		Gesund	-7,9417	8,4792	,363
	Gesund	DCM3	-,4374	8,2748	,959
		DCM4	-1,3888	8,4792	,872
		ICM	,4632	9,2515	,961
		Vitium	7,9417	8,4792	,363

LA	DCM3	DCM4	2,4268	4,6270	,610
		ICM	-2,5188	5,9734	,681
		Vitium	1,2958	5,2681	,810
		Gesund	2,3541	5,9734	,701
	DCM4	DCM3	-2,4268	4,6270	,610
		ICM	-4,9456	5,7709	,410
		Vitium	-1,1309	5,0372	,826
		Gesund	-,0727	5,7709	,990
	ICM	DCM3	2,519	5,9734	,681
		DCM4	4,9456	5,7709	,410
		Vitium	3,8147	6,2965	,557
		Gesund	4,8729	6,8975	,495
	Vitium	DCM3	-1,2958	5,2681	,810
		DCM4	1,1309	5,0372	,826
		ICM	-3,8147	6,2965	,557
		Gesund	1,0582	6,2965	,870
	Gesund	DCM3	-2,3541	5,9734	,701
		DCM4	,0727	5,7709	,990
		ICM	-4,8729	6,8975	,495
		Vitium	-1,0582	6,2965	,870
LV	DCM3	DCM4	-2,4397	4,6394	,604
		ICM	-1,5210	5,7863	,795
		Vitium	9,1725	5,7863	,127
		Gesund	4,0010	7,5761	,602
	DCM4	DCM3	2,4397	4,6394	,604
		ICM	,9187	5,9894	,879
		Vitium	11,6122	5,9894	,065
		Gesund	6,4407	7,7323	,413
	ICM	DCM3	1,5210	5,7863	,795
		DCM4	-,9187	5,9894	,879
		Vitium	10,6935	6,9160	,136
		Gesund	5,5220	8,4703	,521
	Vitium	DCM3	-9,1725	5,7863	,127
		DCM4	-11,6122	5,9894	,065
		ICM	-10,6935	6,9160	,136
		Gesund	-5,1715	8,4703	,547
	Gesund	DCM3	-4,0010	7,5761	,602
		DCM4	-6,4407	7,7323	,413
		ICM	-5,5220	8,4703	,521
		Vitium	5,1715	8,4703	,547

6.4.4 Varianzanalyse hBNP

6.4.4.1 Post-Hoc-Test ohne Unterteilung in Lokalisationen

Diagnose	Diagnose	Mittlere Differenz	Standardfehler	Signifikanz
DCM3	DCM4	-,0622	1,6200	,969
	ICM	1,6294	1,9861	,415
	Vitium	3,2305	1,7605	,070
	Gesund	4,1363	2,2268	,067
DCM4	DCM3	,0622	1,6100	,969
	ICM	1,6916	2,0142	,404
	Vitium	3,2927	1,7922	,070
	Gesund	4,1985	2,2520	,066
ICM	DCM3	-1,6294	1,9861	,415
	DCM4	-1,6916	2,0142	,404
	Vitium	1,6011	2,1364	,456
	Gesund	2,5070	2,5345	,326
Vitium	DCM3	-3,2305	1,7605	,070
	DCM4	-3,2927	1,7922	,070
	ICM	-1,6011	2,1364	,456
	Gesund	,9058	2,3619	,702
Gesund	DCM3	-4,1363	2,2268	,067
	DCM4	-4,1985	2,2520	,066
	ICM	-2,5069	2,5345	,326
	Vitium	-,9058	2,3619	,702

6.4.4.2 Post-Hoc-Test mit Unterteilung in Lokalisationen

Material aus	Diagnose	Diagnose	Mittlere Differenz	Standardfehler	Signifikanz
RA	DCM3	DCM4	5,1664	4,2130	,246
		ICM	6,5235	5,1599	,232
		Vitium	6,2069	4,2130	,169
		Gesund	9,0434	5,1599	,107
	DCM4	DCM3	-5,1664	4,2130	,246
		ICM	1,3571	5,1599	,797
		Vitium	1,0405	4,2130	,809
		Gesund	3,8770	5,1599	,468
	ICM	DCM3	-6,5235	5,1599	,232

		DCM4	-1,3571	5,1599	,797
		Vitium	-,3166	5,1599	,952
		Gesund	2,5200	5,9581	,680
	Vitium	DCM3	-6,2069	4,2130	,169
		DCM4	-1,0405	4,2130	,809
		ICM	,3166	5,1599	,952
		Gesund	2,8366	5,1599	,593
	Gesund	DCM3	-9,0434	5,1599	,107
		DCM4	-3,8770	5,1599	,468
		ICM	-2,5200	5,9581	,680
		Vitium	-2,8366	5,1599	,593
RV	DCM3	DCM4	-3,9706	2,8562	,184
		ICM	,2479	3,3354	,942
		Vitium	2,5991	2,8562	,376
		Gesund	2,2082	3,8514	,574
	DCM4	DCM3	3,9706	2,8562	,184
		ICM	4,2186	3,4448	,238
		Vitium	6,5697	2,9832	,043
		Gesund	6,1789	3,9465	,137
	ICM	DCM3	-,2479	3,3354	,942
		DCM4	-4,2186	3,4448	,238
		Vitium	2,3511	3,4448	,505
		Gesund	1,9603	4,3059	,655
	Vitium	DCM3	-2,5991	2,8562	,376
		DCM4	-6,5697	2,9832	,043
		ICM	-2,3511	3,4448	,505
		Gesund	-,3908	3,9465	,922
	Gesund	DCM3	-2,2082	3,8514	,574
		DCM4	-6,1789	3,9465	,137
		ICM	-1,9603	4,3059	,655
		Vitium	,3908	3,9465	,922
LA	DCM3	DCM4	3,3923	3,3088	,327
		ICM	4,3412	4,2717	,331
		Vitium	4,0671	3,7673	,303
		Gesund	10,3264	4,2717	,034
	DCM4	DCM3	-3,3923	3,3088	,327
		ICM	,9488	4,1268	,822
		Vitium	,6748	3,6022	,855
		Gesund	6,9341	4,1268	,121
	ICM	DCM3	-4,3412	4,2717	,331
		DCM4	-,9488	4,1268	,822
		Vitium	-,2741	4,5027	,953
		Gesund	5,9852	4,9325	,250
	Vitium	DCM3	-4,0671	3,7673	,303
		DCM4	-,6748	3,6022	,855
		ICM	,2741	4,5027	,953

		Gesund	6,2593	4,5027	,192
	Gesund	DCM3	-10,3264	4,2717	,034
		DCM4	-6,9341	4,1268	,121
		ICM	-5,9852	4,9325	,250
		Vitium	-6,2593	4,5027	,192
LV	DCM3	DCM4	-,5355	2,1361	,804
		ICM	-,4622	2,6642	,864
		Vitium	3,9053	2,6642	,156
		Gesund	,8206	3,4883	,816
	DCM4	DCM3	,5355	2,1361	,804
		ICM	,0733	2,7577	,979
		Vitium	4,4408	2,7577	,121
		Gesund	1,3561	3,5602	,707
	ICM	DCM3	,4622	2,6642	,864
		DCM4	-,0733	2,7577	,979
		Vitium	4,3675	3,1844	,183
		Gesund	1,2828	3,9000	,745
	Vitium	DCM3	-3,9053	2,6642	,156
		DCM4	-4,4408	2,7577	,121
		ICM	-4,3675	3,1844	,183
		Gesund	-3,0847	3,9000	,437
	Gesund	DCM3	-,8206	3,4883	,816
		DCM4	-1,3561	3,5602	,707
		ICM	-1,2828	3,9000	,745
		Vitium	3,0847	3,9000	,437

6.5 Probenliste

siehe Beiblatt

7 Literaturverzeichnis

1. Alcoléa S, Théveniau-Ruissy M, Jarry-Guichard T, Marics I, Tzouanacou E, Chauvin JP, Briand JP, Moorman AFM, Lamers WH, Gros DB
Downregulation of Connexin 45 gene products during mouse heart development
Circulation Research 84(12) (1999): pp. 1365-1379
2. Angst BD, Khan LUR, Severs NJ, Whitely K, Rothery S, Thompson RP, Magee AI, Gourdie RG
Dissociated spatial patterning of gap junctions and cell adhesion junctions during postnatal differentiation of ventricular myocardium
Circulation Research 80 (1997): pp. 80-88
3. Ationu A, Carter ND
Brain and atrial natriuretic peptide plasma concentrations in normal healthy children
British Journal of Biomedical Science 50(2) (1993): pp. 92-95
4. Barker RJ, Gourdie RG
Why do mammalian hearts invest in connexin 43?
Circulation Research 91 (2002): pp. 556-560
5. Bastide B, Neyses L, Ganten D, Paul M, Willecke K, Traub O
Gap junction protein connexin40 is preferentially expressed in vascular endothelium and conductive bundles of rat myocardium and is increased under hypertensive conditions
Circulation Research 73 (1993): pp. 1138-1149
6. Bates ER, Shenker Y, Grekin RJ
The relationship between plasma levels of immunoreactive atrial natriuretic hormone and hemodynamic function in man
Circulation 73(6) (1986): pp. 1155-1161

7. Bauer P, Rolfs A, Regitz-Zagrosek V, Hildebrandt A, Fleck E
Use of manganese in RT-PCR eliminates PCR artifacts resulting from DNase I digestion
BioTechniques 22 (1997): pp. 1128-1132
8. Beblo DA, Wang HZ, Beyer EC, Westphale EM, Veenstra RD
Unique conductance, gating, and selective permeability properties of gap junction channels formed by connexin 40
Circulation Research 77(4) (1995): pp. 813-822
9. Becker DL, Cook JE, Davies CS, Evans WH, Gourdie RG
Expression of major gap junction connexin types in the working myocardium of eight chordates
Cell Biology International 22(7-8) (1998): pp. 527-543
10. Britz-Cunningham SH, Shah MM, Zuppan CW, Fletcher WH
Mutations of the connexin 43 gap-junction gene in patients with heart malformations and defects of laterality
New England Journal of Medicine 332(20) (1995): pp. 1323-1329
11. Brockhoff C, Warnholtz A, Münzel T
Die natriuretischen Peptide: Diagnostische und therapeutische Bedeutung
Therapeutische Umschau 57(5) (2000): pp. 305-312
12. Bruzzone R, White TW, Paul DL
Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling
European Journal of Biochemistry 238 (1996): pp. 1-27
13. Bruzzone R, White TW, Goodenough DA
The cellular internet: on-line with connexins
BioEssays 18(9) (1996): pp. 709-718

14. Bukauskas FF, Elfgang C, Willecke K, Weingart R
Biophysical properties of gap junction channels formed by mouse connexin 40
in induced pairs of transfected human HeLa cells
Biophysical Journal 68(6) (1995): pp. 2289-2298
15. Burnett JC, Kao PC, Hu DC, Hesser DW, Heublein D, Granger JP, Opgenorth
TJ, Reeder GS
Atrial natriuretic peptide elevation in congestive heart failure in the human
Science (231) (1986): pp. 1145-1147
16. Chen SC, Davis LM, Westphale EM, Beyer EC, Saffitz JE
Expression of multiple gap junction proteins in human fetal and infant hearts
Pediatric Research 36(5) (1994): pp. 561-566
17. Chien A, Edgar DB, Trela JM
Desoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus
aquaticus*
Journal of Bacteriology 127 (1976): pp. 1550-1557
18. Chomczynski P, Sacchi N
Single-step method of RNA-isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-
chloroform extraction
Analytical Biochemistry 162 (1987): pp. 156-159
19. Colucci WS
Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure
American Journal of Cardiology 80(11/1) (1997): pp. 15L-25L
20. Coopen SR, Kodama I, Boyett MR, Dobrzynski H, Takagishi Y, Honjo H, Yeh
HI, Severs NJ
Connexin 45, a major connexin of the rabbit sinoatrial node, is co-expressed
with connexin 43 in a restricted zone at the nodal-crista terminalis border
Journal of Histochemistry and Cytochemistry 47(7) (1999): pp. 907-918

21. Copen SR, Dupont E, Rothery S, Severs NJ
Connexin 45 expression is preferentially associated with the ventricular conduction system in mouse and rat heart
Circulation Research 82(2) (1998): pp. 232-243
22. Cottrell GT, Burt JM
Heterotypic gap junction channel formation between heteromeric and homomeric Cx 40 and Cx 43 connexons
American Journal of Physiology and Cell Physiology 281 (2001): pp. C1559-C1567
23. Cottrell GT, Wu Y, Burt JM
Cx 40 and Cx 43 expression ratio influences heteromeric/ heterotypic gap junction channel properties
American Journal of Physiology and Cell Physiology 282 (2002): C1469-C1482
24. Davis LM, Kanter HL, Beyer EC, Saffitz JE
Distinct gap junction protein phenotypes in cardiac tissue with disparate conduction properties
Journal of the American College of Cardiology 24(4) (1994): pp. 1124-1132
25. Davis LM, Rodefeld ME, Green K, Beyer EC, Saffitz JE
Gap junction protein phenotypes of the human heart and conduction system
Journal of Cardiovascular Electrophysiology 6 (1995): pp. 813-822
26. de Boer RA, Henning RH, Suurmeijer AJ, Pinto YM, Olthof E, Kirkels JH, van Gilst WH, Crijns HJ, van Veldhuisen DJ
Early expression of natriuretic peptides and SERCA in mild heart failure. Association with severity of the Disease
International Journal of Cardiology 78(1) (2001): pp. 5-12
27. de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H
A rapide and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extracts in rats
Life Sciences 28 (1981): pp. 89-94

28. de Bold AJ, Bruneau BG, de Bold MLK
Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart
Cardiovascular Research 31 (1996): pp. 7-18
29. de Bold AJ, Ma KKY, Zhang Y, de Bold MLK, Bensimon M, Khoshbaten A
The physiological and pathophysiological modulation of the endocrine function of the heart
Canadian Journal of Physiological Pharmacology 79 (2001): pp. 705-714
30. Delorme B, Dahl E, Jarry-Guichard T, Braind JP, Willecke K, Gros D, Théveniau-Ruissy M
Expression pattern of connexin gene products at the early developmental stages of the mouse cardiovascular system
Circulation Research 81(3) (1997): pp. 423-437
31. Delorme B, Dahl E, Jarry-Guichard T, Marcis I, Briand JP, Willecke K, Gros D, Théveniau-Ruissy M
Developmental regulation of connexin 40 gene expression in mouse heart correlates with differentiation of the conduct system
Developmental Dynamics 204(4) (1995): pp. 358-371
32. Del Sal G, Manfioletti G, Schneider C
The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing
BioTechniques 7(5) (1989): pp. 514-520
33. Di Nardo P, Pafi M, Bartoli M, Minieri M, Bellegrandi F, Raimondo G, Peruzzi G, Tallarida G
Effects of alpha-human atrial natriuretic peptide in guinea-pig isolated heart
International Journal of Cardiology 40(3) (1993): pp. 211-220
34. Donaldson P, Eckert R, Green C, Kistler J
Gap junction channels: new role in disease
Histology and Histopathology 12 (1997): pp. 219-231

35. Doyama K, Fukumoto M, Takemura G, Tanaka M, Oda T, Hasegawa K, Inada T, Ohtani S, Fuijwara T, Itoh H, Nakao K, Sasayama S, Fuijwara H
Expression and distribution of brain natriuratic peptide in human right atria
Journal of the American College of Cardiology 32(7) (1998): pp. 1832-1838
36. Dupont E, Matsushita T, Kaba RA, Vozzi C, Coppens SR, Khan N, Kaprielian R, Yacoub MH, Severs NJ
Altered connexin expression in human congestive heart failure
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 33(2) (2001): pp. 359-371
37. Durocher D, Grépin C, Nemer M
Regulation of gene expression in the endocrine heart
Recent Progress in Hormone Research 53 (1998): pp. 7-23
38. Fernandez-Cobo M, Gingalewski C, Drujan D, De Maio A
Downregulation of connexin 43 gene expression in rat heart during inflammation. The role of tumor necrosis factor
Cytokine 11(3) (1999): pp. 216-224
39. Ferre F
Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth
PCR Methods 2(1) 1992: pp. 1-9
40. Fishman GI, Spay DC, Leinwand LA
Molecular characterisation and functional expression of the human cardiac gap junction channels
Journal of Cell Biology 111 (1990): pp. 589-598
41. Florkowski CM, Richards AM, Epsiner EA, Yandle TG, Frampton C
Renal, endocrine, and hemodynamic interactions of the atrial and brain natriuretic peptides in normal men
American Journal of Physiology 266(R) (1994): pp. 1244-1250

42. Gebbia M, Towbin JA, Casey B
Heart disease in the young: Failure to detect connexin 43 mutations in 38 cases of sporadic and familial heterotaxy
Circulation 94(8) (1996): pp. 1909-1912
43. Goodenough DA, Golinger JA, Paul DL
Connexins, connexons, and intercellular communication
Annual Review of Biochemistry 65 (1996): pp. 475-502
44. Gourdie RG, Green CR, Severs NJ, Thompson RP
Immunolabelling patterns of gap junction connexins in the developing and mature rat heart
Anatomy and Embryology 185(4) (1992): pp. 363-378
45. Gourdie RG, Severs NJ, Green CR, Rothery S, Germroth P, Thompson RP
The spatial distribution and relative abundance of gap-junctional connexin 40 and connexin 43 correlate of functional properties of components of the cardiac atrioventricular conduction system
Journal of Cell Science 105 (1993): pp. 985-991
46. Gros D, Jarry-Guichard T, Ten Velde I, de Maziere A, van Kempen MJA, Davoust J, Briand JP, Moorman AFM, Jongsma HJ
Restricted distribution of connexin 40, a gap junctional protein, in mammalian heart
Circulation Research 74(5) (1994): pp. 839-851
47. Gros D, Jongsma HJ
Connexins in mammalian function
BioEssays 18 (1996): pp. 719-730
48. Green CR, Severs NJ
Distribution and role of gap junctions in normal myocardium and human ischaemic heart disease
Histochemistry 99 (1993): 105-120

49. Gutstein DE, Morley GE, Tamaddon H, Vaidya D, Schneider MD, Chen J, Chien KR, Stuhlmann H, Fishman GI
Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin 43
Circulation Research 88(3) (2001): pp. 333-339
50. Holmström H, Thaulow E, Stokke O, Lindberg H, Hall C, Severs NJ
Serum N-terminal proatrial natriuretic factor in children with congenital heart disease
European Heart Journal 17 (1996): pp. 1737-46
51. Hopkins WE, Hall C
Paradoxical relationship between N-terminal proatrial natriuretic peptide and filling pressure in adults with cyanotic congenital heart disease
Circulation 96(7) (1997): pp. 2215-2220
52. Hosoda K, Nakao K, Mukoyama M, Saito Y, Jougasaki M, Shirakami G, Suga S, Ogawa Y, Yasue H, Imura H
Expression of brain natriuretic peptide gene in human heart. Production in the ventricle
Hypertension 17(6) (1991): pp. 1152-1156
53. Hwang JJ, Allen PD, Tseng GC, Lam CW, Fananapazir L, Dzau VJ, Liew CC
Microarray gene expression profiles in dilated and hypertrophic cardiomyopathic end-stage heart failure
Physiological Genomics 10 (2002): pp. 31-44
54. Hystad ME, Geiran OR, Attramadal H, Spurkland A, Vege A, Simonsen S, Hall C
Regional cardiac expression and concentration of natriuretic peptides in patients with severe chronic heart failure
Acta Physiologica Scandinavica 171 (2001): pp. 395-403

55. Iervasi G, Clerico A, Berti S, Pilo A, Biagini A, Bianchi R, Donato L
Altered tissue degradation and distribution of atrial natriuretic peptide in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy and its relationship with clinical severity of the disease and sodium handling
Circulation 91 (1995): pp. 2018-2027
56. Kangawa K, Matsuo H
Purification and complete amino acid sequence of alpha-human atrial natriuretic polypeptide
Biochemical and Biophysical Research Communications 118 (1984): pp. 131-139
57. Kanter HL, Saffitz JE, Beyer EC
Molecular cloning of two human cardiac gap junction proteins, connexin 40 and connexin 45
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 26(7) (1994): pp. 861-868
58. Kaprielian RR, Gunning M, Dupont E, Sheppard MN, Rothery SM, Underwood R, Pennel DJ, Fox K, Pepper J, Poole-Wilson PA, Severs NJ
Downregulation of immunodetectable connexin 43 and decreased gap junction size in the pathogenesis of chronic hibernation in the human left ventricle
Circulation 97(7) (1998): pp. 651-660
59. Kirchhoff S, Kim JS, Hagendorff A, Thönnissen E, Krüger O, Lamers WH, Willecke K
Abnormal cardiac conduction and morphogenesis in connexin 40 and connexin 43 double-deficient mice
Circulation Research 87 (2000): pp. 399-419
60. Koller KJ, Goeddel DV
Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptors
Circulation 86(4) (1992): pp. 1081-1087

61. Kumar NM, Gilula NB
The gap junction communication channel
Cell 84(3) (1996): pp. 381-388
62. Langenickel T, Pagel I, Höhnel K, Dietz R, Willenbrock R
Differential regulation of cardiac ANP and BNP mRNA in different stages of experimental heart failure
American Journal of Heart and Circulatory Physiology 278(5) (2000): pp. H1500-H1506
63. Lerner DL, Chapman Q, Green KG, Saffitz JE
Reversible down-regulation of connexin 43 expression in acute cardiac allograft rejection
Journal of Heart and Lung Transplantation 20(1) (2001): pp. 93-97
64. Lerner DL, Yamada KA, Schuessler RB, Saffitz JE
Accelerated onset and increased incidence of ventricular arrhythmias induced by ischemia in Cx 43-deficient mice
Circulation 101(5) (2000): pp. 547-552
65. Levin ER, Gardner DG, Samson WK
Natriuretic peptides
New England Journal of Medicine 339(5) (1998): pp. 321-328
66. Luque EA, Veenstra RD, Beyer EC, Lemanski LF
Localisation and distribution of gap junctions in normal and cardiomyopathic hamster heart
Journal of Morphology 222 (1994): pp. 203-213
67. Maeda K, Tsutamoto T, Wada A, Mabuchi N, Hayashi M, Hisanaga T, Kamijo T, Kinoshita M
Insufficient secretion of atrial natriuretic peptide at acute phase of myocardial infarction
Journal of Applied Physiology 89(2) (2000): pp. 458-464

68. Mair J, Hammerer-Lercher A, Puschendorf B
The impact of cardiac natriuretic peptide determination on the diagnosis and management of heart failure
Clin Chem Lab Med 39(7) (2001): pp. 571-588
69. Matsuoka S, Kurahashi Y, Miki Y, Miyao M, Yamazaki Y, Nishiuchi T, Saito S
Plasma atrial natriuretic peptide in patients with congenital heart diseases
Pediatrics 82(4) (1988): pp. 639-643
70. Maytin M, Colucci WS
Molecular and cellular mechanisms of myocardial remodeling
Journal of Nuclear Cardiology 9(3) (2002): pp. 319-327
71. Mir TS, Marohn S, Laer S, Eiselt M, Grollmus OG, Weil J
Plasma concentrations of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in control children from the neonatal to adolescent period and in children with congestive heart failure
Pediatrics 110(6) (2002): e76
72. Moe GW, Grima EA, Wong NL, Howard RJ, Armstrong PW
Plasma and cardiac tissue atrial and brain natriuretic peptides in experimental heart failure
Journal of the American College of Cardiology 27 (1996): pp. 720-727
73. Montgomery MO, Jiao Y, Phillips SJ, Singh G, Xu J, Balsara R, Litvin J
Alterations in sheep fetal right ventricular tissue with induced hemodynamic pressure overload
Basic Research in Cardiology 93(3) (1998): pp. 192-200
74. Müller H, Ziegler B, Schweizer B
UV/VIS-Spektroskopie in der Nukleinsäureanalytik
BioTec, Life Science 4 (1993)

75. Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, Shirakami G, Jougasaki M, Obata K, Yasue H, et al.
Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans.
Clin Invest 87 (1991): 1402-1412.
76. Mullis KB, Faloona FA
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction
Meth Enzymol 255 (1987): pp. 335-350
77. Nagaya N, Nishikimi T, Okanao Y, Uematsu M, Satoh T, Kyotani S, Kuribayashi S, Hamada S, Kakishita M, Nakanishi N, Takamiya M, Kunieda T, Matsuo H, Kangawa K
Plasma brain natriuretic peptide levels increase in proportion to the extent of right ventricular dysfunction in pulmonary hypertension
Journal of the American College of Cardiology 31(18)(1998): pp. 202-208
78. Ogawa Y, Itoh H, Nakao K
Molecular biology and biochemistry of natriuretic peptide family
Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 22(1) (1995): pp 49-53
79. Ogawa T, Vatta M, Bruneau BG, de Bold AJ
Characterization of natriuretic peptide production by adult heart atria
American Journal of Physiology 276 (1999): pp. H1977-H1986
80. Oosthoek PW, Viragh S, Mayen AE, van Kempen MJ, Lamers WH, Moorman AF
Immunohistochemical delineation of the conduction system
I: The atrioventricular node and Purkinje fibers
Circulation Research 73(3) (1993): pp. 482-491
81. Penman Splitt M, Tsai MY, Burn J, Goodship JA
Absence of mutations in the regulatory domain of the gap junction protein connexin 43 in patients with viscerotaxial heterotaxy
Heart 77 (1997): pp. 369-370

82. Peters NS
Gap junction and clinical cardiology: from molecular biology to molecular medicine
European Heart Journal 18 (1997): pp. 1697-1702
83. Peters NS, Green CR, Poole-Wilson PA, Severs NJ
Reduced content of connexin 43 gap junctions in ventricular myocardium from hypertrophied and ischemic human heart
Circulation 88(3) (1993): pp. 864-875
84. Peters NS, Severs NJ, Rothery S, Lincoln C, Yacoub MH, Green CR
Spatiotemporal relation between gap junctions and fascia adherens junctions during postnatal development of human ventricular myocardium
Circulation 90(2) (1994): pp. 713-725
85. Peters NS, Green CR, Poole-Wilson PA, Severs NJ
Cardiac arrhythmogenesis and the gap junctions
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 27(1) (1995): pp. 37-44
86. Potter LR
CNP, cardiac natriuratic peptide
Endocrinology 145(5) (2004): pp 2129-2130
87. Raine AE, Erne P, Burgisser E, Muller FB, Bolli P, Burkart F, Bühler FR
Atrial natriuretic peptide and atrial pressure in patients with congestive heart failure
New England Journal of Medicine 315(9) (1986): pp. 533-537
88. Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille LB, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J
Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin 43
Science 267 (1995): pp. 1831-1834

89. Rodeheffer RJ, Tanaka I, Imada T, Hollister AS, Robertson D, Inagami T
Atrial pressure and secretion of atrial natriuretic factor into the human central circulation
Journal of the American College of Cardiology 8(1) (1986): pp. 18-26
90. Ross RD, Daniels SR, Dolan LM, Young CA, Meyer RA
Determinants of plasma atrial natriuretic factor concentrations in congenital heart disease
American Journal of Cardiology 62 (1988): pp. 785-788
91. Ruskoaho H
Cardiac Hormones as diagnostic tools in heart failure
Endocrine Reviews 24(3) (2003): pp. 341-356
92. Sáez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC
Plasma membrane channels formed by connexins: Their regulation and functions
Physiological Reviews 83 (2003): pp. 1359-1400
93. Saffitz JE, Kanter HL, Green KG, Tolley TK, Beyer EC
Tissue-specific determinants of anisotropic conduction velocity in canine atrial and ventricular myocardium
Circulation Research (74) (1994): pp. 1065-1070
94. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase
Science 239 (1988): pp. 487-491
95. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors
Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America
74(12) (1977): pp. 5463-5467

96. Schild TA
Einführung in die real-time TaqMan™ PCR-Technologie
PE Applied Systems. Weiterstadt, 1991, 7700 SDS Workshop
97. Sepp R, Severs NJ, Gourdie RG
Altered patterns of cardiac intercellular junction distribution in hypertrophic cardiomyopathy
Heart 76(5) (1996): pp. 412-417
98. Severs NJ
Pathophysiology of gap junctions in heart disease
Journal of Cardiovascular Electrophysiology 5(5) (1994): pp. 462-475
99. Severs NJ
The cardiac muscle cell
BioEssays 22 (2000): pp. 188-199
100. Severs NJ
Gap junctions alterations in the failing heart
European Heart Journal 15(D) (1994): pp. 53-57
101. Simon AM, Goodenough DA
Diverse function of vertebrate gap junctions
Cell Biology 8 (1998): pp. 477-483
102. Simon AM
Gap junctions: more roles and new structural data
Cell Biology 9 (1999): pp. 169-170
103. Smith JH, Green CR, Peters NS, Rothery S, Severs NJ
Altered patterns of gap junction distribution in ischemic heart disease. An immunohistochemical study of human myocardium using laser scanning confocal microscopy.
American Journal of Pathology 139(4) (1991): pp. 801-821

104. Splitt MP, Tsai MY, Burn J, Goodship JA
Absence of mutations in the regulatory domain of gap junction protein connexin 43 in patients with viscerotrial heterotaxy
Heart 77 (1997): pp. 369-370
105. Stryer L
Biochemie
Spektrum Akademischer Verlag GmbH (1994)
106. Sudoh T, Kanagawa K, Minamino N, Matsuo H
A new natriuretic peptide in porcine brain
Nature 332 (1988): pp. 78-81
107. Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H
C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of the natriuretic peptide family identified in porcine brain
Biochemical and Biophysical Research Communications 168 (1990): pp. 863-870
108. Takahashi T, Allen PD, Izumo S
Expression of A-, B- and C-type natriuretic peptide genes in failing and developing human ventricles. Correlation with expression of the Ca(2+)-ATPase gene
Circulation Research 71(1) (1992): pp. 9-17
109. Tamaddon HS, Vaidya D, Simon AM, Paul DL, Jalife J, Morley GE
High-resolution optical mapping of the right bundle branch in connexin 40 knockout mice reveals slow conduction in the specialized conduction system
Circulation Research 87(10) (2000): pp. 929-936
110. Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Hisanaga T, Maeda Y, Fukai D, Ohnishi M, Sugimoto Y, Kinoshita M
Attenuation of compensation of endogenous cardiac natriuretic peptide system in chronic heart failure
Circulation 96 (1997): pp. 509-516

111. Valiunas V, Gemel J, Brink PR, Beyer EC
Gap junction channels formed by coexpressed connexin 40 and connexin 43
American Journal of Heart and Circulatory Physiology 281(4) (2001): pp. H1675-H1689
112. Valiunas V, Weingart R, Brink PR
Formation of heterotypic gap junction channels by connexin 40 and 43
Circulation Research 86 (2000): pp. e42
113. van der Velden HMW and Jongsma HJ
Cardiac gap junctions and connexins: their role in atrial fibrillation and potential as therapeutic targets
Cardiovascular Research 54 (2002): pp. 270-279
114. van Kempen MJ, ten Velde I, Wessels A, Oosthoek PW, Gros D, Jongsma HJ, Moorman AF, Lamers WH
Differential connexin distribution accomodates cardiac function in different species
Microscopy Research and Techique 31(5) (1995): pp. 420-436
115. van Kempen MJ, Vermeulen JL, Moorman AF, Gros D, Paul DL, Lamers WH
Developmental changes of connexin 40 and connexin 43 mRNA distribution patterns in the rat heart
Cardiovascular Research 32(5) (1996): pp. 886-900
116. van Rijen HV, van Kempen MJ, Postma S, Jongsma HJ
Tumor necrosis factor alpha alters the expression of connexin 43, connexin 40, and connexin 37 in human umbilical vein endothelial cells
Cytokine 10(4) (1998): pp. 258-264
117. van Veen TAB, van Rijen HVM, Opthof T
Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties
Cardiovascular Research 52(2) (2001): pp. 217-229

118. Veenstra RD, Wang HZ, Westphale EM, Beyer EC
Multiple connexins confer distinct regulatory and conductance properties of gap junctions in developing heart
Circulation Research 71(5) (1992): pp. 1277-1283
119. Vozzi C, Dupont E, Coopen SR, Yeh HI, Severs NJ
Chamber-related differences in connexin expression in the human heart
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 31 (1999): pp. 991-1003
120. Wambach G
Cardiac peptides and their importance in heart failure
Z Kardiol 8(8) (1999): pp. 41-46
121. Wang TL, Tseng YZ, Chang H
Regulation of connexin 43 gene expression by cyclical mechanical stretch in neonatal rat cardiomyocytes
Biochemical and Biophysical Research Communication 267 (2000): pp. 551-557
122. Wei CM, Heublein DM, Parrella MA, Lerman A, Rodeheffer RJ, McGregor CGA
Natriuretic peptide system in human heart failure
Circulation 88(3) (1993): pp. 1004-1009
123. Weil J, Strom TM, Bragenberg R, Sebening W, Haufe M, Lang RE, Bildingmaier F, Gerzer R
Plasma atrial natriuretic peptide levels in children with cardiac diseases: Correlation with cGMP levels and hemodynamic parameters
Hormone Research 28 (1987): 64-70
124. Weil J, Bildingmaier F, Döhlemann C, Kuhnle U, Strom T, Lang RE
Comparison of plasma atrial natriuretic peptide levels in healthy children from birth to adolescence and in children with cardiac diseases
Pediatric Research 20(12) (1986): pp. 1328-1331

125. White TW, Paul DL
Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions
Annual Review of Physiology 61 (1999): pp. 283-310
126. Wilkins MR, Redondo J, Brown LA
The natriuretic-peptide family
Lancet 349 (1997): pp. 1307-1310
127. Xia D, Sanders A, Shah M, Bickerstaff A, Orosz C
Real-time polymerase chain reaction analysis reveals an evolution of cytokine mRNA production in allograft acceptor mice
Transplantation 72(5) (2001): pp. 907-914
128. Yasue H, Obata K, Okumura K, Kurose M, Ogawa H, Matsuyama K, Jougasaki M, Saito Y, Nakao K, Imura H
Increased secretion of atrial natriuretic polypeptide from the left ventricle in patients with dilated cardiomyopathy
Journal of Clinical Invest 83(1) (1989): pp. 46-51
129. Yasue H, Yoshimura M, Sumida H, Kikuta K, Kugiyama K, Jougasaki M, Ogawa H, Okumura K, Mukoyama M, Nakao K
Congestive heart failure / hypertension / hypertrophy: Localisation and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure
Circulation 90(1) (1994): pp. 195-203
130. Yeager M
Structure of cardiac gap junction intercellular channels
Journal of Structural Biology 121 (1998): pp. 231-245
131. Yoshibayashi M, Kamiya T, Saito Y, Nakao K, Nishioka K, Temma S, Itoh H, Shirakami G, Matsuo H
Plasma brain natriuretic peptide concentration in healthy children from birth to adolescence: marked and rapid increase after birth
European Journal of Endocrinology 133 (1995): pp. 207-209

132. Yoshimura M, Yasue H, Okumura K, Ogawa H, Jougasaki M, Mukoyama M, Nakao K, Imura H
Different secretion patterns of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in patients with congestive heart failure
Circulation 87(2) (1993): pp. 464-469

8 Abkürzungen

ANP	atrial natriuretic peptide/A-type natriuretic peptide
AOI	Aortenklappeninsuffizienz
APS	Ammonium-Persulfat
AV-Block	aterioventrikulärer Block
A(x)	Absorption gemessen bei einer Wellenlänge von x
BNP	brain natriuretic peptide/B-type natriuretic peptide
bp	Basenpaar(e)
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre Dann
COPD	chronisch obstruktive Atemwegserkrankung
CTAB	Cetyl-Trimethyl-Ammoniumbromid
CX 40	Connexin 40
CX 43	Connexin 43
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DECP	Diethylpyrocarbonat
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
dGTP	2'-Desoxy-Guanin-5'-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DNAse	Desoxyribonuklease
dpm	Desintegrations per minute
dTTP	2'-Desoxy-Thymin-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetic acid
et al.	und andere
f.c.	Endkonzentration (final concentration)
FET	Fluoreszens-Energietransfer
FSB	first strand buffer

g	Gramm
HLHS	hypoplastisches Linksherzsyndrom
ICM	ischämische Kardiomyopathie
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalactosid
i.S.	im Sinne
kb	Kilobase(n) (1 kb entspricht 1000 Basenpaaren)
kDa	Kilodalton
KHK	koronare Herzkrankheit
LA	linker Vorhof (left atrium)
Lown ...	Einteilungsgrad der ventrikulären Extrasystolen
LSB	Linksschenkelblock
LV	linker Ventrikel (left ventricle)
M	molar
MI	Mitralklappeninsuffizienz
ml	Milliliter
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
nm	Nanometer
NYHA	New York Heart Association
OD x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x
PAI	Pulmonalarterienklappeninsuffizienz
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDA	persistierender Ductus arteriosus
pH	Maß für die Säurestärke einer Lösung
PHD	pulmonale Hypertonie (pulmonary hypertensive disease)
RA	rechter Vorhof (right atrium)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNAse	Ribonuklease
RV	rechter Ventrikel (right ventricle)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SR	Sinusrhythmus

Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit (Einheit für die Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
TI	Trikuspidalklappeninsuffizienz
tRNA	Transfer-RNA
UpM	Umdrehungen pro Minute
VES	ventrikuläre Extrasystolen
VSD	ventrikulärer Septumdefekt
VWI	Vorderwandinfarkt
w/v	weight/volume
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-indolyl- β -D-galactosid
Z. n.	Zustand nach

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Heinrich Netz danke ich für die Betreuung der Promotion und die Bereitstellung aller nötigen Hilfsmittel, sowie der Räumlichkeiten im Institut für Klinische Chemie, Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Rainer Kozlik-Feldmann und Herrn Dr. Ulrich Römer, Abteilung für Kinderkardiologie und pädiatrische Intensivmedizin, für die interessante Themenstellung und die Betreuung.

Für die hervorragende Einarbeitung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken, den vielen praktischen Ratschlägen, die unermüdliche Unterstützung und die gute Zusammenarbeit möchte ich Frau Christine Pottgießer besonders danken.

Ein Dankeschön für die freundliche Aufnahme im Labor, die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft an Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. habil. Peter Lohse, Frau Pia Lohse und Frau Heike Rübsamen.

Meinen Eltern gilt ein besonderer Dank für die tatkräftige und uneingeschränkte Unterstützung meines Studiums.

Meinem Ehemann Thomas Gebhard bin ich zu größtem Dank verpflichtet. Er hielt in allen Höhen und Tiefen zu mir und gab mir den nötigen Rückhalt für das Erreichen meines Berufzieles.

10 Tabellarischer Lebenslauf

Name	Sonja Gebhard, geb. Anderlik
Geburtsdatum	1. April 1974
Geburtsort	München
Wohnort	87437 Kempten, Hugo-von-Höfl-Platz 3
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet
Konfession	rk
Eltern	Brigitte Anderlik, geb. Swoboda Rainer Anderlik
Schulabschluss	allgem. Abitur 1993
Ausbildung	1993-1995: <u>VMTA</u> , Lehranstalt für veterinärmedizinisch- technische Assistentin, Oberschleißheim 1995-2001: <u>Medizinstudium</u> an der LMU <u>München</u> : 1997: Physikum 1999: 1. Staatsexamen 2001: 2. Staatsexamen <u>Famulaturen:</u> Chirurgie – KKH Pasing, München Allgemeinmedizin/Unfallmedizin/Sportmedizin – Praxis Dr. Ch. Hundemer, München Hausarztpraxis/Notfalldienst – Praxis Dr. Hans-Jürgen Blum / Ursula Elster, München Gynäkologie und Geburtshilfe – Klinikum Kempten- Oberallgäu Kinderheilkunde, Jugendmedizin und Neonatologie – Klinikum Kempten-Oberallgäu <u>Sportmedizin</u> ausbildung: Beginn 2000 an der LMU <u>München</u>

2001 – 2002: Medizinstudium Universität Ulm,
Praktisches Jahr im Klinikum Kempten-Oberallgäu:

1. Tertial: Chirurgie
2. Tertial: Innere Medizin
3. Tertial: Pädiatrie

2002: 3. Staatsexamen

2002-2004 Ärztin im Praktikum im Klinikum Kempten
Abteilung für Kinderheilkunde, Jugend-
Medizin und Neonatologie

Notfallmedizinausbildung: Beginn 2004 in Berchtesgarden

seit 2004 Assistenzärztin in der Klinik Santa Maria,
Oberjoch zum Erlangen der Zusatzbezeichnung
Allergologie

Asthmatrainer seit Januar 2006

Promotion: Beginn Januar 2000

Proben-Nr.	Material aus	hCX40	hCX43	hGH	hANP	hBNP	18s	Transpl.	Geschl.	Gewicht (kg)	Länge (cm)	geb.	Alter (Jahre)	Krankheitsdauer (Jahre)	Diagnose	Nebendiagnosen	NYHA	FS(%)	LVED (mm)	EKG/Echokardiographie	Herzindex (l/min/m ²)	EF(%)	PA-Druck (mmHg)	PC-Druck (mmHg)	Coronarien	Histologie	
1	RA	10463,0233	30490,805	767165,6	8610298,5	183117,35	1479493,67	HTX	m	73	189	20.06.1965	33	1	DCM	MfII, LowIIIb		4	15	83 MfIII, LowIIIb	2,3	unbekannt	10	unbekannt	?	hypertrophiertes und dilatiertes Myokard, immunhistolog. AK gegen Sarkolemm, V.a. sek. Immungense, insgesamt passend zur DCM	
2	RV	1258,705	51771,15	944494,8	475983,05	34934,135	1192805	HTX	m	73	189	20.06.1965	33	1	DCM	MfII, LowIIIb		4	15	83 MfIII, LowIIIb	2,3	unbekannt	10	unbekannt	?	hypertrophiertes und dilatiertes Myokard, immunhistolog. AK gegen Sarkolemm, V.a. sek. Immungense, insgesamt passend zur DCM	
3	LA	8397,23	48268,49	719164,1	8300544	74293,815	927813,85	HTX	m	73	189	20.06.1965	33	1	DCM	MfII, LowIIIb		4	15	83 MfIII, LowIIIb	2,3	unbekannt	10	unbekannt	?	hypertrophiertes und dilatiertes Myokard, immunhistolog. AK gegen Sarkolemm, V.a. sek. Immungense, insgesamt passend zur DCM	
4	LV	2017,795	39202,605	429497,95	974903,2	16925,585	1112188,33	HTX	m	73	189	20.06.1965	33	1	DCM	MfII, LowIIIb		4	15	83 MfIII, LowIIIb	2,3	unbekannt	10	unbekannt	?	hypertrophiertes und dilatiertes Myokard, immunhistolog. AK gegen Sarkolemm, V.a. sek. Immungense, insgesamt passend zur DCM	
5	RA	2883,495	40781,615	1118376,5	12606420	99502,34	1292779	HTX	m	63	164	29.08.1944	55	20	DCM	PH, Vorhofflimmern, Deflimplantation, Z.n. Nierenimplantation		3	24	84 MfIII, AO I1	2,18	20	43	34	unauffällig	?	
6	RV	1844,19	73454,55	1109470,5	3706297	135773,75	1330369,5	HTX	m	63	164	29.08.1944	55	20	DCM	PH, Vorhofflimmern, Deflimplantation, Z.n. Nierenimplantation		3	24	84 MfIII, AO I1	2,18	20	43	34	unauffällig	?	
7	LA	3805,245	68079,72	886512,55	14013330	233732,75	1128516	HTX	m	63	164	29.08.1944	55	20	DCM	PH, Vorhofflimmern, Deflimplantation, Z.n. Nierenimplantation		3	24	84 MfIII, AO I1	2,18	20	43	34	unauffällig	?	
8	LV	384,39	159629,3	1610382	11345,867	377,595	2258514	HTX	m	63	164	29.08.1944	55	20	DCM	PH, Vorhofflimmern, Deflimplantation, Z.n. Nierenimplantation		3	24	84 MfIII, AO I1	2,18	20	43	34	unauffällig	?	
9	RA	14700,785	51635,42	1087883,5	26196075	338146,55	2312886	HTX	m	73	178	05.06.1942	54	9	DCM	Novacor bei rezidiv. Kammerflimmern, Leberinsuff., Niereninsuff., akutes MOV bei Inf. der Novacorklappe		4	8	87 Rechts Herzinsuff.	2,25	11	22	unbekannt	unauffällig	keine	
10	RV	2491,925	114713,75	1438428,5	1234748,5	108724,55	2242358,5	HTX	m	73	178	05.06.1942	54	9	DCM	Novacor bei rezidiv. Kammerflimmern, Leberinsuff., Niereninsuff., akutes MOV bei Inf. der Novacorklappe		4	8	87 Rechts Herzinsuff.	2,25	11	22	unbekannt	unauffällig	keine	
11	LA	8059,72	76661,795	1025296,5	12688460	154141,15	1409259	HTX	m	73	178	05.06.1942	54	9	DCM	Novacor bei rezidiv. Kammerflimmern, Leberinsuff., Niereninsuff., akutes MOV bei Inf. der Novacorklappe		4	8	87 Rechts Herzinsuff.	2,25	11	22	unbekannt	unauffällig	keine	
12	LV	8240,085	78693,605	1320095,5	210427,7	28127,7633	1719850,5	HTX	m	73	178	05.06.1942	54	9	DCM	Novacor bei rezidiv. Kammerflimmern, Leberinsuff., Niereninsuff., akutes MOV bei Inf. der Novacorklappe		4	8	87 Rechts Herzinsuff.	2,25	11	22	unbekannt	unauffällig	keine	
13	RA	539,77	10144,7	209564,35	2703,18	0	803879,5	HTX	m	54	158	27.06.1983	15	5	DCM	Medos Assist, MfII		4	12	62 MfII	1,63	unbekannt	46	33	unauffällig	keine	
14	RV	1448,765	41623,62	764389,2	19900,465	32452,75	936019,733	HTX	m	54	158	27.06.1983	15	5	DCM	Medos Assist, MfII		4	12	62 MfII	1,63	unbekannt	46	33	unauffällig	keine	
15	LA	3587,63	37547,355	529029,75	1726787	1015,745	992069,1	HTX	m	54	158	27.06.1983	15	5	DCM	Medos Assist, MfII		4	12	62 MfII	1,63	unbekannt	46	33	unauffällig	keine	
16	LV	8135,13	63534,185	631023,05	10345,71	61,365	1188418,5	HTX	m	54	158	27.06.1983	15	5	DCM	Medos Assist, MfII		4	12	62 MfII	1,63	unbekannt	46	33	unauffällig	keine	
17	RA	16487,185	72626,005	1553962	14758046,7	137078,15	1434751	HTX	w	47	156	20.09.1956	41	12	DCM	MfIII, TIV, Z.n. Schrittmacherimplantation		4	16	67 MfIII, TIV	2,5	unbekannt	21	16	unauffällig	keine	
18	RV	2461,345	66052,395	1516267	7582,495	1274,925	1618224,5	HTX	w	47	156	20.09.1956	41	12	DCM	MfIII, TIV, Z.n. Schrittmacherimplantation		4	16	67 MfIII, TIV	2,5	unbekannt	21	16	unauffällig	keine	
19	LA	8025,05	87385,715	1791349,5	15260630	294389,5	1409350	HTX	w	47	156	20.09.1956	41	12	DCM	MfIII, TIV, Z.n. Schrittmacherimplantation		4	16	67 MfIII, TIV	2,5	unbekannt	21	16	unauffällig	keine	
20	LV	1610,235	70079,255	1494580,5	1189200,5	59378,53	1777384	HTX	w	47	156	20.09.1956	41	12	DCM	MfIII, TIV, Z.n. Schrittmacherimplantation		4	16	67 MfIII, TIV	2,5	unbekannt	21	16	unauffällig	keine	
21	RA	4804,535	75591,76	1600873	514854,7	15177,255	2305775,5	HTX	m	96	170	25.08.1936	61	9	DCM	PHD, Z.n. Myokarditis (Enteroviren)		3	8	83 SR	1,9	18	53	38	unauffällig	chron. Myokarditis, DCM	
22	RV	5819,265	71644,785	1513595	2107485	36904,86	3075382	HTX	m	96	170	25.08.1936	61	9	DCM	PHD, Z.n. Myokarditis (Enteroviren)		3	8	83 SR	1,9	18	53	38	unauffällig	chron. Myokarditis, DCM	
23	RV	609,38	77963,91	1392496	740920,25	19006,74	2196043,5	HTX	m	61	165	27.10.1941	56	2	DCM	art.Hypertonie, Diab.mell.TypIb, komp.Niereninsuff., Hyperlipoproteinämie		3		"global gute Pumpfunktion bei Hypokinesie anterolateral"	1,6	unbekannt	17	10	unauffällig	keine	
24	LV	4259,44	65510,07	1072249	6295573,5	302345,95	2718913,67	HTX	m	61	165	27.10.1941	56	2	DCM	art.Hypertonie, Diab.mell.TypIb, komp.Niereninsuff., Hyperlipoproteinämie		3		"global gute Pumpfunktion bei Hypokinesie anterolateral"	1,6	unbekannt	17	12	unauffällig	keine	
25	LV	952,02	48253,57	1246369,5	561553,7	44064,8633	2595942,5	HLTX	m	63	187	17.11.1977	19	5	DCM	sek.PHD, VSD, fixierte pulmonale Hypertonie		3	25	"global schlechte Pumpfunktion"	2,4	36	60	unbekannt	?	keine	
26	LV	1416,105	80311,21	1782625,5	2845435,5	249787,65	1958289	HTX	m	67	175	30.03.1961	35	3	DCM	Z.n. Myokarditis, LowIVa, nutr.-tox. Leberfunktionsstörung		4	8	85 Low IVa	1,2	unbekannt	36	36	unauffällig	DCM, TGF beta1 Expression	
27	RA	4868,315	117443,95	1316695,5	20760730	373096,3	2165344	HNTX	m	64	173	04.01.1956	41	10	DCM	term.Niereninsuff., Gicht, abs.Arrhythmie bei Vorhofflimmern, Z.n. Nierentransplantation		3	6	71 abs.Arrhythmie, Vorhofflattern	2,3	23	25	14	unauffällig	?	
29	LV	392,505	68243,115	1385763	26451,565	13010,45	1979525,67	HTX	m	58	175	10.09.1942	55	6,5	DCM	Diab. TypII		3	10	unbekannt	1,4	17	40	27	KHK	keine	
30	LA	7851,75	75012,155	1368630	14940165	278796,55	2010424	HTX	m	58	175	10.09.1942	55	6,5	DCM	Diab. TypII		3	10	unbekannt	1,4	17	40	27	KHK	keine	
31	RA	8598,2	52043,485	1255455,5	16500585	429424,4	2338349	HTX	m	90	180	12.11.1944	51	5	DCM	KHK, 3-Gefäßerkrankung, COPD, Deflimplantation bei Kammerflimmern		3	16	70 ?	2,1	32	60/20	12	KHK	keine	
32	RV	765,145	76708,775	1474964	17485,88	797,145	1783455,5	HTX	m	90	180	12.11.1944	51	5	DCM	KHK, 3-Gefäßerkrankung, COPD, Deflimplantation bei Kammerflimmern		3	16	70 ?	2,1	32	60/20	12	KHK	keine	
33	LA	8985,15	81817,58	1483958	13623430	118044,85	1957318	HTX	m	8,5	80	21.04.1997	1,5	1,5	konnatale DCM unklarer Genese	TfI, MfII, stark eingeschränkte Ventrikelfunktion		4	13,5	48,5	max. Linkshypertrophiezeichen, Erregungsrückbildungsstörungen i.S. einer Cardiomyopathie	3,4	sehr klein	50	18	unauffällig	geringgradige gleichmäßige, reaktive Hypertrophie des Myokards ohne histolog. oder immunhistolog. Nachweis einer akuten oder chron. Myokarditis. Morpholog. Keine dilat. Cardiomyopathie
34	LV	542,415	84173,755	1543862	6249,555	5290,27	2048233	HTX	m	8,5	80	21.04.1997	1,5	1,5	konnatale DCM unklarer Genese	TfI, MfII, stark eingeschränkte Ventrikelfunktion		4	13,5	48,5	max. Linkshypertrophiezeichen, Erregungsrückbildungsstörungen i.S. einer Cardiomyopathie	3,4	sehr klein	50	18	unauffällig	geringgradige gleichmäßige, reaktive Hypertrophie des Myokards ohne histolog. oder immunhistolog. Nachweis einer akuten oder chron. Myokarditis. Morpholog. Keine dilat. Cardiomyopathie
35	LV	1736,53	67622,325	2115758	1018273,5	37232,605	2648469	HTX	m	52	156	27.10.1943	54	23	DCM	nach Batista, ACVB auf RCA, Mitral- und Trikuspidalklappenrekonstruktion		4	20	82, mittelgradig eingeschränkte LV-Pumpfunktion	4,4	54	19	von RCA, RCX und RIVA	keine		
36	LV	2689,655	74404,86	1694683	1990942	56197,225	2196511,5	HTX	m	74	172	23.09.1940	57	9	DCM	insulinplf. Diab.mellitus Typ IIa, Z.n. Deflimplantation, Z.n. Ventrikelseptumplastik nach Batista, Niereninsuff.		3	14	66 kompl.LSB	1,86	34	34	24	?	keine	
37	RV	1114,84	83199,855	2454381	3275530	380490,75	2204442	HTX	m	8,5	80	21.04.1997	1,5	1,5	konnatale DCM unklarer Genese	TfI, MfII, stark eingeschränkte Ventrikelfunktion		4	13,5	48,5	max. Linkshypertrophiezeichen, Erregungsrückbildungsstörungen i.S. einer Cardiomyopathie	3,4	sehr klein	50	18	unauffällig	geringgradige gleichmäßige, reaktive Hypertrophie des Myokards ohne histolog. oder immunhistolog. Nachweis einer akuten oder chron. Myokarditis. Morpholog. Keine dilat. Cardiomyopathie
38	LV	4065,13667	76242,18	1400353,5	30477,54	613,43	3220904,5	HTX	m	75	171	15.04.1948	50	50	Aortenitium	komb. Aortenitium		4	4	eingeschränkt	1,75	unbekannt	30	unauffällig	keine		
39	RV	2772,465	83134,53	1649794,5	141932,45	5558,54	2448086,5	HTX	m	75	171	15.04.1948	50	50	Aortenitium	komb. Aortenitium		4	4	eingeschränkt	1,75	unbekannt	30	unauffällig	keine		
40	RA	4214,02	77146,785	1009752,45	10430610	135613,15	2797895	HTX	m	75	171	15.04.1948	50	50	Aortenitium	komb. Aortenitium		4	4	eingeschränkt	1,75	unbekannt	30	unauffällig	keine		
41	LV	5335,705	184963,85	2246568,5	1585,685	236,94	2811502	HTX	m	22,5	123	25.04.1989	9	4	prim.PHD	keine		4	4	schlechte rechtsventr. Funktion	unbekannt	unbekannt	unbekannt	unbekannt	unbekannt	keine	
42	LV	1053,87	143202,5	1627595,5	40146,44	5825,12	3932393	HTX	m	76	168	28.03.1953	44	3	ICM	Z.n. Vorderwandinfarkt, chron. Linksherzinsuff. bei KHK		3	Fkt. deutlich reduziert	74	SR	1,6	35	35	23(42)	3-Gefäßerkrankung	keine
43	RV	729,74	73395,905	926269	9228,133	1113																					

