

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK UND POLIKLINIK I, KLINIKUM GROSSHADERN,  
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
DIREKTOR: PROF. DR. MED. G. STEINBECK

GENEXPRESSIONSUNTERSUCHUNGEN VON  $\alpha_{1c}$ ,  $\alpha_2/\delta$ ,  $\beta$ , SERCA 2A, UND  
PHOSPHOLAMBAN IN ENDOMYOKARDBIOPSIEN VON PATIENTEN MIT  
HYPERTROPHISCH OBSTRUKTIVER KARDIOMYOPATHIE

## DISSERTATION

ZUM ERWERB DES DOKTORGRADES DER MEDIZIN AN DER MEDIZINISCHEN  
FAKULTÄT DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON

SIMON JUNG

MÜNCHEN

2005

MIT GENEHMIGUNG DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Boekstegers

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. I. Bittmann

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. R. Hullin

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2005

## WIDMUNG

Diese Arbeit widme ich meiner verstorbenen Mutter Heidelore Jung.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>4</b>
1.1 Hypertrophisch obstruktive Kardiomyopathie . . . . .	4
1.1.1 Klinische Symptomatik und Verlauf . . . . .	5
1.1.2 Ätiologie . . . . .	5
1.1.3 Pathogenese . . . . .	6
1.1.4 Pathophysiologie . . . . .	6
1.1.5 Molekulare Pathophysiologie . . . . .	7
1.1.6 Therapie . . . . .	8
1.1.7 Muskelkontraktion und zellulärer Calciumstoffwechsel . . . . .	10
1.2 Calciumkanal . . . . .	13
1.2.1 Die $\alpha_{1c}$ -Untereinheit . . . . .	13
1.2.2 Die $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit . . . . .	14
1.2.3 Die $\beta$ -Untereinheit . . . . .	15
1.3 Sarkoplasmatische Retikulum Calcium Adenosidtriphosphatase . . . . .	16
1.4 Phospholamban . . . . .	17
1.5 Kardiales Calsequestrin . . . . .	18
1.6 Fragestellung und Ziele der Arbeit . . . . .	19
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1 Endomyokardbiopsien . . . . .	21
2.1.1 Entnahme . . . . .	21
2.1.2 Präparation des Gewebes . . . . .	22
2.1.3 Reverse Transkription der mRNS in cDNS . . . . .	24
2.2 Kompetitive PCR . . . . .	25

2.2.1	Grundprinzip der kompetitiven PCR . . . . .	25
2.2.2	Versuchsaufbau und -durchführung . . . . .	27
2.3	Herstellung der Kompetitorfragmente . . . . .	29
2.3.1	PCR-Klonierung . . . . .	29
2.3.2	Elektroelution . . . . .	30
2.3.3	Klonierung . . . . .	31
2.3.4	Präparation mit Minipräp/Midipräp . . . . .	32
2.3.5	Sequenzierung zur Kontrolle der Kompetitorfragmente . . . . .	35
2.4	Messung und Berechnung der hämodynamischen Parameter . . . . .	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
3.1	Primerwahl . . . . .	42
3.1.1	Die $\alpha_{1c}$ -Untereinheit . . . . .	42
3.1.2	Die $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit . . . . .	43
3.1.3	Die $\beta$ -Untereinheit . . . . .	43
3.1.4	Die SERCA 2a . . . . .	44
3.1.5	Das Phospholamban . . . . .	44
3.1.6	Das kardiale Calsequestrin . . . . .	44
3.2	Erstellung der kompetitiven Fragmente . . . . .	45
3.2.1	Die $\alpha_{1c}$ -Untereinheit . . . . .	46
3.2.2	Die $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit . . . . .	47
3.2.3	Die $\beta$ -Untereinheit . . . . .	48
3.2.4	Die SERCA 2a . . . . .	49
3.2.5	Das Phospholamban . . . . .	50
3.3	Kompetitive PCR . . . . .	51
3.3.1	Die $\alpha_{1c}$ -Untereinheit . . . . .	51
3.3.2	Die $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit . . . . .	51
3.3.3	Die $\beta$ -Untereinheit . . . . .	52
3.3.4	Die SERCA 2a . . . . .	52
3.3.5	Das Phospholamban . . . . .	52
3.4	Bestimmung des kardialen Calsequestrins . . . . .	53
3.5	Ergebnisse der Untersuchungen . . . . .	54

3.5.1	Charakterisierung des Patientenkollektivs . . . . .	54
3.5.2	Ergebnisse der Expressionsuntersuchungen . . . . .	55
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>60</b>
4.1	Kompetitive PCR zur Charakterisierung von Genexpressionsänderungen	60
4.2	Rechtsventrikuläre versus linksventrikuläre Biopsie . . . . .	61
4.3	Vergleichbarkeit der Genexpressionsunterschiede zwischen den einzelnen Biopsien . . . . .	62
4.4	Genexpressionsänderungen der Untereinheiten des L-Typ Calciumkanals	64
4.5	Genexpression der sarkoplasmatischen Calcium-ATPase 2a und des Phospholambans . . . . .	66
4.6	Hypertrophisch obstruktive Kardiomyopathie als humanes Modell für Genexpressionänderungen nach Reduktion des Afterload . . . . .	67
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>69</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>71</b>

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Hypertrophisch obstruktive Kardiomyopathie

Die hypertrophisch obstruktive Kardiomyopathie (HOCM) gehört zu der Gruppe der hypertrophischen Kardiomyopathien, die zusätzlich noch die Form der hypertrophisch nicht obstruktiven Kardiomyopathie (HNCM) umfaßt. Eine intraventrikuläre Obstruktion der Ausflußbahn des linken Ventrikels bedingt eine erhöhte Druckarbeit, was eine Hypertrophie der gesamten Herzmuskulatur des linken Ventrikels nach sich zieht. Die Prävalenz der HOCM liegt zwischen 0.02 und 1.1% in der Normalbevölkerung, wobei das Verhältnis Männer zu Frauen 0.26 : 0.09% beträgt. In einer in den USA durchgeführten Studie erwies sich die hypertrophische Kardiomyopathie als die häufigste Ursache eines plötzlichen unerwarteten Herztodes zwischen dem 14. und 40. Lebensjahr bei sportlich aktiven Menschen und als zweithäufigste Ursache (nach der koronaren Herzkrankheit) bei sportlich inaktiven in der selben Altersgruppe [22].

### 1.1.1 Klinische Symptomatik und Verlauf

Die Symptomatik der HOCM umfaßt in 60% der Fälle eine Belastungsdyspnoe. Eher uncharakteristische Symptome sind pektanginöse Beschwerden, Schwächegefühl, Herzklagen, Schwindel, Leistungsknick und Synkopen. Eine bestehende HOCM kann über Monate und sogar Jahre hinweg symptomlos bleiben und sich klinisch erst in einem plötzlichen Herztod manifestieren.

Die Mortalität liegt je nach Risikoprofil zwischen 0.5 und 8.6% [22]. Das Auftreten einer absoluten Arrhythmie bei Vorhofflimmern und einer ventrikulären Tachykardie sind prognostisch ungünstige Faktoren [28, 88].

### 1.1.2 Ätiologie

Es gilt heute als gesichert, dass es sich bei dieser Form der Herzkrankheit um eine Erbkrankheit handelt. Der Vererbungstyp ist autosomal dominant. Die Myokardverdickung entwickelt sich meist bis zum 25. Lebensjahr wobei die Penetranz mit dem Alter steigt und der Phänotyp starken Variationen unterliegt [56]. Die Erkrankung ist heterogen, das heißt es kommen mehrere Ursachen in Betracht. Bisher hat man über 50 Genanomalien [88] auf den Chromosomen 1, 3, 7, 11, 12, 14 und 15 als Ursachen verifizieren können, wobei weitere Genloki wahrscheinlich sind [22]. Von dem Gendefekt betroffen sind vor allem kontraktile Proteine oder Komponenten des Sarkomers, vorzugsweise die Schwerkette des kardialen Myosins, das  $\alpha$ -Tropomyosin und das kardiale Troponin [8]. Etwa 30% der hypertrophischen Kardiomyopathien sind auf Punktmutationen im kardialen  $\beta$ -Myosin-Schwerketten-Gen und 15% auf Punktmutationen im Troponin-T-Gen zurückzuführen.

### 1.1.3 Pathogenese

Bei der hypertophisch obstruktiven Kardiomyopathie findet sich eine Hypertrophie bestimmter Bezirke im Septum, der Muskelwand zwischen rechtem und linkem Herzen. Dies bedingt eine Obstruktion der Ausflußbahn des linken Herzens und damit eine erhöhte Druckarbeit, was eine Hypertrophie der gesamten Herzmuskulatur des linken Ventrikels nach sich zieht. Die intraventrikuläre Obstruktion hat folgende zwei Lokalisationsmöglichkeiten: subaortal in 88% und mittventrikulär in 12% aller Fälle [22]. Der Obstruktion liegt eine systolische Dorsalbewegung des basalen Anteils und eine Vorwärtsbewegung des freien Randes des anterioren Mitralsegels in Richtung des oberen Anteils des Septums zugrunde [60, 9]. Die durch die Obstruktion bedingte Einengung des Ausflußtraktes geht mit einer Abknickung der Ventrikellängsachse nach ventral einher. Häufig wird sie von einer Mitralsuffizienz im Rahmen einer Verplumpfung des vorderen Mitralsegels begleitet, als Folge der Einengung und des diastolischen Septumkontakte. Histologisch zeigt sich ein vor allem septal deutlich verstärkter „fiber disarray“, eine Fehlanordnung der Herzmuskelfasern, und zusätzlich eine Dysorganisation der fibrillären Architektur innerhalb der Zelle [8].

### 1.1.4 Pathophysiologie

Pathophysiologisch kann sich ein Druckgradient zwischen linkem Ventrikel und Aorta bilden. Über die Ursachen des Gradienten wird immer noch diskutiert. Derzeit nimmt man an, dass er aufgrund

1. einer erhöhten linksventrikulären Kontraktilität
2. des verringerten Preload (bzw. des linksventrikulären Volumens) und aufgrund
3. des verringerten Afterload (bzw. der aortalen Impedanz und des aortalen Drucks)

entsteht [46].

Klinisch relevant sind bei der HOCM die hämodynamischen Veränderungen. Im Vordergrund steht hier neben dem systolisch erhöhtem Druckgradienten zwischen linkem Ventrikel und Aorta die diastolische Relaxationsstörung. Darunter versteht man funktionell die Abnahme des Quotienten  $\frac{pQ}{pT}$ , das heißt der Druckabfall im linken Ventrikel

über die Zeit ist verlangsamt. Dies bedingt einen erhöhten linksventrikulären Füllungsdruck bei normalem enddiastolischen Volumen, bei normaler Auswurffraktion und bei normalem oder erniedrigtem Schlagvolumen. Das lässt sich auch an einer nach oben verschobenen diastolischen Druck-Volumen-Beziehung zeigen, was gleichzusetzen ist mit einer erniedrigten Dehnbarkeit des linken Ventrikels. Die quantitative Bestimmung des Ausmaßes der diastolischen Relaxationsstörung kann bei einer Herzkatheteruntersuchung mittels Messung des linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVEDP) erfolgen.

Die Folge des erhöhten Füllungsdrucks sind Symptome einer belastungsinduzierten pulmonal-arteriellen Hypertonie wie Dyspnoe. In fortgeschrittenem klinischen Stadium sind Folge des verminderten enddiastolischen Volumens Symptome des Vorwärtsversagens wie Leistungsknick und rasche Ermüdbarkeit [95].

### 1.1.5 Molekulare Pathophysiologie

Über die Ursache dieser funktionellen Störung wird kontrovers diskutiert. Es werden zwei Hypothesen in Bezug auf den pathophysiologischen Mechanismus der diastolischen Relaxationsstörung aufgestellt:

1. eine Störung des Calciumstoffwechsels
2. eine Störung der zytoskelettalen bzw. extrazellulären Matrix

Beide Modelle versuchen die verringerte linksventrikuläre Dehnbarkeit zu erklären, welche als Ursache für den erhöhten Füllungsdruck anzusehen ist. Die Dehnbarkeit des linken Ventrikels wird im Wesentlichen bestimmt von einer muskulären und einer nichtmuskulären Komponente.

Die muskuläre Komponente wiederum wird bestimmt durch einen aktiven und einen passiven Teil. Der aktive, energieaufwendige Teil, ist die Beendigung des cross-bridge-cycling-Prozesses der aktivierten Herzmuskelzelle durch Calciumwiederaufnahme aus dem Zytosol in das sarkoplasmatische Retikulum. Auch der Afterload, die Kontraktilität und die Synchronizität des Kontraktionsprozesses nehmen Einfluß auf den aktiven Teil der muskulären Komponente. Der Preload ist als Beeinflussungsfaktor auszuschließen [26]. Bis auf den Afterload werden alle genannten Faktoren durch den

Calciumstoffwechsel beeinflußt und teilweise bestimmt und finden so Eingang in die erste Hypothese. Der passive Teil ist die Compliance des linken Ventrikels, das heißt die Elastizität der muskulären Wand. Sie findet Eingang in die zweite Hypothese.

Zur nichtmuskulären Komponente der Beeinflussung der Dehnbarkeit der Wand des linken Ventrikels zählen verschiedene Faktoren wie das rechtsventrikuläre Loading und der Koronarturgor. Aber auch eine Perikarditis constrictiva und die externe Kompression durch raumfordernde Prozesse verändern die Compliance [95, 75]. Da diese Faktoren Teil der zweiten Hypothese sind, sind sie im Rahmen einer klinisch-apparativen Diagnostik als potentielle Störgrößen für unsere Messungen auszuschließen.

In dieser Arbeit wird als Arbeitshypothese angenommen, dass die verringerte Dehnbarkeit des linken Ventrikels (als Ursache für den erhöhten Füllungsdruck) durch eine Störung im Calciumstoffwechsel der Herzmuskelzelle (Hypothese 1) bedingt ist.

### 1.1.6 Therapie

Im Folgenden wird auf die Behandlungsmöglichkeiten der HOCM eingegangen, da diese einen essentiellen Bestandteil unserer Messungen darstellen. Ziel verschiedener Therapien ist die Reduktion der ventrikulären Septumhypertrophie und der linksventrikulären Füllungsrate sowie die Behandlung des Bluthochdrucks ohne die Auswurffraktion des linken Herzens zu mindern [75].

Die medikamentösen Optionen beschränken sich derzeit auf die symptomatische Behandlung mittels Blocker des  $\beta$ -adrenergen Systems sowie Nifedipin, Diltiazem und Verapamil, welche zu den Calciumkanalblockern gehören [88, 24]. Der Wirkung der  $\beta$ -Blocker liegt die Senkung der Herzfrequenz und damit die relative und absolute Verlängerung der Diastolendauer sowie die Erhöhung der passiven ventrikulären Füllungsrate zugrunde [92, 36, 13]. Diskutiert wird auch die Reduktion des Sauerstoffbedarfs bei körperlicher Anstrengung durch die Senkung der Reaktion auf inotrope Stimulation [99, 36, 13, 21]. Verapamil scheint über die Verbesserung der ventrikulären Füllungsrate und wahrscheinlich über eine Reduktion der Ischämie zur Besserung der Symptome beizutragen [72, 35, 5, 91, 4, 39, 93]. Es werden teilweise noch weitere Medikamente eingesetzt, doch eine wirkliche ursächliche Behandlung der funktionellen Störung ermöglicht letztendlich nur der operative Eingriff, der vor allem bei Patienten

eingesetzt wird, die entweder als Hochrisikopatienten in Bezug auf einen plötzlichen Herztod eingestuft werden oder bei Patienten, die bei medikamentöser Behandlung keine Verbesserung der klinischen Symptomatik zeigen.

Im Wesentlichen sind zwei Arten zu unterscheiden. Nämlich die operative Resektion des hypertrophierten Septumanteils und die operative Verlagerung des vorderen Mitralsegels. Diese Operationen waren lange Zeit weit verbreitet und bergen neben einer weniger hohen Erfolgsquote auch eine hohe hospitale Mortalität (2.9 – 10.9%) [81]. Die Zweikammer-Schrittmacher-Implantation ist eine weitere Behandlungsoption der HOCM. Sie basiert auf der Verkürzung des AV-Intervalls und der Modifikation des ventrikulären Depolarisationsablaufes, wodurch eine Reduktion des Ausflußgradienten erreicht wird [20, 67, 65, 48].

In letzter Zeit beginnt sich ein 1995 durch Sigwart [86] erstmals beschriebener minimalinvasiver Eingriff im Rahmen eines Herzkatheters durchzusetzen: die transkoronare Ablation der Septumhypertrophie (TASH). Durch einen induzierten Infarkt mittels Injektion von Alkohol in die das hypertrophierte Septum versorgende Koronararterie wird eine Reduktion des hypertrophierten Septumanteils erreicht [9]. Unter Röntgenkontrolle erfolgt zuerst das Aufsuchen des Septalastes, der das hypertrophierte Areal versorgt. Dies wird bestätigt durch passagere Inflation eines Ballons in dem Septalast, gleichzeitig wird invasiv der  $\Delta \frac{LV}{AOP}$  (systolischer Druckgradient zwischen dem linken Ventrikel und der Aorta) bestimmt. Ein Absinken des  $\Delta \frac{LV}{AOP}$  bedingt durch die hypoxisch induzierte Verminderung der Obstruktion bestätigt die korrekte Position des Katheters. Insgesamt verspricht die TASH eine maximale Reduktion der linksventrikulären Ausflusstraktobstruktion und der Compliance des linken Ventrikels bei minimal chirurgischem Aufwand und Risiko [83, 61, 50, 27, 18, 28, 9]. Komplikationen sind AV-Block und tachykarde Rhythmusstörungen [83]. In [53] wurde die myokardiale Perfusion und der myokardiale Glucosestoffwechsel nach erfolgter Okklusion des septalen Astes mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) mit F-18-Fluorodeoxyglucose (T-18-FDG) und Tc-99m-MIBI-Einzel-Photon-Emissions-Tomographie (SPECT) bestimmt. Es ergab sich eine gleichsinnige Reduktion von myokardialer Perfusion und myokardialem Glucosemetabolismus in einem umschriebenen Areal des basalen Septums entsprechend des Versorgungsgebiets des zur TASH benutzen Septalastes. Das übrige Myokard blieb unbeeinflußt. Wie sich gezeigt hat, führt die TASH zu einer an-

haltenden Elimination der Obstruktion durch Verminderung der septalen Wanddicke. Dies spiegelt sich nicht nur in einer Senkung des LVEDP sondern auch in der deutlichen Verbesserung der NYHA-Einstufung der Patienten wider [53, 61].

Zur Überprüfung der Arbeitshypothese dieser Arbeit wurden Expressionsuntersuchungen an Endomyokardbiopsien bei Patienten mit HOCM vor und 3 Monate nach Behandlung mit TASH vorgenommen. Da, wie eben beschrieben, durch die Behandlung eine Verbesserung der diastolischen Relaxationsstörung erfolgt, müßten, wenn man zu grundelegt, dass unsere Hypothese zutrifft, in den beiden Probenserien vor und nach Behandlung Unterschiede in Bezug auf Parameter des Calciumstoffwechsels auftreten.

### 1.1.7 Muskelkontraktion und zellulärer Calciumstoffwechsel

Um zu erläutern, welche Parameter gemessen wurden, wird nun genauer auf den Calciumstoffwechsel und die damit verbundene Kontraktion der Zelle bzw. des Sarkomers eingegangen. Das Sarkomer besteht aus dem Aktin, das sich wiederum aus zwei Aktinfilamenten und Troponin C zusammensetzt, und dem Myosin, einer ATPase. Das Myosin besteht aus zwei umeinander verdrillten schweren Peptidketten und vier leichten Ketten. Die beiden schweren Ketten bilden an einem Ende zwei globuläre Köpfchen. Jedes dieser Köpfchen hat Bindungstellen für Aktin, ATP und zwei light chains. Eine Muskelfaser setzt sich aus mehreren Myofibrillen zusammen, die in ihrer longitudinalen Ausdehnung in sogenannte Sarkomere unterteilt werden. Die Myofibrillen enthalten ein System aus longitudinalen und transversalen Tubuli. Der Kontraktionsvorgang besteht in der Verkürzung eines jeden Sarkomers. Dies wird verwirklicht über Interaktion zwischen Aktin und Myosin über die Myosinköpfchen und einem anschließenden Ruderschlag, dem cross-bridge-cycling, welcher zu einer Verschiebung des Aktins in Richtung Sarkomermitte führt.

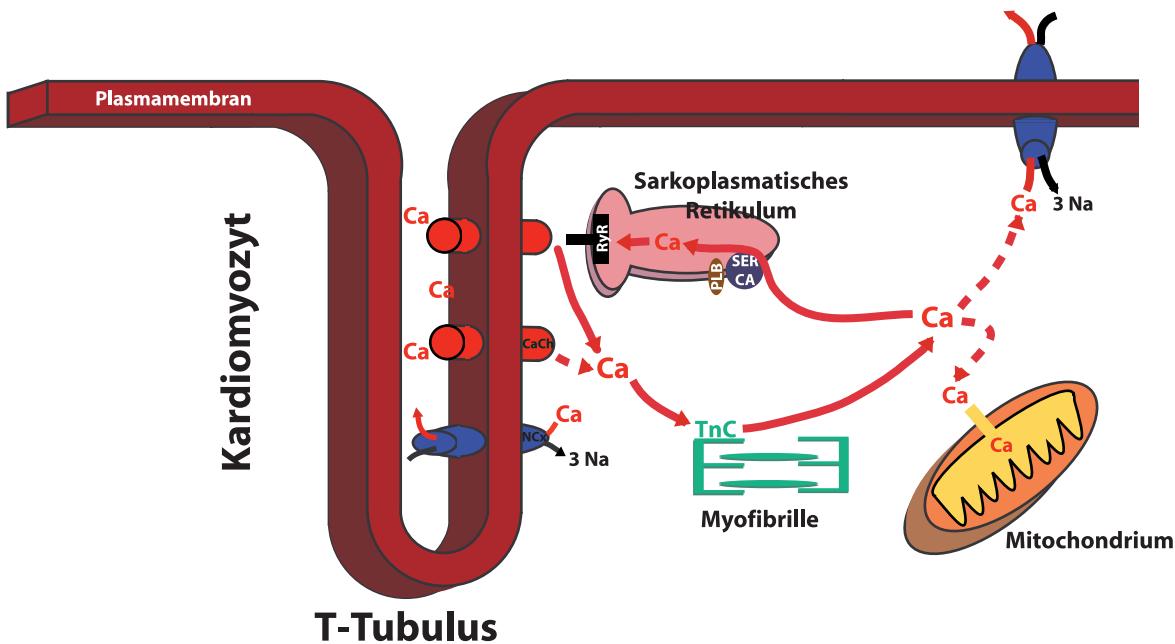


Abbildung 1: Der Calciumstoffwechsel

Gesteuert wird der Kontraktionsprozeß über die zytosolische Calciumkonzentration. Physiologisch beträgt das Verhältnis Calcium intrazellulär : extrazellulär in der ruhenden Zelle etwa 1 : 10000. In diesem Zustand bindet Tropomyosin an die Myosinbindungsstelle des Aktins. Hierfür ist Troponin I mit inhibitorischer Funktion und Troponin T nötig. Erhöht sich die zytosolische Calciumkonzentration bindet Calcium an Troponin C. Dieser Komplex bindet das Troponin I, woraufhin sich das Troponin T dem Troponin C nähert und so die Bindungstelle für das Myosinköpfchen auf dem Aktin durch Verschiebung des Tropomyosins freigegeben wird. Die Kontraktion dauert genau so lange an, so lange das Troponin T und I von Troponin C gebunden ist, also die zytosolische Calciumkonzentration erhöht ist [8, 29].

Getriggert wird die Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration durch ein überschwelliges Aktionspotential rhythmisch ausgelöst von spezialisierten Herzmuskelzellen, den potentiellen Schrittmachern. Hat das Aktionspotential, dessen Fortleitung im Verband der Herzmuskelzellen durch sogenannte disci intercalares begünstigt wird, eine Herzmuskelzelle erreicht, setzt sich durch die Depolarisation von ca. -80 mV auf ca. +20 mV eine Kaskade von Calciumverschiebungen in Gang. Durch die Depolarisation des Membranpotentials über den Schwellenwert wird im ersten Schritt der spannungsaktivierte L-Typ Calciumkanal durch eine Konformationsänderung aktiviert [29, 8].

Der aktivierte Kanal ermöglicht den Durchtritt von Calciumionen in das Zellinnere. An dem Aktionspotential der Herzmuskelzelle sind weitere Kanäle wie  $Na^+$ - und  $K^+$ -Kanäle beteiligt [29], auf die hier aber nicht weiter eingegangen werden soll. Das eingeströmte Calcium ist aber quantitativ gesehen für eine physiologische Kontraktion bei weitem nicht ausreichend. Hingegen aktiviert das eingeströmte Calcium im weiteren Verlauf einen spezifischen Calciumrezeptor des sarkoplasmatischen Retikulums (genannt Ryanodin-Rezeptor, weil dieser durch Ryanodin blockiert wird) [96]. Dieser ist der sarkoplasmatische Retikulum Calcium-release-channel, der nach Aktivierung Calciumionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) in das Zytosol freisetzt (Calcium-induzierte-Calcium-Freisetzung). Dies führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca-konzentration um das 10 – 15fache von  $0.1 \mu M$  auf  $1 \mu M$  [19].

Um das Calcium wieder aus der Zelle zu entfernen stehen der Herzmuskelzelle drei Mechanismen zur Verfügung. Ein wesentlicher Mechanismus ist ein aktiver, ATP-abhängiger Pumpprozeß durch die sakroplasmatische Retikulum Calcium ATPase (SERCA 2a). Sie ist in der Membran des SR lokalisiert und befördert das freie Calcium in das Lumen des Membransystems. Der Regulation der SERCA dient ein weiteres Protein, das Phospholamban, dessen Aktivität durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation gesteuert wird. Der zweite wesentliche Mechanismus zur Entfernung des Calciums aus der Herzmuskelzelle ist der  $Na^+/Ca^{2+}$ -Exchanger. Dieser befördert durch Aufnahme von zwei  $Na^+$  Ionen in das Zellinnere ein  $Ca^{2+}$  Ion in den Extrazellulärtraum. Der dritte Mechanismus ist die Calciumaufnahme in das Mitochondrium.

Mit Hilfe der genannten Mechanismen kann also über die Regulation der intrazellulären Calciumkontraktion der Kontraktionsvorgang der Herzmuskelzelle gesteuert werden. Eine Störung des Calciumstoffwechsels hätte demnach eine Störung der Kontraktion respektive der Dehnbarkeit der Wand des linken Ventrikels zur Folge (zum Beispiel bei gestörter Beendigung der Kontraktion). Von Relevanz ist auch die Tatsache, dass eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration über den maximalen physiologischen Wert hinaus eine toxische Wirkung auf den gesamten Zellapparat zeigt.

In dieser Arbeit wurde die Genexpression des L-Typ Calciumkanals, der SERCA und des Phospholambans untersucht. Die Ergebnisse wurden auf die Genexpression des kardialen Calsequestrins normalisiert. Daher wird im Folgenden näher auf die Prote-inprodukte der untersuchten Gene eingegangen.

## 1.2 Calciumkanal

Der L-Typ Calciumkanal der Herzmuskelzelle besteht aus drei verschiedenen Proteinuntereinheiten [40].

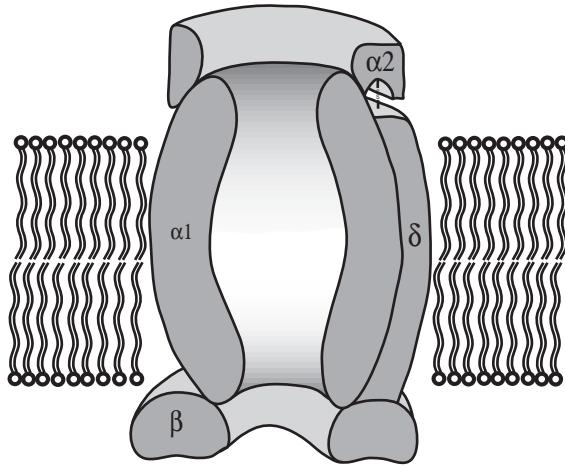


Abbildung 2: Der L-Typ Calciumkanal

Die zentrale, ionenleitende Pore  $\alpha_{1c}$  (165 kDa) trägt die Bindungsstellen für die Calciumkanalblocker. Die beiden Untereinheiten  $\alpha_2/\delta$  ( $\alpha_2$ : 140 kDa;  $\delta$  30 kDa) und  $\beta$  (52 – 65 kDa) wirken regulierend auf den Calciumioneneinstrom [23].

### 1.2.1 Die $\alpha_{1c}$ -Untereinheit

Für die Ionenpore  $\alpha_1$  sind bisher zehn verschiedene Gene identifiziert worden. Sie werden nach der Konsensusvereinbarung [2] als  $Ca_{v1.x}, Ca_{v2.x}, Ca_{v3.x}$  bezeichnet. Die  $\alpha_{1c}$ -Untereinheit ist ein Spleißprodukt aus dem  $Ca_{v1.2}$ . Sie wird auf dem Chromosom 12p13 kodiert [58, 79]. Die  $\alpha_{1c}$ -Untereinheit besteht aus vier homologen Repeats (I-IV). Die Repeats, die über intra-/extrazelluläre Schleifen (Loops) miteinander verbunden sind, sind aus sechs transmembranären  $\alpha$ -helikalen Segmenten (S1-S6) zusammengesetzt. Sie sind zueinander zu 45 – 60% homolog. Den einzelnen Segmenten und Schleifen konnten spezifische Funktionen zugeordnet werden. Das amphiphile S4-Segment eines jeden Repeats fungiert als Spannungssensor des Calciumkanals [23], da es positive Ladungen trägt, die sich im Fall der Membranpotentialveränderung geringfügig verschieben und

so zu einer Konformationsänderung des Proteins führen. Das hat die Öffnung der Ionenpore zur Folge [31]. Funktionell von Bedeutung ist des Weiteren die extrazelluläre Schleife zwischen 5. und 6. Segment (P-Loop) in jedem der vier Repeats. Der P-Loop bedingt die hohe Selektivität des Calciumkanals für Calciumionen ( $10^{2-3}$ fach höher als für Natrium oder Kaliumionen) [85] indem er sich in die Kanalöffnung einstülpt und diese auskleidet. In vitro ändert ein Austausch dieser Abschnitte mit entsprechenden Sequenzen aus  $Na^+$ -Kanälen die Selektivität von  $Ca^{2+}$  zu  $Na^+$  [38]. Die sogenannte  $\alpha_{1c}$  interaction domain (extrazellulär gelegene Schleife zwischen Repeat I und II) ist an der Wechselwirkung der  $\alpha_{1c}$ - mit der  $\beta$ -Untereinheit respektive mit GTP-bindenden Proteinen beteiligt [69, 103]. Auf der  $\alpha_{1c}$ -Proteindomäne sind die Rezeptorstellen für die Calciumantagonisten des Dihydropyridin- (DHP), Benzothiazepin- und Phenylalkylamintyps (PAA) lokalisiert. An den Transmembranhelices und den intra- und extrazellulären Enden von III S6 und IV S6 konnten Rezeptorstellen für die PAA und intrazellulär angrenzend an die Transmembranhelix von IV S6 Bindungstellen für die DHP charakterisiert werden [71, 94].

### 1.2.2 Die $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit

Der  $\alpha_2$  Anteil ist extrazellulär aufgelagert und über eine Disulfidbrücke mit der transmembranären  $\delta$ -Untereinheit zur der  $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit verknüpft [16, 47, 90]. Bislang wurden drei verschiedene Gene kloniert, welche die  $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit kodieren. Sie ist stark glykosiliert und es wurden bisher fünf Spleißvarianten in verschiedenen Spezies ausfindig gemacht [10, 11, 101, 49]. Das Propeptid des für die  $\alpha_2$ - und die  $\delta$ -Untereinheit auf Chromosom 7q [45] gemeinsam kodierenden Gens wird durch post-transkriptionale limitierte Proteolyse an Position 934 in die beiden sub-Untereinheiten aufgespalten [16].

Die Aufgabe dieser zusammengesetzten Untereinheit bei der Regulation des Calciumkanals besteht in der Beschleunigung der Aktivierungskinetik, Erhöhung der Größe des Ionenstroms und der Normalisierung der Bindungsaffinität für Dihydropyridine, die bei der isolierten  $\alpha_{1c}$ -Untereinheit um das 5-10fache erniedrigt ist [98].

### 1.2.3 Die $\beta$ -Untereinheit

Die zweite akzessorische Untereinheit des L-Typ Calciumkanals ist die auf der zytosolischen Seite des Sarkolemm gelegene hydrophile  $\beta$ -Untereinheit [69, 66]. Es wurden im humanen Herzen verschiedene Gene der  $\beta$ -Untereinheit gefunden, nämlich  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_3$  [14, 43, 12, 33].

Alle drei Typen sind hydrophile Proteine, deren Sekundärstruktur vier 27 – 42 Aminosäuren lange  $\alpha$ -helikale Regionen (Domänen 1 – 4) zeigt. Im Bereich dieser  $\alpha$ -Helices liegen hoch konservierte, 8 Aminosäuren umfassende Abschnitte, welche von Leucin-/Isoleucin-Sequenzen negativer Ladung eingerahmt sind. Derartige Strukturelemente lassen aufgrund ihrer Ladung an niedrigaffine Bindungsstellen (Dissoziationskonstante  $\approx 1\text{mM}$ ) für polyvalente Kationen wie  $Ca^{2+}$  denken. Über die fixierten Wiederholungen hydrophober Aminosäurereste (heptad repeats) zwischen den Domänen II, III und IV treten zytoskelettale Proteine miteinander in Wechselwirkung [23].

Die  $\beta$ -Untereinheit reguliert wesentlich den Calciumeinstrom über eine Vergrößerung des Ionenstroms und einer Verschiebung der Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals hin zu negativeren Membranpotentialen [43, 52, 63]. Des Weiteren bewirkt sie eine Akzeleration der Inaktivierungskinetik [68]. Beteilt ist die  $\beta$ -Untereinheit auch an der Vermittlung der Regulation des kardialen Calciumkanals durch Proteinphosphorylierung und/oder GTP-bindende Proteine. Die Phosphorylierung erfolgt an die  $\beta_1$ - und die  $\beta_2$ -Untereinheit [74, 32], wohingegen die  $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit mit dem G-Protein wahrscheinlich um Bindungsstellen an der  $\alpha_{1c}$ -Untereinheit konkurriert und so eine Inhibition des Calciumeinwärtsstroms durch G-Proteine verhindert [17, 7]. Diese Beeinflussungen der elektrischen Eigenschaften des Calciumkanals werden einerseits über die Expression der verschiedenen  $\beta_2$ -Untereinheiten kodierenden Gene reguliert. Andererseits spielt der proteolytische Abbau sogenannter PEST Domänen der  $\beta$ -Proteine eine Rolle. Diese Sequenzabschnitte sind reich an den Aminosäuren Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) und im allgemeinen anfällig gegenüber dem Abbau durch Proteasen und deshalb mitbestimmender Faktor für die Halbwertszeit des Proteins.

## 1.3 Sarkoplasmatische Retikulum Calcium Adenosintriphosphatase

Die sarkoplasmatische Retikulum Calcium ATPase (SERCA) wird durch drei verschiedene Gene kodiert und in bisher fünf verschiedene bekannte Isoformen exprimiert [37]. Die SERCA gehört der Untergruppe II der P-Typ ATPasen zu. Diese P-Typ ATPasen übertragen das terminale Phosphat des Adenosintriphosphats im Rahmen der Aktivierung auf eine Aspartat Gruppe im aktiven Zentrum. Dies führt zu einer reversiblen Konformationsänderung bestimmter Teile des Proteins. Verschiedene Untergruppen der SERCA finden sich in verschiedenen menschlichen Geweben. Im Myokard wird die SERCA 2a exprimiert.

Die SERCA 2a ist verantwortlich für den Rücktransport von zytosolischen Calciumionen in das sarkoplasmatische Retikulum, die im Rahmen des calciuminduzierten Releases freigesetzt wurden. Durch Umsatz eines ATP-Moleküls können zwei Calciumionen entgegen einem mehr als 1000 fachem Konzentrationsgradienten von intrazellulär nach intrasarkoplasmatisch transportiert werden.

Reguliert wird die Aktivität des Pumpvorgangs durch

1. Phosphorylierung der SERCA 2a
2. Phospholamban und dessen Phosphorylierung
3. Änderung des Ionen-Transportverhältnisses und durch
4. quantitative Änderungen der Genexpression der SERCA 2a und der phosphorylierenden Proteine.

Im phosphorylierten Zustand ist die Aktivität der SERCA 2a gesteigert. Die Phosphorylierung erfolgt nach heutigem Wissenstand durch die Ca-abhängige Proteinkinase II. Die Regulierung der Aktivität durch das Phospholamban hat einen grösseren Stellenwert als die Phosphorylierung der SERCA 2a [25, 62, 64].

## 1.4 Phospholamban

Phospholamban (PLB) ist ein 52 Aminosäuren umfassendes, 6,1 kDa schweres, integrales Membranprotein des sarkoplasmatischen Retikulums. Es bildet in vivo ein Homopentamer.

Nichtphosphoryliertes PLB bindet an die SERCA2a und wirkt inhibitorisch. Phosphorylierung des PLB hebt diese Inhibition auf unter Steigerung der Relaxationsrate (positiv lusitroper Effekt) und der Kontraktilität (positiv inotroper Effekt) [55]. Die Phosphorylierung des Phospholambans erfolgt an Serin-10 durch Phospholipase-C, an Serin-16 durch Proteinkinase A und an Threonin-17 durch  $Ca^{2+}$ -Calmodulin-abhängige Mechanismen. Die Phosphorylierung durch Proteinkinase A besitzt den grössten Stellenwert und ist wahrscheinlich Voraussetzung zur Phosphorylierung an Threonin-17. Es wird angenommen, dass die Phosphorylierung des PLB zu einer Dissoziation des SERCA-PLB-Komplexes führt und so die Inhibierung aufhebt [25, 64]. Andere Arbeiten hingegen konnten nicht zeigen, dass eine Phosphorylierung des PLB zu einer Dissoziation des SERCA-PLB-Komplexes führt, wohl aber eine Konformationsänderung [1]. Dies führt zu einer Linksverschiebung der EC50-Werte für die initiale Calciumtransportrate, aber zu keiner Änderung der maximalen Aktivität [25]. Calcineurin (eine Phosphatase) scheint über eine Calcineurin-abhängige Dephosphorylierung des Phospholambans ebenfalls Einfluss auf die Aktivität der SERCA zu üben [59]. Aus Mutationsstudien geht hervor, dass wahrscheinlich lediglich die transmembranäre Helix des PLB an der Interaktion mit der SERCA 2a beteiligt ist und die zytosolisch gelegenen Komponenten die oben erwähnten Aminosäuren zur Phosphorylierung tragen [55].

Im Rahmen der myokardialen Kontraktion spielt der Umfang des sarkoplasmatischen Calciumspeichers eine wesentliche Rolle: der Umfang dieses Calciumspeichers ist eine wesentliche Determinante der kardialen Kontraktilität (je grösser der Speicher, desto mehr Calcium kann im nächsten Zyklus durch die calciuminduzierte Calciumfreisetzung freigesetzt werden). In isolierten Herzpräparationen wurde eine lineare Beziehung zwischen PLB und der Kontraktions- und Relaxationsrate gefunden. Dies ist ein Hinweis auf die wichtige Funktion des Phospholambans in Bezug auf die Kontraktilität des Herzens. Im Rahmen von Studien zur dilatativen Kardiomyopathie konnte eine

Verringerung der inhibitorischen Funktion von PLB eine weitere Progression der Erkrankung im Tiermodell verhindern [55]. Andererseits ist z.B. eine Arginin 9 Cystein Mutation des PLB als eine Ursache der dilatativen Kardiomyopathie identifiziert worden.

Umgekehrt löste die vierfache Erhöhung des PLB in Mäusen eine kompensatorische Erhöhung der Adrenalin- und Noradrenalininspiegel aus, um den gesteigerten inhibitorischen Effekt des PLB durch Phosphorylierung aufzuheben. Im Langzeitversuch versagte dieser Kompensationsmechanismus aber zunehmend und führte zu kardialem Remodelling und Progression bis zur Herzinsuffizienz mit früher Mortalität [55].

Versuche zur hypertrophen Kardiomyopathie waren bisher leider nicht so erfolgreich: zwar konnte eine Erhöhung des PLB die Kontraktilität der Kardiomyozyten erhöhen, hatte aber keinen Einfluss auf die Kontraktilität des gesamten Herzens [87].

## 1.5 Kardiales Calsequestrin

Calsequestrin ist ein Protein mit einer Masse von 40.000 Da und bindet 50 mol Calcium pro mol Protein und hat damit die Funktion eines intrazellulären Calciumspeicherproteins. Der Vorgang der Bindung von Calcium an das Protein scheint geringe Konformationsänderungen im Bereich der Proteinoberfläche zu bewirken [100]. Zwei Isoformen wurden bisher identifiziert, die eine Form vornehmlich exprimiert im Skelettmuskel und die andere Form im Herzmuskel. Expressionsuntersuchungen haben gezeigt, dass die Expression unverändert bleibt sowohl im hypertrophen Myokard, als auch während der embryonalen Entwicklung und des Alterns [37].

Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit die Expression des kardialen Calsequestrins verwendet zur Normalisierung der Expressionsanalysen der untersuchten Gene. Damit wird ein Vergleich der Expressionslevels aus den verschiedenen grossen Myokardbiopsien ermöglicht.

## 1.6 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Diese Arbeit beschäftigt sich zum einen mit der diastolischen Relaxationsstörung bei Patienten mit hypertrophisch obstruktiver Kardiomyopathie (HOCM). Es soll überprüft werden, ob an dieser Relaxationsstörung eine Störung des Calciumstoffwechsels der Herzmuskelzelle beteiligt ist.

Zum anderen kann die HOCM und die Behandlung derselben als ein humanes Modell für Untersuchungen zu Genexpressionsänderungen nach Reduktion des Afterload (durch Behandlung mittels TASH) verwendet werden. Dieser Ansatz wird in der Diskussion erörtert.

Um diese Fragestellungen angehen zu können, wurden Expressionsuntersuchungen mittels kompetitiver PCR der  $\alpha_{1c}$ -, der  $\alpha_2/\delta$ -, der  $\beta$ -Untereinheit, der SERCA 2a und des Phospholambans an Endomyokardbiopsien von Patienten mit HOCM vorgenommen. Diese Biopsien wurden vor und nach transkoronarer Alkoholablation entnommen, welche zu einer Verbesserung der diastolischen Dysfunktion führt.

# Kapitel 2

## Material und Methoden

Das Speichermedium der Erbinformation liegt in der Zelle innerhalb des Nukleus (Zellkern) in Form von Desoxyribonukleinsäure (DNS) vor. Die Baupläne für nahezu alle im Körper vorkommenden Proteine sind auf der DNS kodiert. Zur Produktion der Proteine wird der kodierende DNS-Abschnitt zuerst transkribiert, d.h. eine mRNS (messanger Ribonukleinsäure)-Kopie wird erzeugt. Sie dient als Matrize. Im nächsten Schritt wird die mRNS dann nach Modifikationsschritten translatiert, also ein aus Aminosäuren bestehender Strang erzeugt. Sogenannte Promotorregionen auf der DNS und zahlreiche Substanzen, die teilweise extrazellulärer Herkunft sind, nehmen Einfluß auf die Transkriptionsrate und passen die Zelle so ihrer sich ständig verändernden Umgebung an. Folglich variiert die Menge der in der Zelle vorhandenen mRNS-Transkripte für ein beliebiges Protein. Zusätzlich kann auch die Translation beeinflußt werden, was zur Folge hat, dass nicht jede mRNS-Kopie zwingend auch eine Proteinproduktion zur Folge hat.

Im weiteren Verlauf wird auf die Methodik der quantitativen Bestimmung der mRNS in Myokardbiopsien eingegangen. Untersucht wurde die mRNS-Expression der folgenden Gene:

1. die Untereinheiten des L-Typ Calciumkanals
2. die SERCA 2a
3. das Phospholamban
4. das kardiale Calsequestrin

## 2.1 Endomyokardbiopsien

Der Ablauf der quantitativen Bestimmung der mRNS umfaßt folgende Schritte:

1. Entnahme der Endomyokardbiopsie
2. Präparation des Gewebes
3. Isolation der mRNS aus dem gewonnenen Material
4. reverse Transkription der mRNS in cDNS
5. kompetitive PCR

### 2.1.1 Entnahme

Die für unsere Untersuchungen verwendeten Proben stammen aus Herzen von Patienten mit HOCM. Gewonnen wurden sie durch Entnahme einer Endomyokardbiopsie im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung entsprechend der Genehmigung durch die Ethikkommission der LMU-München, Klinikum Großhadern. Dies wurde jeweils vor und ca. sechs Monate nach TASH bei Patienten mit HOCM durchgeführt. Die Endomyokardbiopsien wurden unter Durchleuchtung aus dem distalem Anteil des Septums entnommen, ausgehend vom rechten Ventrikel. Sowohl zum Zeitpunkt der Intervention, als auch sechs Monate später wurde in einem Areal des Septums biopsiert, welches soweit als möglich vom hypertrophierten Septumanteil bzw. der Interventionsstelle

entfernt lag.

Diese Biopsien sind nur wenige Milligramm schwer. Das Gewebe wird sofort nach der Entnahme in ein zuvor autoklaviertes Eppendorf-Cup überführt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung bis zur weiteren Bearbeitung erfolgt bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.1.2 Präparation des Gewebes

Die Präparation der mRNS der Biopsie wurde mit Hilfe des Dynabeads mRNS DIRECT Kit der Firma Dynal vorgenommen. Dieses Kit erlaubt den Aufschluß des Gewebes und die anschließende Isolierung der mRNS in einem Versuchsprotokoll. Sämtliche Arbeitsschritte wurden, um Kontaminationen zu vermeiden, unter einer Laminarflow durchgeführt. Arbeitshilfen wie Pipetten wurden mit 70% Ethanol Lösung gereinigt und anschliessend für diese Präparation verwendet.

Die Separation der mRNS von der Gesamtmenge an DNS und RNS macht sich die Tatsache zunutze, dass mRNS-Moleküle, die innerhalb des Nukleus erzeugt wurden, durch posttranskriptionale Modifikation einen Poly-A Schwanz aus 50 bis 200 Basen am 3'-Ende besitzen [54]. Zur Isolierung sind an die Dynabeads kovalent Oligo-dT Sequenzen gebunden. Durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen dem poly A-Tail und den dT-Ketten der Dynabeads wird die mRNS an die Dynabeads gebunden und die metallischen Eigenschaften der Dynabeads erlauben dann eine Abtrennung der DNS und Rest-mRNS. Dies wird erreicht, indem in der Lösung die Beads magnetisch separiert werden und die Lösungen ausgetauscht werden. Durch Elution wird in einem letzten Schritt die mRNS von den Beads abgelöst.

Das Vorgehen beginnt mit dem Vorlegen von  $39 \mu\text{l}$  Extraktionspuffer (4 M Guanidiunium-Isithiocyanat, 1% Dithiothreitol=DTT, 0.5% Laurylsarosinat, 0.1 M Tris pH 8) und  $1.2 \mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol in ein Potter-Glas-Teflon-Zylinder, der vor Versuchsbeginn bei  $250^{\circ}\text{C}$  über 2 Stunden gebacken wurde. Diese Mischung trägt einerseits zur Zelllyse bei und verhindert gleichzeitig den Abbau der mRNS während des Versuchs durch ubiquitär vorhandene RNAsen. Die Biopsie wird mit Hilfe einer sterilen Kaniüle in die Lösung überführt. Ein für das Pottersystem vorgesehener zuvor sterilisierter Stößel wird für ca. 2 Minuten manuell auf- und abbewegt und leicht gedreht. Das Homoge-

nisat wird in ein 0.5 ml Eppendorf-Cup überführt. Der Glaszylinder wird mit 79.8  $\mu$ l Lysis/Bindungspuffer ( $4^{\circ}\text{C}$ ; 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM LiCl, 10 mM EDTA pH 8, 1% LiDS, 5 mM Dithiothreitol) gespült und die Spülflüssigkeit ebenfalls in das Cup pipettiert. Durch 10maliges Auf- und Abbewegen des Spritzenstempels einer sterilen 1 ml Spritze mit aufgesteckter grauer Kanüle wird die chromosomale DNS geschert. Die Zelltrümmer werden durch Zentrifugation ( $4^{\circ}\text{C}$ , 5 Minuten, 14000 U/min) abgetrennt. Während dieser Zeit werden die Dynabeads vorbereitet. Dazu werden 30  $\mu$ l Dynabeads Oligo-dT25 (Aufbewahrungspuffer: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.02%  $\text{NaN}_3$ ) in ein 0.5 ml Eppendorf-Cup pipettiert. Es folgt eine magnetische Separation für 30 Sekunden in dem dafür vorgesehenem Dynal-Magnetständer (MPC). Der Überstand wird soweit entfernt, so dass die Dynabeads noch gerade eben mit Flüssigkeit bedeckt sind. 200  $\mu$ l Lysis/Bindungspuffer werden zugegeben und die Suspension wird so lange mit einer Pipette gemischt, bis die Dynabeads homogen gelöst sind. Erneut wird für 1 Minute magnetisch separiert und der Überstand abgenommen. Die Beads sind jetzt aktiviert.

Den Überstand aus dem zentrifugierten Cup, welches das Gewebe enthält, wird nun zu den aktivierten Dynabeads gegeben und luftblasenfrei mit einer Pipette resuspensiert. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur über 5 Minuten erfolgt die eigentliche magnetische Separation für 5 Minuten. Es folgt ein zweimaliger Waschvorgang der Beads, um die nicht gebundenen Bestandteile (DNS, RNS, tRNS etc.) zu entfernen. Dazu werden jeweils 200  $\mu$ l Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA, 0.1% LiDS) zupipettiert, mit der Pipette vorsichtig gemischt, 5 Minuten bei Raumtemperatur separiert und der Überstand verworfen. Anschließend wird erneut zweimal gewaschen nach dem selben Vorgehen wie gerade eben nur unter Verwendung von 200  $\mu$ l Puffer B (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA). Bei dem letzten Waschschnitt wird der Überstand möglichst vollständig entfernt. Um die gebundene mRNS nun zu isolieren werden 14  $\mu$ l Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5) zupipettiert und die Dynabeads resuspensiert. Das Eppendorf-Cup wird mit Parafilm verschlossen und für 2 Minuten bei  $65^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Bei dieser Temperatur erfolgt die Ablösung des poly-A Schwanzes der mRNS von den *oligo – dT's* der Dynabeads. Durch 2minütige magnetische Separation werden die Dynabeads separiert. Der Überstand enthält die mRNS und wird im Folgenden in ein eisgekühltes 0.5 ml

Eppendorf-Cup abpipettiert.  $2 \mu l$  der Lösung werden in ein separates Cup überführt, falls später weitere Untersuchungen folgen sollten.

### 2.1.3 Reverse Transkription der mRNS in cDNS

Die nun gewonnene mRNS muß, bevor man sie in einer PCR einsetzen kann, in cDNS umschrieben werden. Für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -cDNS wurden jeweils die  $12 \mu l$  (siehe oben) und das Superscript Präampflifikationssystem der Firma Gibco BRL Life Technologies verwendet. Für die Umschreibung wird eine reverse Transkriptase benötigt, die ursprünglich aus verschiedenen Retroviren isoliert werden konnte. Die in diesem Reaktionskit verwendete Transkriptase ist eine genetisch veränderte Variante des Moloney murine leukemia Virus. Dieses Enzym benötigt als Initiationsstelle einen doppelsträngigen Ribonukleinsäurebereich. Dieser Bereich wird durch die Hybridisierung mit Oligonukleotiden, sogenannten Primern, erzeugt. Verwendet wurden für die verschiedenen mRNS jeweils Random Hexamer Primer. Er besteht aus einer Mischung von Oligonukleotiden mit jeweils 6 Basen, wobei alle möglichen Basenabfolgen als Oligonukleotide in dieser Mischung enthalten sind. Statistisch findet sich alle 100 Basen eine Komplementarität zwischen Primer und verwandter mRNS. Diese Stellen dienen dann als Startpunkt für die reverse Transkription.

Versuchstechnisch wird mit dem Annealing, dem Anlagern der Hexamere, begonnen. Dazu werden  $12 \mu l$  des Eluats aus der mRNS-Separation mit  $1 \mu l$  random hexamer primer ( $0.5 \text{ ng}/\mu l$ ) versetzt und 10 Minuten bei  $70^\circ C$  in einem Wasserbad inkubiert. Hierdurch wird zunächst die komplementäre Basenpaarung zwischen mRNS-Molekülen aufgehoben. Danach wird das Cup für 1 Minute auf Eis gestellt und kurz bei  $4^\circ C$  bis  $14000U/min$  abzentrifugiert. Für die reverse Transkription pipettiert man nun folgende Substanzen zu:  $2 \mu l$  10x Synthesepuffer (20 mM Tris HCL pH 8.4, 50 mM KCl, 25 mg  $MgCl_2$ ),  $1 \mu l$  10 mM dNTP-Mix und  $2 \mu l$  0.1 M DTT. Nach erfolgtem Mischen und kurzzeitigem Abzentrifugieren erfolgt eine Inkubation bei  $25^\circ C$  für 5 Minuten. Danach werden  $1 \mu l$  Superscript II reverse Transkriptase ( $200 \text{ U}/\mu l$ ) zupipettiert, gemischt und erneut inkubiert, diesmal bei Raumtemperatur für 10 Minuten und anschließend bei  $42^\circ C$  für 50 Minuten. Während dieser Zeit erfolgt die Synthese der cDNS. Um den Vorgang zu beenden, wird das Cup bei  $70^\circ C$  für 15 Minuten inkubiert, da hierdurch die

reverse Transkriptase inaktiviert wird. Es folgt eine 1minütige Lagerung auf Eis und anschließende Abzentrifugation bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 30 Sekunden bei 14000 U/min. Da nur die cDNS von Interesse ist wird die mRNS in dem Hybriddoppelstrang aus mRNS/DNS mittels Zugabe von  $1\mu\text{l}$  RNAse H und Inkubation über 20 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  abgebaut. Für die Umschreibung der SERCA-, PLB-, kardialen Calsequestrin- mRNS und der mRNS der Untereinheiten des Calciumkanals wurde die gewonnenen  $12\ \mu\text{l}$  mRNS aufgetrennt in 2 und  $10\ \mu\text{l}$  Portionen und jeweils separat mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma MBI Fermentas revers transkriptiert.

## 2.2 Kompetitive PCR

Voraussetzung zur Durchführung der kompetitiven PCR ist die Auswahl der Primer für die jeweiligen untersuchten mRNS-Genprodukte und die Erzeugung je eines Kompetitorfragments. Die Beschreibung dieser Arbeitsschritte ist der Beschreibung der Durchführung der kompetitiven PCR nachgestellt, um eine durchgehende Beschreibung der Arbeitstechniken von der Biopsie bis zur kompetitiven PCR zu gewährleisten.

### 2.2.1 Grundprinzip der kompetitiven PCR

Entwickelt wurde die Polymerase chain reaction (PCR) von Murphy, sie dient der Amplifikation von DNS. Der große Vorteil der PCR liegt in der Tatsache begründet, dass theoretisch ein einziges DNS Molekül ausreicht, um davon eine große Kopienanzahl herzustellen (bis zu  $10^7$ -Kopien bei 30 Zyklen), wodurch ein Nachweis geführt werden konnte. Um ein bestimmtes Zielfragment zu amplifizieren werden Oligonukleotidprimer, ein Puffer, dNTPs und die thermostabile DNS-Polymerase benötigt. Die beiden Oligonukleotidprimer wählt man üblicherweise so, dass sie komplementär zum sense und antisense der gesuchten Zielsequenz sind. Diese Primer bilden dann in der komplementären Sequenz der DNS kurze Doppelstrang-DNS Sequenzen, von denen ausgehend die Amplifikation in der Polymerase erfolgt. Zu beachten ist lediglich, dass sie für die gewählte Konfiguration nicht weiter als etwa 1 kbp auseinanderliegen sollten. Nach dem Annealing der Primer an die DNS wird das Gemisch auf  $72^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Bei dieser

Temperatur erfolgt die DNS-Synthese an der zugrundeliegenden DNS. Durch weiteres Erhitzen auf 94°C wird der Doppelstrang getrennt und dann können im nächsten Zyklus wieder Primer an die separierten DNS-Stränge binden (Denaturierungsschritt). Ziel der kompetitiven PCR ist die quantitative Bestimmung eines Zielfragments, im Falle dieser Arbeit der in einer Biopsie vorhandenen revers transkribierten mRNS (=cDNS)-Menge der  $\alpha_{1c}$ ,  $\beta$ , SERCA 2a, PLB und des kardialen Calsequestrins. Wie in [41] beschrieben, besteht die kompetitive PCR in der konkurrierenden Amplifikation einer bekannten Menge Kompetitorfragment mit einer unbekannten Menge Zielfragment. Die Kompetitorfragmente sind bis auf eine erzeugte Deletion im Bereich zwischen den Bindungstellen der beiden Primer identisch mit den Zielfragmenten. Bei identischen Oligonukleotidbindungsstellen binden die Primer mit der gleichen Kinetik an die komplementären Sequenzabschnitte der Zielfragmente und der Kompetitorfragmente. Dies ist erforderlich angesichts der exponentiellen Amplifikationskinetik der PCR-Reaktion: schon geringe Unterschiede der Bindungskinetik der Primer an Zielfragment und Kompetitorfragment könnten eine asymmetrische Amplifikation der beiden Fragmente bewirken. Durch die sonst identische Nukleotidzusammensetzung ist die Prozessivität der Taq-Polymerase in den sequenzidentischen Abschnitten unverändert. Die Amplifikation der beiden cDNS-Fragmente ist bei identischer Bindungskinetik und Prozessivität somit allein von der Größe der erzeugten Deletion abhängig. Da die Prozessivität der verwendeten Taq-Polymerase etwa 1000 Nukleotide/Sekunde beträgt, die amplifizierten Fragmente jedoch deutlich kleiner sind, kann ein lineares Amplifikationsverhältnis zwischen Zielfragment und Kompetitorfragment angenommen werden. Zur Expressionsanalyse werden vier gleiche Anteile der in cDNS revers transkribierten mRNS einer Biopsie mit steigenden Konzentrationen des jeweiligen Kompetitorfragments koamplifiziert. Durch die unterschiedlichen Massen der beiden Fragmente können sie im Anschluß an die kompetitive PCR geelektrophoretisch getrennt, durch interkalierende Farbstoffe markiert, über Videokamera gescannt und densiometrisch ausgewertet werden [102].

Verschiedene Oligonukleotidprimerpaare und verschiedene Kompetitor-/Zielfragment-Paare wurden untersucht, verwendet wurde für jede untersuchte mRNS die Kombination mit der geringsten unspezifischen Amplifikation und der geringsten Heteroduplexbildungsraten [73]. Das Verhältnis Kompetitor- zu Zielfragment war so abgestimmt, dass

die Amplifikation beider Produkte im linearen Amplifikationsbereich der PCR erfolgte. Die Berechnung der Anzahl der in einer Biopsie enthaltenen mRNS-Moleküle, welche das Zielfragment kodierten, erfolgte unter Berücksichtigung der Effizienz der reversen Transkription (40%) [6] und der unterschiedlichen Amplifikationsrate, welche sich aus dem Verhältnis zwischen Zielfragment- und Kompetitorfragmentlänge ergab [57]. Diese Faktoren betragen für die reverse Transkription 2.5 (entsprechend der 40%igen Effizienz der reversen Transkription), für  $\alpha_{1c}$  beträgt der korrigierende Faktor für die Fragmentlängendifferenz 1.27, für die  $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit 1.16, für die  $\beta$ -Untereinheit 2.46, für die SERCA 2a 1.60 und für das PLB 1.38.

Die Deletion zur Erzeugung der Kompetitorfragmente wurde erreicht durch die Verwendung von Linker-Primern. Auf den genauen Vorgang wird weiter unten eingegangen.

### 2.2.2 Versuchsaufbau und -durchführung

Die versuchstechnische Durchführung der kompetitiven RT (reverse transcript)-PCR erfolgte stets unter einer Laminarflow, die sich aus Gründen der Vermeidung von Kontaminationen in einem getrennten Raum befand. Da in der Zelle die Anzahl der mRNS-Kopien für SERCA und PLB sehr hoch ist, wurden für die quantitativen Messungen dieser Moleküle nur  $2 \mu\text{l}$  der cDNS eingesetzt. Jede PCR-Messung umfaßte das Pipettieren von 4 Reaktionsgefäßen mit cDNS des Proteins, das es zu untersuchen galt, und jeweils aufsteigender Anzahl an Kompetitorfragmenten. Ein weiteres Reaktionsgefäß, in das alle Substanzen bis auf die cDNS einpipettiert wurden, diente als Kontrolle. Im Folgenden ist beispielhaft die Pipettievorschrift für das Phospholamban abgebildet.

	1	2	3	4	Kontrolle
$H_2O_{PCR}$	29	29	29	29	40
10x $PCR_{mix}$	7	7	7	7	7
10 mM dNTP	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Pl 1	1	1	1	1	1
Pl 2	1	1	1	1	1
cDNS	1	1	1	1	—
Phospholamban interner Standard					
$10^3$	10	—	—	—	—
$10^4$	—	10	—	—	—
$10^5$	—	—	10	—	—
$10^6$	—	—	—	10	—
Taq Poly (5 U/ $\mu l$ )	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
gesamt	50	50	50	50	50
PCR Programm Nummer 15					

Tabelle 1: Schema für das Phospholamban

Die Pipettievolumina sind in  $\mu l$  angegeben. Alle Primer haben eine Konzentration von 10 pM. Der  $PCR_{mix}$  ist ein Gemisch aus 50 mM  $MgCl_2$  (Fa Gibco Life Technologies) und PCR-Buffer x10 (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl; Fa Gibco Life Technologies) im Verhältnis 1:6. Die Taq Polymerase hat ihr Temperaturoptimum bei 72°C, wobei kurzfristig Temperaturen bis zu 95°C ohne Aktivitätsverlust toleriert werden. Als Cycler wurde der Omnidene Temperature Cyler der Firma Hybaid verwendet.

Nach dem Zusammenpipettieren der Reaktionsansätze wird das Gemisch mit zwei Tropfen Mineralöl überlagert, um eine Verdunstung der Flüssigkeit bei den hohen PCR-Temperaturen zu verhindern. Nach Beendigung des PCR-Programms wird die Mineralölschicht vorsichtig abpipettiert. Reste des Mineralöls werden durch zweimalige Chloroformextraktion entfernt: nach Zugabe von 100  $\mu l$  Chloroform wird das Eppendorf-Cup für etwa 30 Sekunden gerüttelt; anschließend für 5 Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgehoben. Die DNS wird präzipitiert mit 100% Ethanol ( $-20^\circ C$ ; Volumen: 2.5-faches des Ausgangsvolumens zuzüglich des zugesetzten NaCl-Volumens) und 5 M NaCl (0.1fache Menge des Inhaltes). Das Salz

dient der Fällung der DNS. Nach erfolgter Zugabe wird das Cup für 15 Minuten bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert, und im Anschluß 15 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 14000 U/min zentrifugiert und dekantiert. Um das Salz zu entfernen werden  $750 \mu\text{l}$  70% Ethanol zupipettiert, für 5 Minuten erneut zentrifugiert ( $4^{\circ}\text{C}$ , 14000 U/min) und der Überstand wieder dekantiert. Die Eppendorfcups werden in der Vakuumzentrifuge getrocknet und die getrockneten Pellets mit  $12 \mu\text{l}$  1x Dye (50 mg Bromphenolblau, 20 ml  $H_2O_{DEPC}$ , 25 ml Glycerol, 5 ml 0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) resuspensiert. Die beiden gelösten Ansätze werden zusammen mit einem Marker auf ein 6%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und nach dem Gellauf mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid gefärbt. Auf dem UV-Tisch ( $\lambda = 312 \text{ nm}$ ) erfolgt die Auswertung des Gels.

## 2.3 Herstellung der Kompetitorfragmente

Es folgt die Beschreibung der Herstellung und Amplifikation der Kompetitorfragmente. Die Primer und Linkerprimer, die bei der nachfolgend beschriebenen PCR eingesetzt werden, werden im Ergebnisteil erläutert.

### 2.3.1 PCR-Klonierung

Die Durchführung der PCR gleicht bis auf einige Einzelheiten der Beschreibung bei der kompetitiven PCR. Die benutzten Arbeitshilfen werden in diesem Fall allerdings mit einer 0.07 mM Na-Hypochlorit-Lösung von möglicherweise vorhandener DNS gereinigt. Der  $PCR_{mix}$ , der dNTP-Mix und die Taq-Polymerase sind dieselben wie bei der kompetitiven PCR. Ein zweiter Reaktionsansatz, allerdings ohne cDNS, dient der Kontrolle von Verunreinigungen der aliquotierten PCR-Grundsubstanzen (Mix,  $dNTP's$ , Taq-Polymerase,  $H_2O_{PCR}$ ). Im Anschluß an die DNS-Synthese im PCR-Cycler werden dieselben Arbeitsschritte wie bei der quantitativen PCR (siehe oben) vollzogen. Auf dem UV-Tisch ( $\lambda = 312 \text{ nm}$ ) wird die Länge des amplifizierten Stücks überprüft und das Gelstück mit der Bande, die die gewünschte DNS enthält, mit Hilfe eines Scalpells ausgeschnitten.

### 2.3.2 Elektroelution

Nun müssen die DNS-Fragmente durch Elektroelution aus dem ausgeschnittenem Gelstück präpariert werden. Das Gelstück wird in einen auf einer Seite mit einer Plastikklammer verschlossenen Dialyseschlauch (etwa 3x5 cm) überführt und 300  $\mu\text{l}$  1x TBE-Puffer (0.1 M HCl-Borat, 20 mM EDTA pH 8) zupipettiert. Der Dialyseschlauch wird luftblasenfrei ausgestrichen und die offene Seite zugeklammert. Den Dialyseschlauch legt man in eine Elektroelutionskammer aus Plexiglas (10 x 10 cm, Höhe 5 cm) und füllt die Kammer mit 1x TBE-Puffer, so dass der Dialyseschlauch vollständig von Flüssigkeit bedeckt ist. Die Elektroelutionskammer wird in eine Edelstahlwanne überführt, die mit Eis gefüllt ist, um eine Überwärmung des 1x TBE-Puffers während des Versuchs zu vermeiden. An die in der Elektroelutionskammer auf zwei gegenüberliegenden Seiten in 2 mm Höhe gespannten Drähte werden mittels einer Stromquelle 141 mA Strom appliziert. Durch die negative Gesamtladung der DNS wandert diese in Richtung Anode.

Nach 1.5 Stunden kontrolliert man die Elution der DNS auf einem UV-Tisch. Die 300  $\mu\text{l}$  Dialysatflüssigkeit wird in ein Eppendorfgefäß pipettiert und der Dialyseschlauch mit 100  $\mu\text{l}$  1x TBE gespült. Die Spülflüssigkeit überführt man ebenfalls in das Eppendorfgefäß. Um eventuell mitgeführte Gelstücke abzutrennen folgt eine 5minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur bei 14000 U/min. Der Überstand wird in ein neues Eppendorfcup pipettiert und das Volumen bestimmt. Es folgt eine Standardpräzipitation mit 2.5 v/v 100% Ethanol und 0.1 v/v 5 M NaCl (Beschreibung siehe oben). Nach erfolgtem Waschschnitt und Trocknen in der Speedvac folgt als letzter Arbeitsschritt die Aufnahme des Pellets mit  $H_2O_{DNS}$  zu einer Konzentration von 100  $f\text{M}/\mu\text{l}$ . Die Lagerung bis zur Weiterverarbeitung erfolgt bei  $-20^\circ\text{C}$ .

### 2.3.3 Klonierung

Die Klonierung der Amplifikationsprodukte erfolgte in die pT-Advantage Vektoren der Firma Clontech. Diese Methode macht sich die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase zunutze, wodurch an den Enden ein Adenosinrest verbleibt. Dies erlaubt die Klonierung in Plasmidvektoren, welche an den geöffneten Enden ein überhängendes T- haben.

Die Klonierung eines DNS-Fragments in Plasmidvektoren dient der Amplifikation des Stückes in größerer Anzahl als dies in einer PCR-Synthese der Fall ist. Die PCR-Fragmente werden mit der T4-DNS-Ligase wie in Clontech Protokoll beschrieben in den pT Advantage Vektor ligiert.

Der neu ligierte Vektor muß nun in Bakterienzellen zur Vermehrung eingebracht werden. Hierzu dienen die Eqicurian Coli XL1-Blue MRF kompetenten Zellen (Fa. Stratagene), die nach einem modifizierten Protokoll von Hanahan et al. [34] für die Aufnahme von DNS-Plasmiden vorbereitet wurden. Die Aufbewahrung von Aliquots von  $150 \mu l$  erfolgt bei  $-80^{\circ}C$ . Einer dieser Ansätze wird mit  $15 \mu l$  10x CM Puffer ( $100 \text{ mM } CaCl_2 \times 2H_2O$ ,  $400 \text{ mM } MgCl_2 \times 6H_2O$ ) und  $115 \mu l H_2O_{DNS}$  versetzt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Es folgen folgende Inkubationsschritte: 12 Minuten auf Eis, 4 Minuten bei  $25^{\circ}C$ , 6 Minuten auf Eis und 10 Minuten bei  $25^{\circ}C$ . Nach Zugabe von  $1500 \mu l$  LB-Nährmedium überführt man das Gesamtvolumen in ein steriles 10 ml Röhrchen und inkubiert anschließend für 60 Minuten bei  $37^{\circ}C$  und 125 U/min in einem Rütteltisch (Fa. B. Braun Biotech International).  $150 \mu l$  der Suspension werden auf Agarplatten (mit Ampicillin Zusatz) ausplattiert, der Rest des Volumens für 10 Minuten bei Raumtemperatur und 3500 U/min zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes löst man das Pellet in  $150 \mu l$  LB-Medium unter langsamem Rütteln auf dem Tischrüttler wieder. Die nun im Vergleich zur ersten Ausplattierung ca. 10x höher konzentrierte Suspension plattiert man auf einer zweiten Agarplatte aus. Beide Platten werden im Brutschrank (Fa. Memmert) bei  $37^{\circ}C$  über Nacht inkubiert.

Der verwendete Vektor enthält das Resistenzgen für Ampicillin, weswegen nur diejenigen Bakterien wachsen, die erfolgreich transformiert wurden. Es folgt am nächsten Morgen das Auszählen der Bakterienkolonien. Wurden die Platten nicht sofort für den nächsten Versuch weiterverwendet, erfolgte die Lagerung im Kühlraum bei  $4^{\circ}C$ .

### 2.3.4 Präparation mit Minipräp/Midipräp

Die DNS-Minipräparation und die DNS-Midipräparation beinhalten die Vermehrung der Bakterien und die anschließende Isolierung der DNS aus den gewachsenen Kolonien. Die beiden Versuche unterscheiden sich in der Menge der gewonnenen DNS. Sie liegt für die Minipräparation bei  $10 - 20 \mu\text{g}$  DNS pro Ansatz und für die Midipräparation bei bis zu  $1000 \mu\text{g}$  DNS. Versuchstechnisch wird mit der Minipräparation begonnen, da diese eine Verarbeitung von 12 Kolonien gleichzeitig erlaubt und so die Wahrscheinlichkeit größer ist, die Kolonie, die das Zielfragment beinhaltet, mitpräpariert zu haben. Nur die positive Kolonie wird dann noch im Versuch der Midipräparation weiterverarbeitet. Der Identifizierung der präparierten DNS dienen Versuche mit Restriktionsendonukleasen am Ende der beiden Präparationen.

Die DNS-Minipräparation beginnt mit dem Beimpfen mittels autoklavierten Zahnstochern von 12 Reagenzgläsern, die jeweils 7 ml autoklaviertes LB-Nährmedium (10g Bacto Trypton, 5 g Bacto Yeast, 5 g NaCl, 1 g Glucose, 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demineralisiert}}$ ) und 14  $\mu\text{l}$  Ampicillin ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) enthalten, mit jeweils unterschiedlichen Kolonien der im letzten Versuch erzeugten Agarplatte. Die Röhrchen werden für etwa 16 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  und 225 U/min auf dem Rütteltisch inkubiert. Danach beimpft man wiederum ampicillinhaltige Agarplatten mit je einem Tropfen der Kolonien, inkubiert dann bei  $37^\circ\text{C}$  für mindestens 8 Stunden im Brutschrank und lagert die Platten bei  $4^\circ\text{C}$  im Kühlraum und hat so jederzeit die Möglichkeit der Wiederholung des Versuches. Nach der Vermehrung der Bakterien fährt man mit der Überführung der Mediumflüssigkeit in sterile 10 ml Plastikrörchen fort. Die Röhrchen werden für 10 Minuten bei 3500 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand dekantiert, die Bakterienpellets mit 100  $\mu\text{l}$  GET-Puffer (50 mM Glucose, 10 mM EDTA pH 8.25, 25 mM TrisHCl pH 8) unter vorsichtigem Rütteln resuspendiert und die Suspension in sterile Eppendorfcups pipettiert. Zur Lyse der Bakterien werden nach 5minütiger Inkubation bei  $25^\circ\text{C}$  200  $\mu\text{l}$  einer frisch hergestellten Mischung aus 2 N NaOH mit 1%iger SDS-Lösung hinzugegeben (zur Lyse der Bakterienwände), der Ständer mit den Eppendorfcups etwa 5 mal geschwenkt und die Cups für 5 Minuten auf Eis gelagert.

Die Ausfällung der Gesamt-DNS geschieht mit 150  $\mu\text{l}$  eisgekühlter 3 M Kaliumacetatlösung (KOAc) und anschließendem starken Rütteln auf einem Tischrüttler für 10

Sekunden. Nach einer erneuten Lagerung für 5 Minuten auf Eis schließt sich eine 10minütige Zentrifugation bei  $4^{\circ}C$  und 14000 U/min zum Abtrennen der Zellreste an. Die nicht chromosomal DNS/RNS verbleibt aufgrund ihres geringen Molekulargewichtes in dem Überstand. Dieser wird in ein neues autoklaviertes Eppendorfcup überführt und erneut für 5 Minuten bei  $4^{\circ}C$  und 14000 U/min zentrifugiert, um eventuell noch vorhandene Zelltrümmer zu entfernen. Zu dem in ein neues Cup überführten Überstand gibt man zum Verdau der RNS 5  $\mu l$  RNase A und inkubiert für 30 Minuten bei  $37^{\circ}C$  in einem Wasserbad. Im Anschluß werden eventuell noch vorhandene Proteine und Lipide und die RNase mittels einer Phenol/Chloroform- (P/C = 1:1) und Chloroformextraktion entfernt. Die Präzipitation der DNS mit 2.5 fachem Volumen an eisgekühltem 100% Ethanol erfolgt durch 20minütige Lagerung bei  $-80^{\circ}C$ . Um die ausgefällte DNS zu isolieren, zentrifugiert man für 10 Minuten bei  $4^{\circ}C$  und 14000 U/min und dekantiert den Überstand. Der nun folgende Waschschritt umfaßt die Zugabe von 750  $\mu l$  75% eisgekühltem Ethanol, 5minütige Zentrifugation bei  $4^{\circ}C$  und 14000 U/min und das Dekantieren des Überstands. Die in einer Speedvac getrockneten Pellets werden in 18.8  $\mu l H_2O_{DNS}$  gelöst.

Um zu kontrollieren, ob das Zielfragment in der DNS-Gesamtmenge enthalten ist, werden 2  $\mu l$  der hergestellten DNS-Lösung mit Restriktionsenzymen und entsprechenden Puffern versetzt und inkubiert. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme müssen sinnvollerweise bekannt sein und sollten zum Teil innerhalb der Zielfragmente liegen. So können die angesetzten Cuts nach erfolgter Färbung und gelelektrischer Trennung mit Hilfe eines Markers auf das Vorhandensein des Zielfragments überprüft werden. Für die Herstellung großer Mengen der Kompetitorfragmente wurde in dieser Arbeit das Midi-Prep Kit der Firma Qiagen verwendet. Der Versuch beginnt mit dem Beimpfen der Flüssigkeit von zwei Reagenzgläsern, die je 7 ml LB-Flüssignährmedium mit 14  $\mu l$  Ampicillin (50  $\mu g/ml$ ) enthalten mit einer der Bakterienkolonien, die bei der Minipräparation den gesuchten Zellklon enthielten. Die beimpften Medien werden bei  $37^{\circ}C$  und 225 U/min für 16 Stunden auf dem Rütteltisch präinkubiert. Anschließend überführt man den Inhalt der Reagenzgläser in einen 500ml Erlenmeyerkolben, der zuvor mit 500 ml LB-Nährmedium und 1 ml Ampicillin (50  $\mu g/ml$ ) gefüllt wurde, und inkubiert den Gesamtansatz weiter bei  $37^{\circ}C$  und 225 U/min. Man fährt mit dem Versuch fort, wenn der Ansatz bei 600 nm eine optische Dichte  $OD_{600nm}$  von 1 bis 1.5

aufweist, was einer Konzentration von etwa  $10^9$  Zellen/ml entspricht. Die Bakteriensuspension teilt man im Anschluß in zwei autoklavierte Zentrifugationsflaschen für einen SS20 Rotor einer Sorvall-Zentrifuge. Nach einer Zentrifugation für 15 Minuten bei  $4^\circ C$  und 6000 U/min entsteht ein Bakterienpellet am Boden des Gefäßes. Der Überstand wird dekantiert und das Pellet auf Eis in 10 ml P1-Puffer (100  $\mu g/ml$  RNase A, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA pH 8.0) resuspendiert. Die nun höher konzentrierte Bakteriensuspension teilt man in zwei TI-60 Ultrazentrifugationsröhren auf, gibt je 5 ml P2-Lysis-Puffer (200 mM NaOH, 1% SDS) zu und vermischt durch anschließendes 5maliges top-bottom Drehen. Nach 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur sind die Zellen lysiert. Die DNS wird ausgefällt durch Zugabe von je 5 ml P3 Neutralisationspuffer (3 M KOAc pH 5.5), 5maliges Drehen der Röhren und 20minütiger Lagerung auf Eis. Nachdem die Röhren austariert wurden, zentrifugiert man sie für 30 Minuten bei  $4^\circ C$  und 35000 U/min. Den Überstand aus der Zentrifugation gibt man über eine Qiagen Midiprep Säule, die zuvor mit 10 ml Equibrierungspuffer (750 mM NaCl, 50 mM Morphilino-propan-sulfonsäure=MOPS, 15% Ethanol pH 7.0 0.15% Triton X-100) equibriert wurde. Die im Überstand enthaltene DNS bindet an Bestandteile in der Säule und wird im Folgenden mit insgesamt 60 ml QC-Puffer (1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol pH 8.5) gewaschen und mit 15 ml QF-Puffer (1.25 M NaCl, 50 mM Tris HCl, 15% Ethanol pH 8.5) eluiert, wobei die Elutionsflüssigkeit in einem sterilen 30 ml Corex-Röhren aufgefangen wird. Anschließend präzipitiert man die Gesamt-DNS durch Zugabe von 10.5 ml Isopropanol 100% (ca. 0.7 V./V.) und Lagerung bei  $4^\circ C$  über Nacht. Die ausgefällte DNS wird in der Sorvallzentrifuge in einem SS34 Rotor bei  $4^\circ C$  und 11000 U/min für 30 Minuten abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet durch Zugabe von 15 ml eiskühltem 70% Ethanol und Zentrifugation bei  $4^\circ C$  und 11000 U/min für weitere 5 Minuten gereinigt. Das Trocknen des DNS-Pellets erfolgt bei Raumtemperatur nach dem man den Überstand dekantiert hat. Die DNS löst man in 500  $\mu l$  1xTE Puffer.

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgt im Photometer. Die Absorption wird bei zwei verschiedenen Verdünnungsstufen 1 : 15 und 1 : 25 bei  $\lambda = 260 nm$  und  $\lambda = 280 nm$  gemessen. Eine  $OD_{260 nm}$  von 1 entspricht einer DNS-Konzentration von 50  $\mu g/ml$ . Der Quotient  $\frac{OD_{280 nm}}{OD_{260 nm}}$  gibt den Reinheitsgrad der DNS wieder und sollte  $\geq 1.8$  sein, was in den durchgeföhrten Versuchen stets der Fall war. Schließlich wird

noch ein Kontrollcut mit demselben Restriktionenzymen wie bei der Minipräparation durchgeführt, um sicherzugehen, dass die richtige Kolonie ausgewählt wurde. Die Lagerung der restlichen DNS-Lösung bis zur weiteren Verarbeitung erfolgt bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3.5 Sequenzierung zur Kontrolle der Kompetitorfragmente

Um zu überprüfen, ob die Kompetitorfragmente korrekt hergestellt und kloniert wurden, wurde die Nukleotidsequenz auf beiden Strängen mit der Dideoxy-Methode nach Sanger [77] in Form der Plasmidsequenzierung sequenziert. Die zu sequenzierenden cDNS-Fragmente sind in die Multiple Cloning Site von Plasmidvektoren, z.B. pUC 18, subkloniert (siehe oben). Durch Alkalizugabe denaturiert man zunächst die doppelsträngige Plasmid-DNS. Die 5' - und 3'-Enden der Multiple Cloning Site enthalten Bindungstellen für Standard-Oligonukleotidprimer komplementärer Sequenz, im Falle von pUC 18 z.B. *pUC<sub>forward</sub>* und *pUC<sub>reverse</sub>*. Durch Erhitzen der Einzelstränge der Plasmid-DNS zusammen mit den Primern auf  $65^{\circ}\text{C}$  und stufenweises Abkühlen auf  $25^{\circ}\text{C}$  kommt es in einer spezifischen Hybridisierungsreaktion zur Ausbildung von doppelsträngigen Bereichen zwischen den Primern und komplementären DNS-Sequenzabschnitten. Diese Bereiche dienen als Startpunkt der Synthese eines radioaktiv markierten cDNS-Strangs durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase.

Die Sequenzierung wird in vier Reaktionsansätzen durchgeführt: In jedem Ansatz ist ein radioaktiv markiertes Nukleotid ( $\alpha^{35}\text{S} - \text{dATP}$ ) und die vier Deoxy-Nukleotide dATP, dTTP, dGTP und dCTP ( $\equiv \text{dNTP}'s \equiv 2'$ -Deoxy-Nukleosid-5'-Trisphosphate) enthalten. Im Verhältnis 1 : 10 ist in jedem Reaktionsansatz jeweils ein Nukleotid der vier künstlich erzeugten Dideoxy-Nukleotide ( $\equiv \text{ddNTP}'s \equiv 2',3'$ -Didesoxy-Nukleosid-5' -Trisphosphate) vorhanden. Durch Einbau eines *ddNTP'*s in den wachsenden DNS-Strang durch die T7-DNA-Polymerase kommt es zum Abbruch des Strangs, da die 3' -Hydroxygruppe des Ribosylrestes zur Kettenverlängerung fehlt. Die DNS-Fragmente können geelektrophoretisch getrennt werden, da der Kettenabbruch mit statistischer Verteilung an jeder Einbaustelle erfolgt und so in jedem nukleotidspezifischen Ansatz eine Population unterschiedlich langer DNS-Fragmente entsteht.

## Sequenzierungsprotokoll

Die DNS-Sequenzierung wurde mit dem Sequenase<sup>®</sup> Version 2.0 DNA-Sequenzierungs-Kit der Firma USB/Amersham durchgeführt. Dieser Kit enthält folgende Bestandteile:

- 5x Sequenase Puffer (200 mM Tris HCl pH 7.5, 100 mM  $MgCl_2$ , 250 mM NaCl)
- 0.1 M Dithiothreitol-Lösung
- 5x dGTP-Labeling Mix (7.5  $\mu M$  dGTP, 7.5  $\mu M$  dCTP, 7.5  $\mu M$  dTTP)
- ddG Termination Mix (80  $\mu M$  dGTP, 80  $\mu M$  dATP, 80  $\mu M$  dCTP, 80  $\mu M$  dTTP, 8  $\mu M$  ddGTP, 50 mM NaCl)
- ddA Termination Mix (80  $\mu M$  dGTP, 80  $\mu M$  dATP, 80  $\mu M$  dCTP, 80  $\mu M$  dTTP, 8  $\mu M$  ddATP, 50 mM NaCl)
- ddT Termination Mix (80  $\mu M$  dGTP, 80  $\mu M$  dATP, 80  $\mu M$  dCTP, 80  $\mu M$  dTTP, 8  $\mu M$  ddTTP, 50 mM NaCl)
- ddC Termination Mix (80  $\mu M$  dGTP, 80  $\mu M$  dATP, 80  $\mu M$  dCTP, 80  $\mu M$  dTTP, 8  $\mu M$  ddCTP, 50 mM NaCl)
- Stop Solution (95% Formamid, 20 mM EDTA, 0.05% Bromphenolblau, 0.05% Xylencyanol FF)
- Sequenase<sup>®</sup> Version 2.0 T7 DNA-Polymerase

Außerdem benötigt werden  $^{35}S - \alpha - dATP$  (Fa. Dupont),  $H_2O_{DNS}$  (autoklaviert bei 121°C für 15 Minuten) und 1xTE Puffer pH 7.4 (10 mM Tris HCl pH 7.4, 1 mM EDTA pH 8.0) zur Verdünnung der Sequenase<sup>®</sup>. Die Standard-Oligonukleotidprimer haben eine Konzentration von 5 pmol/ $\mu l$  und wurden nach den Sequenzen der Polyclonierungstellen der Plasmidvektoren gewählt: für pUC18 die Primer *pUC<sub>forward</sub>* und *pUC<sub>reverse</sub>* und für den Vektor pSP72 die Primer *T7* und *SP6*.

Der erste Schritt umfaßt die Herstellung gereinigter, alkalidenaturierter, einzelsträngiger DNS-Fragmente, der template-DNS. Die Reinigung wird in Form einer Präzipitation mit Polyethylenglykol vollzogen. Dazu versetzt man 16.8  $\mu l$  DNS-Lösung mit 3.2  $\mu l$  NaCl-Lösung und 20  $\mu l$  13%iger PEG-8000-Lösung, vermischt durch Auf- und

Abpipettieren und lagert den Ansatz für eine Stunde auf Eis. Die präzipitierte DNS trennt man anschließend durch 10minütige Zentrifugation bei  $4^{\circ}C$  und 14000 U/min ab (Eppendorf Tischzentrifuge R14), nimmt den Überstand vorsichtig ab und wäscht das DNS-Pellet mit  $750 \mu l$  70%Ethanol ( $-20^{\circ}C$ ). Nach weiteren 5 Minuten Zentrifugation und Dekantieren des Überstandes wird das Pellet in der Speedvac getrocknet und in  $20 \mu l H_2O_{DNS}$  aufgenommen.

Ein Aufteilen in jeweils  $10 \mu l$  Aliquots ermöglicht ein getrenntes Sequenzieren der kodierenden und nichtkodierenden Sequenz. Durch Zugabe von je  $50 \mu l$  0.4 N NaOH und  $10 \mu l H_2O_{DNS}$  werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den zwei DNS-Strängen gelöst und die DNS liegt einzelsträngig vor. Den Ansatz inkubiert man für fünf Minuten im Kühlwasserbad bei  $25^{\circ}C$  und präzipitiert dann erneut. Dazu gibt man  $330 \mu l$  Ethanol<sub>100%</sub> und  $10 \mu l$  3 M NaOAc pH 5.07 zu, zentrifugiert für 15 Minuten bei  $4^{\circ}C$  und 14000 U/min und dekantiert den Überstand. Nach einem Waschschritt mit  $750 \mu l$  Ethanol 70% und Zentrifugation für fünf Minuten bei  $4^{\circ}C$  und 14000 U/min wird der Überstand erneut dekantiert und das Pellet in der Speedvac getrocknet. Das DNS-Pellet nimmt man in  $6 \mu l H_2O_{DNS}$  durch Rütteln sorgfältig auf. Pro Ansatz werden nun  $2 \mu l$  Sequenasepuffer und  $2 \mu l$  Primer (je nach Ansatz 5'- oder 3'-Primer) zugegeben.

Um eine Bildung von doppelsträngigen Bereichen zwischen Primern und komplementärer template-DNS zu erreichen erfolgen die Schritte des Annealings: Zuerst werden die Cups für zwei Minuten bei  $65^{\circ}C$  im Wasserbad inkubiert. Dann wird ein kleines Becherglas mit  $65^{\circ}C$  warmem Wasser gefüllt und die Cups darin für 25 Minuten belassen. Durch Wärmeaustausch mit der Umgebung sinkt die Temperatur des Wassers im Glas kontinuierlich. Mit der anschließenden Inkubation für fünf Minuten bei  $37^{\circ}C$  und für fünf Minuten bei  $25^{\circ}C$  wird der Annealingprozeß abgeschlossen.

Vor Beginn der Sequenzierungsreaktion werden die Cups für zwei bis drei Minuten auf Eis gestellt. Zu den Ansätzen der beiden Eppendorfcups pipettiert man je  $1 \mu l$  0.1 M Dithiothreitol,  $2 \mu l$  Labeling Mix (5x Labeling Mix 1:10 mit  $H_2O_{DNS}$  verdünnt),  $1 \mu l$   $^{35}S - \alpha - dATP$  und  $1.5 \mu l$  Sequenase<sup>®</sup> 2.0 (Stammlösung 1:6 mit 1xTE-Puffer pH 7.4 verdünnt) zu. Den Ansatz belässt man für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Bei der dabei ablaufenden DNS-Synthese kommt es zur Verlängerung des Doppelstranges in 3' Richtung und zum Einbau von  $^{35}S - \alpha - dATP$ . Während dieser Zeit werden

je 2.5  $\mu\text{l}$  Termination Mix G, A, T, C in separate Cups gegeben und die Aliquots für zwei bis drei Minuten bei 37°C vorgewärmt. Für den nun folgenden Kettenabbruchschritt werden je 3.5  $\mu\text{l}$  Sequenzierungsansatz zu den vorbereiteten Termination Mixes pipettiert. Nach 15minütiger Inkubation im Heizblock verhindert die Zugabe von 4  $\mu\text{l}$  Stop Solution die weitere DNS-Synthese. Die Cups überführt man anschließend sofort auf Eis.

Die DNS-Produkte werden durch vertikale Gelelektrophorese im Gelstand Pherovar® (Fa. Biotec Fischer) aufgetrennt. Die Apparatur besteht aus zwei 20x40 cm großen Glasplatten, die durch Plastikspacer auf 0.05 mm Abstand gehalten werden. Bis auf die Oberseite klebt man alle Ränder mit Klebeband (tesa pack) dicht ab. Das Sequenzierungsgel besteht aus 8 ml Sequagel-Konzentrat (25% Acrylamid/Bisacrylamid 19:1, 8.3 M Harnstoff), 28 ml Sequagel-Verdünner ( $H_2O_{deionisiert}$ , 8.3 M Harnstoff) und 4 ml Sequagel<sup>textregistered</sup>-Puffer (10xTBE-Puffer: 1 M Tris-Borat, 20 mM EDTA pH 8.3, 8.3 M Harnstoff) und die Polymerisation wird durch die Zugabe von 35  $\mu\text{l}$  TEMED ( $\equiv N, N, N', N'$ -Tetramethylethylendiamin) und 80  $\mu\text{l}$  APS (Ammoniumpersulfat 10%) induziert. Man gießt die Gelflüssigkeit kontinuierlich unter Vermeidung von Luftblasen zwischen die Glasplatten und ein in die Oberseite eingelegter und festgeklammerter planer Spacer erzeugt in dem auspolymerisierten Gel eine plane Oberfläche. Nach etwa einer Stunde ist eine vollständige Polymerisation erreicht. Der Spacer wird vorsichtig entnommen, die Klebebänder an den Seiten entfernt und das Gel vertikal im Gelstand mit Hilfe von Metallklammern fixiert. Am oberen und unteren Ende der Platten besteht direkter Kontakt zwischen dem Gel und den mit 1xTBE gefüllten Pufferreservoirs. Hierdurch stellt sich bei Stromapplikation auf die beiden Kammern ein kontinuierliches elektrisches Feld ein. Auf der Rückseite der Glasplatten wird eine Metallplatte mit Klammer befestigt um eine gleichmässige Wärmeverteilung in den Glasplatten zu erreichen und so den sog. Smile-Effekt zu minimieren. Von Oben schiebt man einen Kunststoffspacer (sog. Haifischkamm) mit den Zacken in Richtung Gel ein, so dass die Zacken etwa 1 mm in das Gel ragen. Zwischen den Zacken bilden sich so Taschen aus. Die Taschen spült man sorgfältig mit 1xTBE, bis sie frei von Gelresten sind. Vor dem Gelauftrag werden die Sequenzierungsprodukte für drei Minuten bei 90°C im Heizblock inkubiert, um sekundär aneinander gebundene DNS-Abschnitte voneinander zu trennen (dies würde die Form, Größe und damit die Laufeigenschaften der Moleküle

verändern). Nach drei Minuten Lagerung auf Eis wird kurz abzentrifugiert und nach nochmaliger Lagerung auf Eis für zwei Minuten werden die Sequenzierungsprodukte in der Reihenfolge G,A,T,C in separate Taschen pipettiert. Durch Anlegen einer Stromstärke von 25 W (entsprechend 1700 – 1800 V) erfolgt die gelelektrophoretische Trennung.

Um die Zahl der dargestellten Nukleotidbasen pro Versuch zu steigern, können zu einem späteren Zeitpunkt die vier Sequenzierungsprodukte in vier neue Taschen aufgetragen werden. Der Zeitpunkt für den zweiten Auftrag ist erreicht, wenn die Xylen-cyanolfront des Markers 70 – 80% der Laufstrecke erreicht hat. Wenn die dunkelblaue Bromphenolblaufront des zweiten Auftrags das Gel soeben verlässt, entnimmt man das Gel aus dem Gelstand und entfernt die Spacer auf den Seiten. Mit Hilfe eines dünnen Spatels hebt man nun die obere Glasplatte vorsichtig an, so dass das Gel auf der unteren Glasplatte zurückbleibt. Auf das Polyacrylamid/Harnstoff-Gel wird ein in passender Größe zugeschnittenes 3MM-Whatman Filterpapier aufgelegt und kurz festgedrückt. Das Filterpapier hebt man schonend von der Glasplatte ab, wobei darauf zu achten ist, dass das Gel auf dem Filterpapier verbleibt und sich von der unteren Platte löst. Das fertige Sequenziergegel wird für etwa zwei Stunden bei 80°C auf dem vorgeheizten Geltrockner getrocknet. Auf das Filterpapier wird im Anschluß eine Klarsichtfolie und darüber ein Röntgenfilm aufgelegt und das ganze in einer Röntgenkassette für 48 Stunden bei –80°C aufbewahrt. In dieser Zeit wird der Röntgenfilm belichtet. Nach dem Entwickeln in einem Standard-Röntgenfilmentwickler kann der Film ausgewertet werden. Dazu liest man die einzelnen Banden einfach in ihrer Reihenfolge von oben nach unten, wobei jede Bande für eine der vier Basen steht (je nach nachdem, in welchem der vier Aufträge die Bande sich befindet).

## 2.4 Messung und Berechnung der hämodynamischen Parameter

Zusätzlich zur Biopsieentnahme wurden im Rahmen des Herzkatheters verschiedene hämodynamische Parameter durch invasive Messung erhoben. Für die Messungen wurden über einen transfemoralen Zugang Pigtail-Kathetersysteme mit Statham-Druckabnehmer verwendet. Diese Systeme arbeiten nach folgendem Prinzip: Im Lumen des Pigtail-Katheters befindet sich eine Flüssigkeitssäule. Durch äußere Druckeinwirkung kommt es zur Kompression der luminalen Flüssigkeit: die entstehende Druckwelle wird im System übertragen. Ein Diaphragma oder ein Draht im Druckabnehmer wird proportional zum Druck, der auf den Katheter einwirkt, verformt und damit ein dem mechanischen Druck proportionales elektrisches Signal erzeugt und registriert [15].

### Druck- und Volumenmessungen im LV

Der Verlauf der Drücke in den verschiedenen Herzphasen wird im Cavum des linken Ventrikels verfolgt und registriert. Für die hier durchgeführten Untersuchungen ist der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) besonders wichtig, dessen Normwert 8 mmHg bei einem Referenzbereich von 5 – 13 mmHg beträgt [15].

### Auswurffraktion EF und Ventrikelvolumen

Bei jedem Patienten wurden das enddiastolische, endsystolische linksventrikuläre Volumen und die Auswurffraktion durch zweidimensionale Planimetrie in 30° RAO-Position (right-anterior-oblique) berechnet [84].

### Zeitkonstante des isovolumetrischen exponentiellen Druckabfalls $\tau$

Die druckunabhängige Zeitkonstante  $\tau$  der exponentiellen isovolumetrischen Relaxation beschreibt die Geschwindigkeit des exponentiellen Abfalls des linksventrikulären Drucks während der isovolumetrischen Relaxation. Die Quantifizierung des aus dem linksventrikulären Druck berechneten Parameters erfolgt entsprechend der Definition von Raff et al.: [70] Grundlage ist die Festlegung der diastolischen isovolämischen Re-

laxationsphase. Sie ist definiert als die Zeitspanne von der Messung des maximalen Druckwertes für die Registrierung von  $-dp/dt_{min}$  (= Startpunkt) bis zur Messung des höchsten Wertes für den linksventrikulären enddiastolischen Druck (LVEDP) plus 5 mmHg (= Endpunkt). Durch eine derartige Festlegung der Cut-offs werden falsch-positive Registrierungen von t-Veränderungen vermieden. Die Druckdaten werden in Abständen von 2 msec registriert und aus diesen Daten auf der Basis folgender Formel  $\tau$  berechnet:

$$\frac{dp}{dt} = -\frac{1}{\tau} * (p - p_B)$$

$p$  = registrierte Druckwerte

$t$  = Zeitpunkt t

$\tau$  = Zeitkonstante der isovolumetrischen Relaxation

$p_B$  = additiver Druckwert durch Schwankungen des Pleura- und/oder Perikarddrucks

$\frac{dp}{dt}$  ist demnach eine lineare Funktion von  $p$  mit der Steigung  $-\frac{1}{\tau}$  ohne Einfluß des Wertes von  $p_B$ .  $\tau$  kann folglich unter Verwendung der in der Phase des isovolämischen Druckabfalls registrierten Daten durch die Berechnung einer linearen Regression von  $\frac{dp}{dt}$  gegen  $p$  quantifiziert werden. Normalwerte für  $\tau$  liegen zwischen 37 und 67 msec.

## Statistische Verfahren

Die Berechnung der statistischen Werte erfolgte mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogramms. Aus den Rohdaten wurde der Mittelwert  $\pm$  S.D. berechnet.

Für die Analyse auf Unterschiede der gemessenen mRNS-Expressionen wird der Student-t-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Die Voraussetzung für die Anwendung dieser Form des t-Tests gelten die Normalverteilung der Daten und gleiche Varianz der Grundgesamtheiten. Die Überprüfung der Normalverteilung der Messwerte und die Varianzanalysen (analysis of variance ANOVA) wurden als einfaktorielle Varianzanalysen ebenfalls mit einem Tabellenkalkulationsprogramm durchgeführt. Für den t-Test wurden  $p$ -Werte  $\leq 0.05$  als statistisch signifikant akzeptiert. Berechnet wird die Prüfgröße  $t$  nach folgender Formel:

$$\frac{|\bar{d}|}{sd} = \frac{\text{Differenz der Mittelwerte}}{\text{mittlerer Fehler der durchschnittlichen Differenz}}$$

Der erhaltene Wert wird mit dem Grenzwert von  $t$  bei  $p \leq 0.05$  verglichen.

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Primerwahl

Für jedes der untersuchten Proteine der Calciumhomöostase wurden, wie oben bereits erwähnt, unter Berücksichtigung der Fragmentlänge Primerbindungsstellen in der kodierenden Sequenz gewählt. Im Folgenden sind die Positionen der Primer für das jeweilige Protein in einer Abbildung veranschaulicht.

Die Positionsangaben der Primer erfolgen bezogen auf ATG.

#### 3.1.1 Die $\alpha_{1c}$ -Untereinheit

Der 5'-Terminus des  $\alpha_{1c}$ -Fragments wird durch den 20 Basen langen Oligonukleotidprimer Ap1 definiert und hat folgende abgebildete Sequenz. Die Sequenzdaten entstammen den Klonierungsexperimenten von Schultz et al. [80].

5'	GCT GTT CTT CAT CTA CGC GGT	-3'
4006		4026

Der Primer Ap2 ist homolog dem 3'-Ende des Fragments.

5'	GGC ACA GAG CAT GTA GAA GC	-3'
4291		4272

### 3.1.2 Die $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit

Die Sequenz für die verwendeten Primer A2d1 und A2d2 für das 5'-Ende und das 3'-Ende der  $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit ist nachfolgend abgebildet.

5'	TGA GGC AGT TGA GAT GGA GGA	-3'
2829		2849

5'	GG TAT CTA GGT TGC TTA ACC ATG	-3'
3211		3099

### 3.1.3 Die $\beta$ -Untereinheit

Die Festlegung der Oligonukleotidprimer für die  $\beta$ -Untereinheit des Calciumkanals berücksichtigt die Expression verschiedener kodierender Gene für die  $\beta$ -Untereinheit. Nach Hullin et al. JBC 2003 [42] werden drei verschiedene  $\beta$ -Untereinheiten kodierende Gene im humanen Myokard exprimiert ( $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ ). Daher wurde ein Sequenzbereich gewählt, der bei allen  $\beta$ -Untereinheiten hoch homolog ist, wobei die Sequenzdaten aus [101] entnommen wurden. Dies hat zur Folge, dass mittels der Primer keine Differenzierung der einzelnen  $\beta$ -Untereinheiten erfolgt, sondern diese in ihrer Gesamtheit erfasst werden. Der 21 Nukleotide umfassende Primer Be1 hat die Sequenz:

5'	GG ATC TCC ATC ATT CGT GTG A	-3'
788		808

Das 3'-Ende wird durch den Primer Be2 beschrieben:

5'	G CTC GCA GGC ATC CTC CAA TTG	-3'
1198		1177

### 3.1.4 Die SERCA 2a

Abgebildet sind nachfolgend die Primer Sr1 für das 5'-Ende und Sr2 für das 3'-Ende der SERCA 2a.

5'	AAG GAA TTC ACT CTA GAG T	-3'
1437		1457

5'	TCT CGG AGG ATC CAG CAT GCC	-3'
1805		1790

### 3.1.5 Das Phospholamban

Das 5'-Ende und das 3'-Ende des Phospholamban wird durch die Primer Pl1 und Pl2 festgelegt.

5'	ATG GAG AAA GTC CAA TAC CTC	-3'
1		21

5'	GAG AAG CTA CAC GAT GAT AC	-3'
156		137

### 3.1.6 Das kardiale Calsequestrin

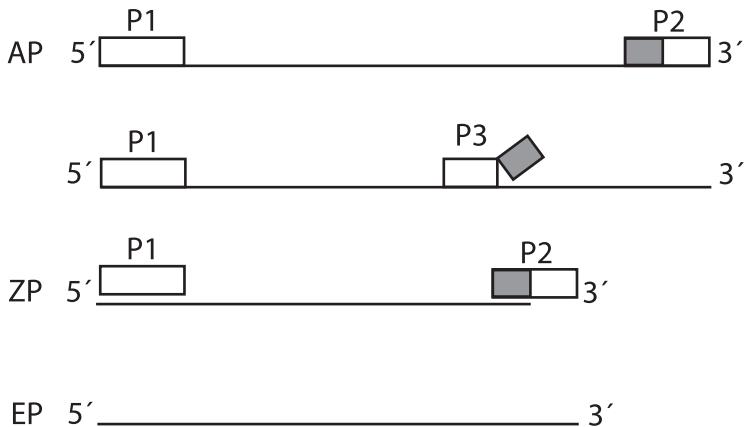
Die Oligonukleotidprimer Cc1 und Cc2 begrenzen das Fragment des kardialen Calsequestrins mit folgenden Sequenzen:

5'	GAG TTC CTG GAA ATC CTG AA	-3'
989		1008

5'	ATC TCC ATC CAG ACA CTG TC	-3'
1179		1160

## 3.2 Erstellung der kompetitiven Fragmente

Das für die kompetitive PCR benötigte kompetitive Fragment wird mit Hilfe sequenzspezifischer Mutagenese erstellt. Das kompetitive Fragment unterscheidet sich vom Zielfragment lediglich durch eine umschriebene Deletion. Das heißt, die Primerbindungsstellen am 5' und am 3' -Ende sind bei dem Kompetitorfragment als auch bei dem Zielfragment identisch. Die nun folgende Abbildungsreihe veranschaulicht schematisch den Weg der Erstellung des kompetitiven Fragments.

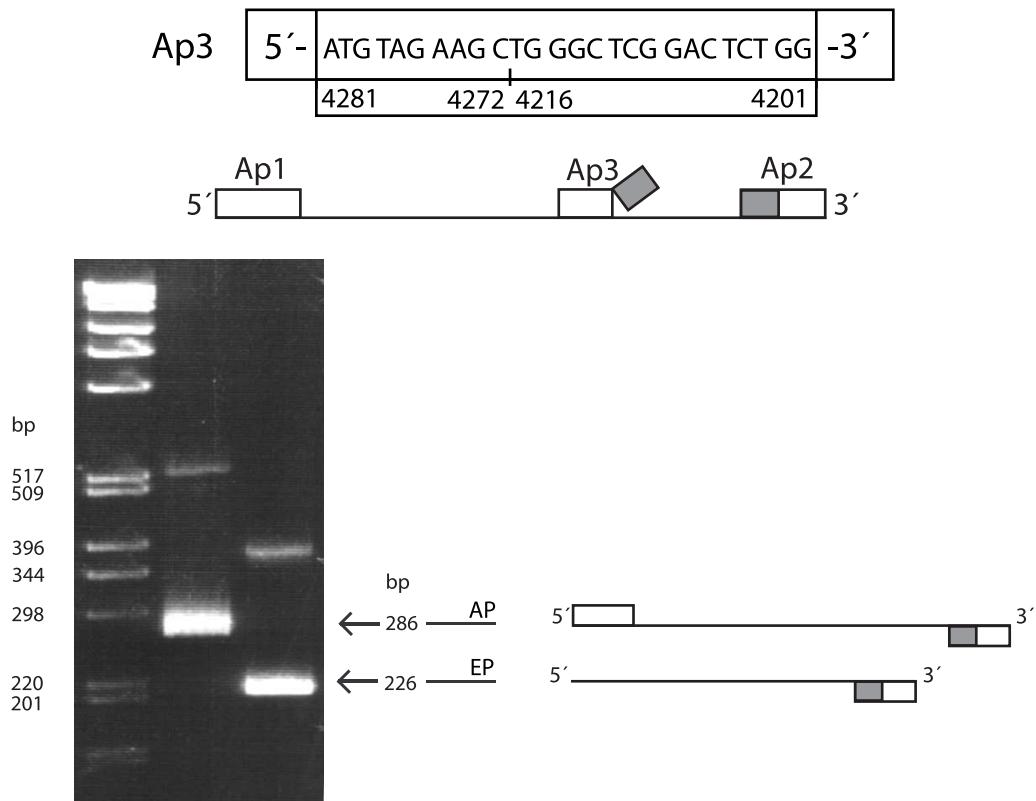


Erläuterungen zur Abbildung:

Die schematisch dargestellte Oligonukleotidsequenz beinhaltet am 5' Ende die komplementäre Sequenz für den Primer P1 und am 3' -Ende für den Primer P2. Benötigt wird nun ein Primer P3, der am 3' -Ende die komplementäre Sequenz für einen Bereich zwischen P1 und P2 des Fragments aufweist. Das 5' -Ende entspricht dem 3' -Ende des Oligonukleotidprimers P2. Im ersten Schritt der PCR binden nun P1 und P3 an die komplementären Bindungsstellen am Ausgangsprodukt AP und es entsteht ein Zwischenprodukt ZP. An dieses Zwischenprodukt kann nun erneut P1 binden, nun aber in Kombination mit P2. Daraus entsteht dann in einer weiteren PCR-Reaktion das Endprodukt EP, welches den gewünschten Eigenschaften des Kompetitorfragments entspricht. [41]

### 3.2.1 Die $\alpha_{1c}$ -Untereinheit

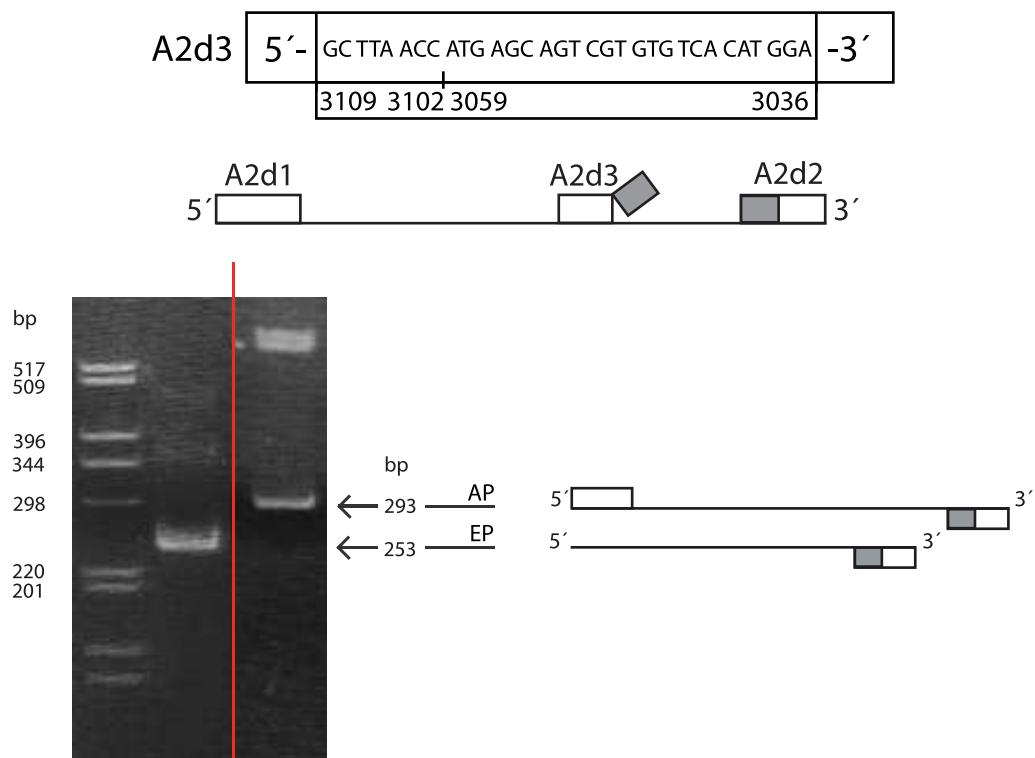
Der Linkerprimer Ap3 für die  $\alpha_{1c}$ -Untereinheit weist am 3'-Ende eine Sequenz von 16 Nukleotiden komplementär zu den Basen 4201 - 4216 der  $\alpha_{1c}$  auf. Das 5'-Ende ist homolog den zehn Basen des 3'-Endes von Ap2 und damit den Basen 4272 - 4281 der  $\alpha_{1c}$ -Untereinheit. Das entstehende Konstrukt ist mit 226bp kürzer als das Zielfragment mit 286bp.



Die Sequenzidentität des Kompetitorfragments wurde durch Elektroelution, Subklotierung und Sequenzierung bestätigt. Die auf dem Gel erkennbaren anderen Banden sind Konkatamere (durch Sequenzierung identifiziert).

### 3.2.2 Die $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit

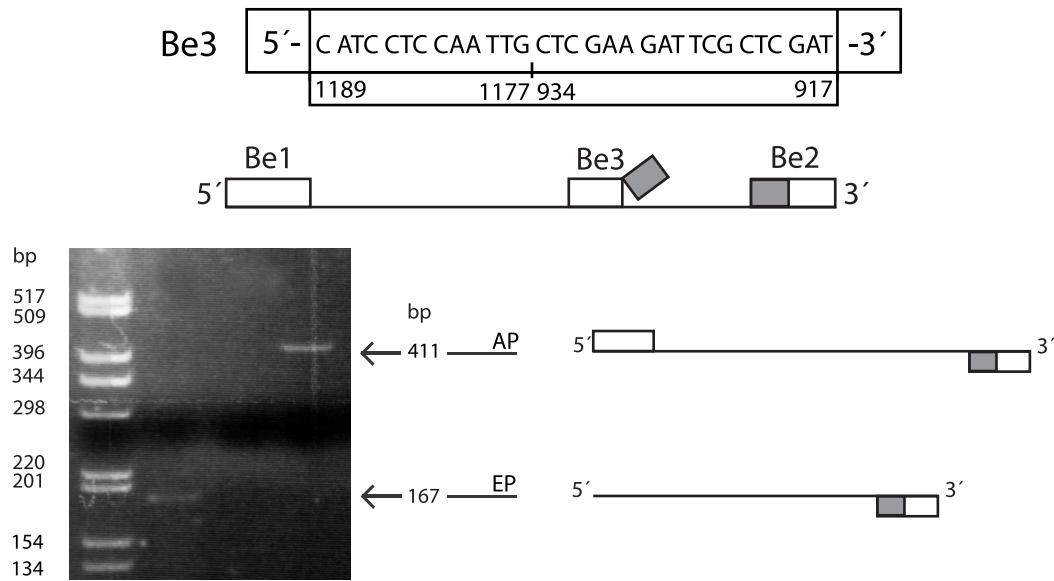
Der Linkerprimer A2d3 für die  $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit ist am 5'-Ende homolog zu den Basen 3102 - 3109 des 3'-Endes von A2d. Das 3'-Ende des Linkerprimers ist komplementär zu den Basen 3036 - 3059 der  $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit. Das entstehende Kompetitorfragment ist mit 253bp kürzer als das Zielfragment mit 293bp. Die senkrechte Linie über der Abbildung der PCR markiert die Stelle, an der zwei separate Abbildungen zur besseren Veranschaulichung zusammengefügt wurden.



Die Sequenzidentität des Kompetitorfragments wurde durch Elektroelution, Subklo-nierung und Sequenzierung bestätigt.

### 3.2.3 Die $\beta$ -Untereinheit

Der für die  $\beta$ -Untereinheit entsprechende Linkerprimer Be3 erzeugt mittels sequenzspezifischer Mutagenese eine 167bp lange Deletionsvariante des genuinen 411bp  $\beta$ -Fragments. Das 3'-Ende besteht aus 14 Nukleotiden mit komplementärer Sequenz zu den Basen 917 - 934 der  $\beta$ -Untereinheit. Das 5'-Ende des Linkerprimers Be3 ist komplementär der Sequenz der Basen 1177 - 1189 und damit dem 3'-Ende von Be2.

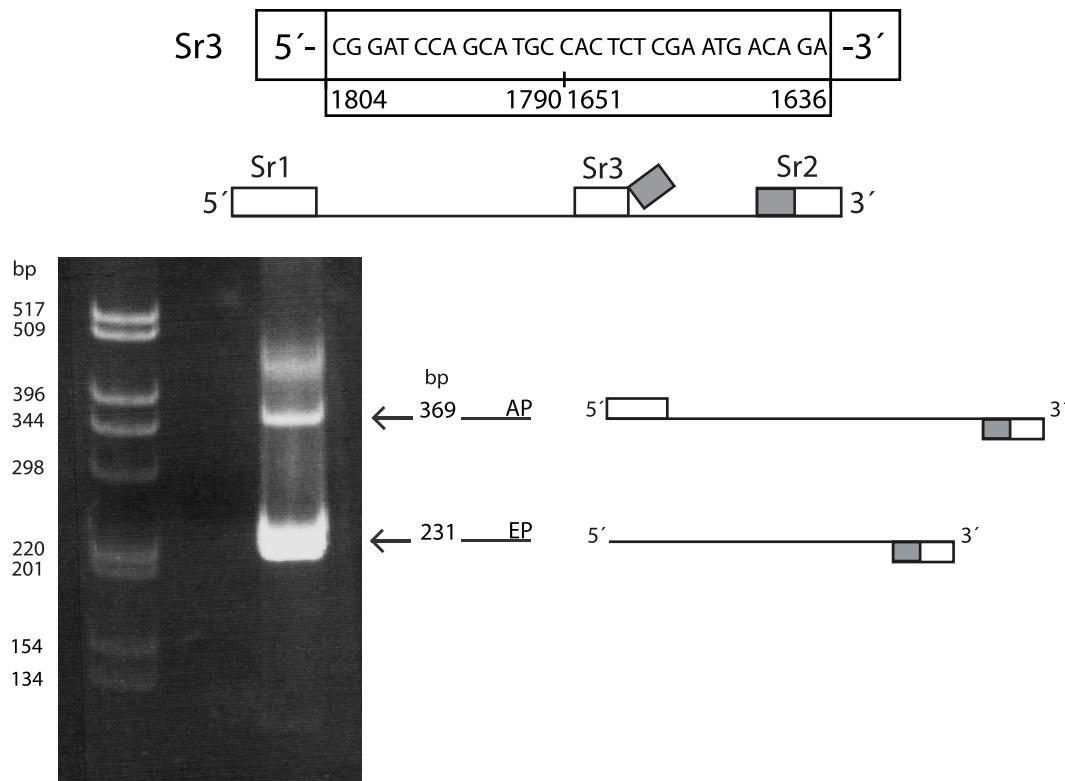


Die Sequenzidentität des Kompetitorfragments wurde durch Elektroelution, Subklo-  
nierung und Sequenzierung bestätigt.

### 3.2.4 Die SERCA 2a

Der Linkerprimer für die SERCA 2a Sr3 erzeugt eine 231bp lange Deletionsvariante.

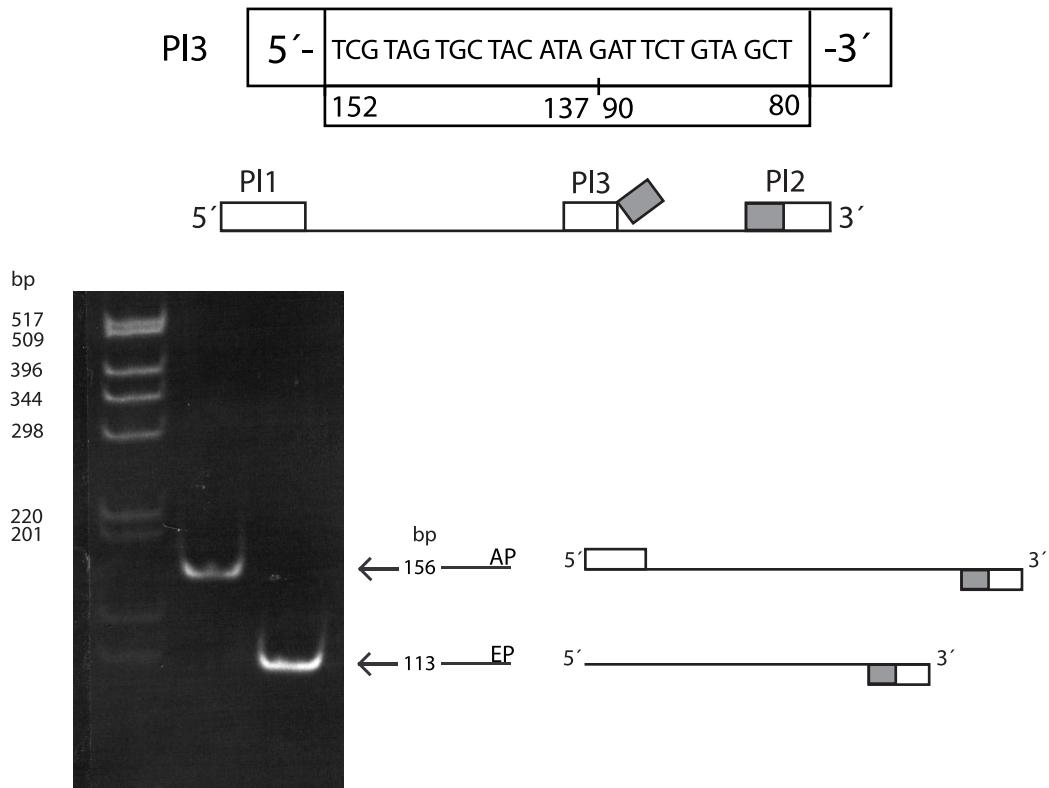
Das 5'-Ende des Linkerprimers ist komplementär der Sequenz der Basen 1790 - 1804 und damit dem 3'-Ende von Sr2. Das 3'-Ende von Sr3 ist komplementär zu den Basen 1636 - 1651 der SERCA 2a.



Die Sequenzidentität des Kompetitorfragments wurde durch Elektroelution, Subklo-  
nierung und Sequenzierung bestätigt.

### 3.2.5 Das Phospholamban

Der Linkerprimer für das Phospholamban Pl3 erzeugt eine 113bp lange Deletionsvariante des genuinen 156bp langen PLB. Das 5'-Ende des Linkerprimers ist komplementär der Sequenz der Basen 137 - 152 und damit dem 3'-Ende von Pl2. Das 3'-Ende des Pl3 besteht aus 14 Nukleotiden mit komplementärer Sequenz zu den Basen 80 - 90 des PLB.



Die Sequenzidentität des Kompetitorfragments wurde durch Elektroelution, Subklo-nierung und Sequenzierung bestätigt.

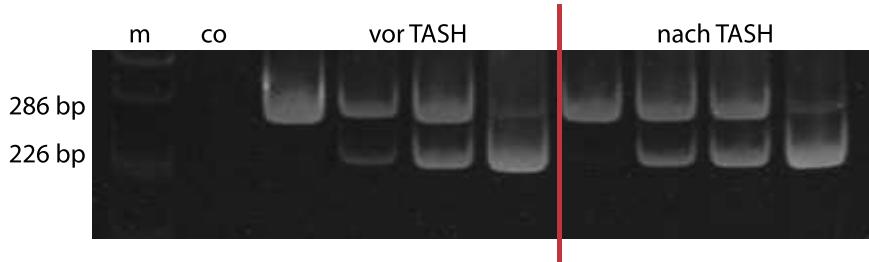
### 3.3 Kompetitive PCR

Untersucht wurden jeweils revers transkribierte mRNS aus Biopsien vor TASH und sechs Monate nach erfolgter TASH. Zur Vergleichbarkeit wurden die Biopsien eines Patienten/in jeweils zeitgleich untersucht.

Im Rahmen der PCR-Amplifikation kommt es zu einer kompetitiven Amplifikation von Ziel- und Kompetitorfragment. Beide Amplifikationsprodukte werden mittels Gelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht. Durch video-densiometrische Auswertung kann unter Berücksichtigung der bekannten Konzentrationen der Kompetitorfragmente in den einzelnen Ansätzen eine quantitative Auswertung erfolgen. Beispielhaft sind hier für jedes der untersuchten Proteine Abbildungen der Amplifikationsprodukte auf 5% PAGE Gel nach Färbung mit Ethidiumbromid abgebildet.

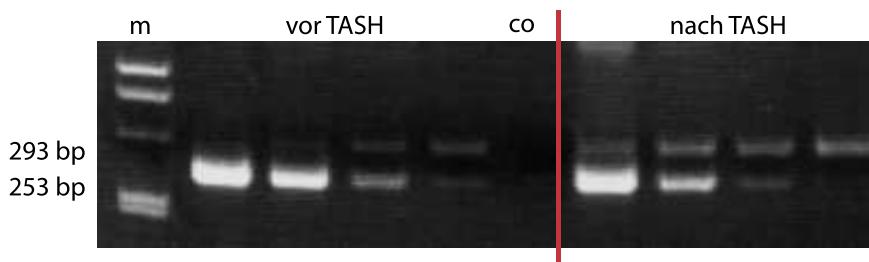
#### 3.3.1 Die $\alpha_{1c}$ -Untereinheit

Es folgt die Abbildung eines kompetitiven Experiments für die  $\alpha_{1c}$ -Untereinheit.



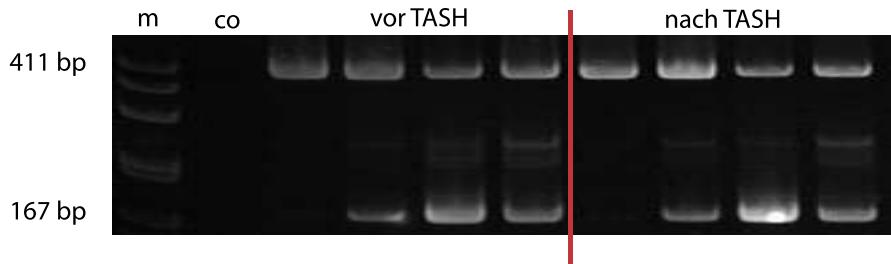
#### 3.3.2 Die $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit

Nachfolgend die Abbildung eines kompetitiven Experiments für die  $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit.



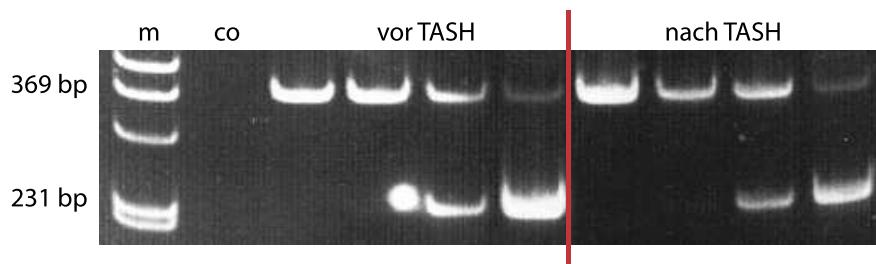
### 3.3.3 Die $\beta$ -Untereinheit

Es folgt die Abbildung eines kompetitiven Experiments für die  $\beta$ -Untereinheit.



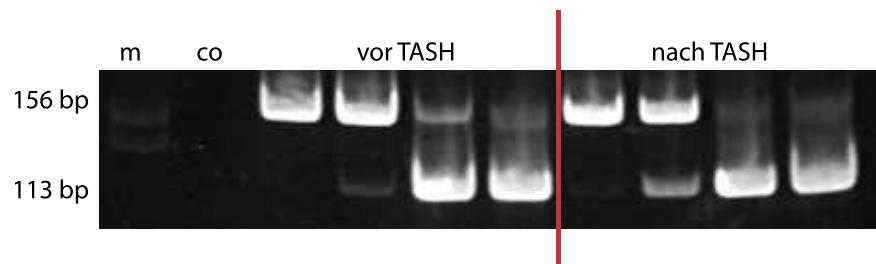
### 3.3.4 Die SERCA 2a

Es folgt die Abbildung eines kompetitiven Experiments für die SERCA2a.



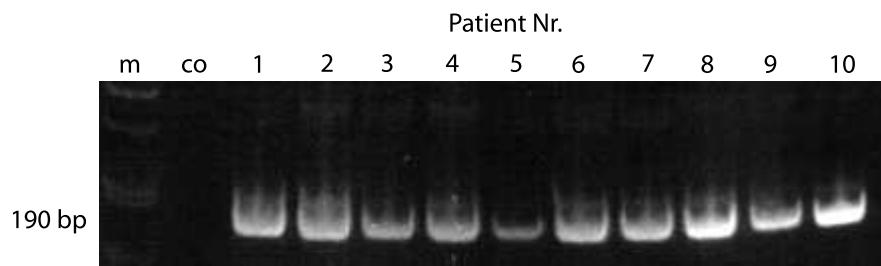
### 3.3.5 Das Phospholamban

Es folgt die Abbildung eines kompetitiven Experiments für das Phospholamban.



### 3.4 Bestimmung des kardialen Calsequestrins

Die Bestimmung des kardialen Calsequestrins zur Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Biopsiegrößen erfolgte durch densiometrische Messung aller Amplifikationsbänder, d.h. nicht kompetitiv. Der Korrekturfaktor für die einzelne Biopsie wurde berechnet aus der Abweichung der einzelnen Biopsie vom Gesamtmittel. Beispielhaft folgt die Abbildung für 10 Patientenproben.



## 3.5 Ergebnisse der Untersuchungen

### 3.5.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Es folgt die Charakterisierung des Patientenkollektivs in tabellarischer Form. Unser Patientengut ist Teil eines Kollektivs, zu dem Daten zur Behandlung mittels TASH von Boekstegers et al. [3] bereits veröffentlicht wurden.

	vor TASH	nach TASH	p
Patientenzahl	12		
Geschlechterverteilung	8 Männer/4 Frauen		
Altersverteilung	50 ± 14		
NYHA Class	3 ± 0.8	1.6 ± 0.7	–
IDG (mmHg)	96 ± 37	12 ± 6	≤ 0.01
LVEDP (mmHg)	21.4 ± 6.5	11.8 ± 6.4	0.0016
EDV (ml)	109.6 ± 36.4	86.4 ± 20.0	0.1437
$\tau$ (msec)	0.8 ± 0.15	0.55 ± 0.17	0.0093
EF (%)	77.14 ± 13.63	79.7 ± 11.9	0.6867

Tabelle 2: Charakterisierung des Patientenkollektivs

Mit NYHA Class erfolgt die Einteilung des Schweregrades der Erkrankung entsprechend der Klassifikation der New York Heart Association. Es werden 4 Gruppen unterschieden. In die erste Gruppe fallen alle asymptomatischen Patienten. Die Gruppen zwei und drei werden gebildet von Patienten mit Auftreten von Symptomatik bei schwerer bzw. leichter körperlicher Anstrengung. Die vierte Gruppe schliesslich besteht aus Patienten, die auch in Ruhe eine Symptomatik zeigen.

Der intraventrikuläre Druckgradient (IDG) ist der Druckgradient zwischen den Anteilen des linken Ventrikels vor und nach der die Ausflussbahn verlegenden Obstruktion (Normbereich: 0 mmHg).

Wie oben bereits erwähnt erfolgt die quantitative Bestimmung des Ausmaßes der diastolischen Relaxationsstörung mittels Messung des linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVEDP, Normbereich: 5 – 13 mmHg).

EDV ist die Abkürzung für das enddiastolische Volumen im linken Ventrikel (Normbereich:  $70 \pm 20 \text{ mmHg/m}^2$  Körperoberfläche).

TAU ( $\tau$ ) beschreibt die Geschwindigkeit des exponentiellen Abfalls des linksventrikulären Drucks während der isovolumetrischen Relaxation (Normbereich: 37 – 67 msec).

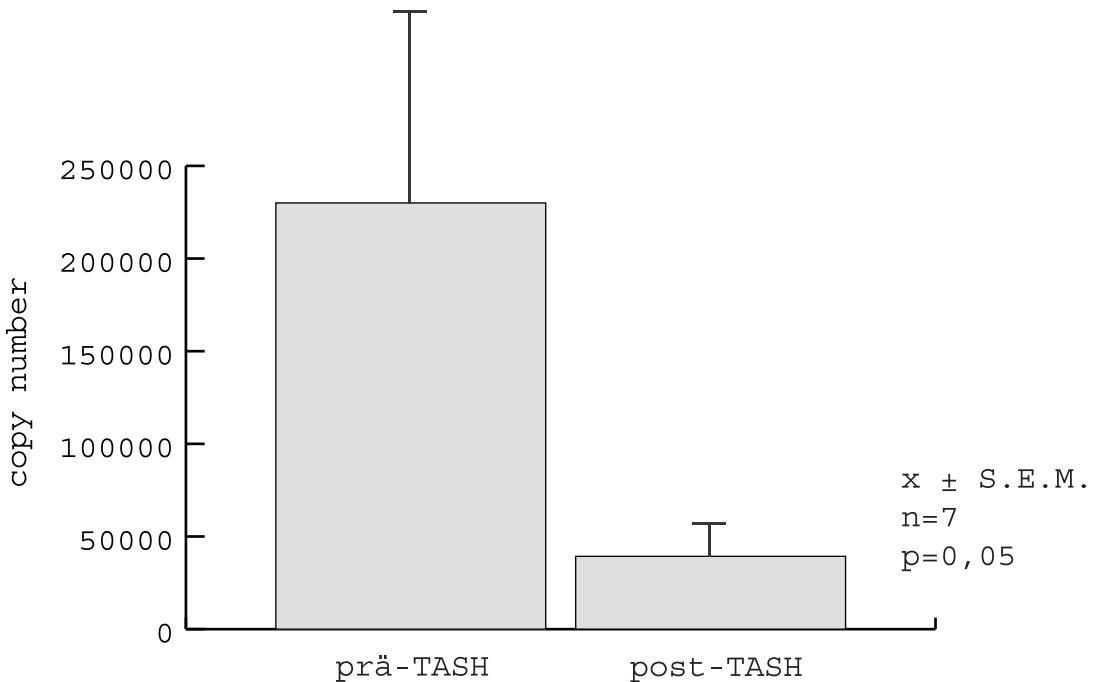
Die Ejektionsfraktion (EF) ist der Quotient aus Schlagvolumen und EDV (Normbereich:  $66 \pm 6\%$ ).

### 3.5.2 Ergebnisse der Expressionsuntersuchungen

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Auswertung der quantitativen PCR dargestellt. Die Gelläufe der quantitativen PCR wurden jeweils densiometrisch ausgewertet und die erhaltenen Werte auf die Genexpression des kardialen Calsequestrin normalisiert.

#### Expressionsuntersuchungen zur mRNS der $\alpha_{1c}$ Untereinheit

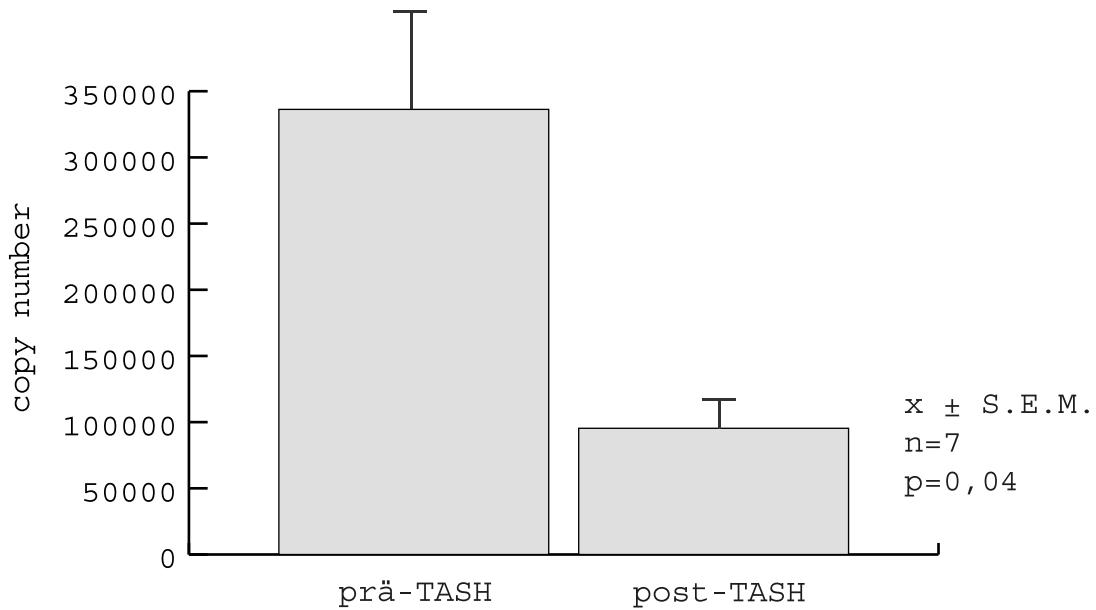
Nachfolgend ist in der Grafik die Veränderung der Kopienanzahl der mRNS vor und nach TASH dargestellt.



Dies entspricht einer prozentualen Abnahme der Genexpression nach TASH um 82.91% ( $p = 0.05$ ).

### Expressionsuntersuchungen zur $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit

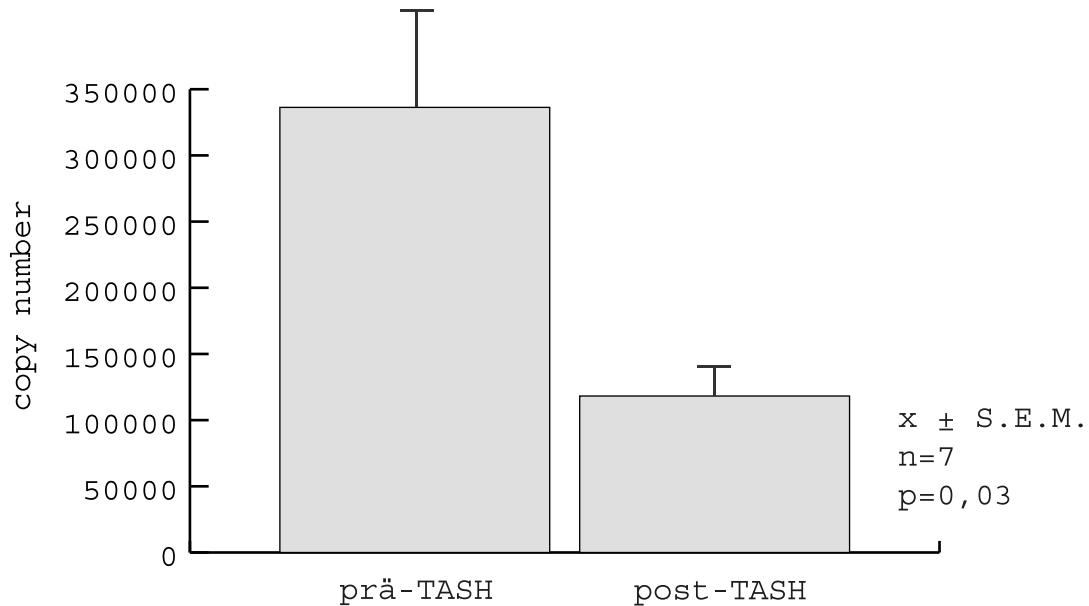
Es folgt die graphische Darstellung der Daten der Expressionsuntersuchungen zur  $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit.



Dies entspricht einer prozentualen Abnahme der Genexpression nach TASH um 71.64% ( $p = 0.04$ ).

### Expressionsuntersuchungen zur mRNS der $\beta$ Untereinheit

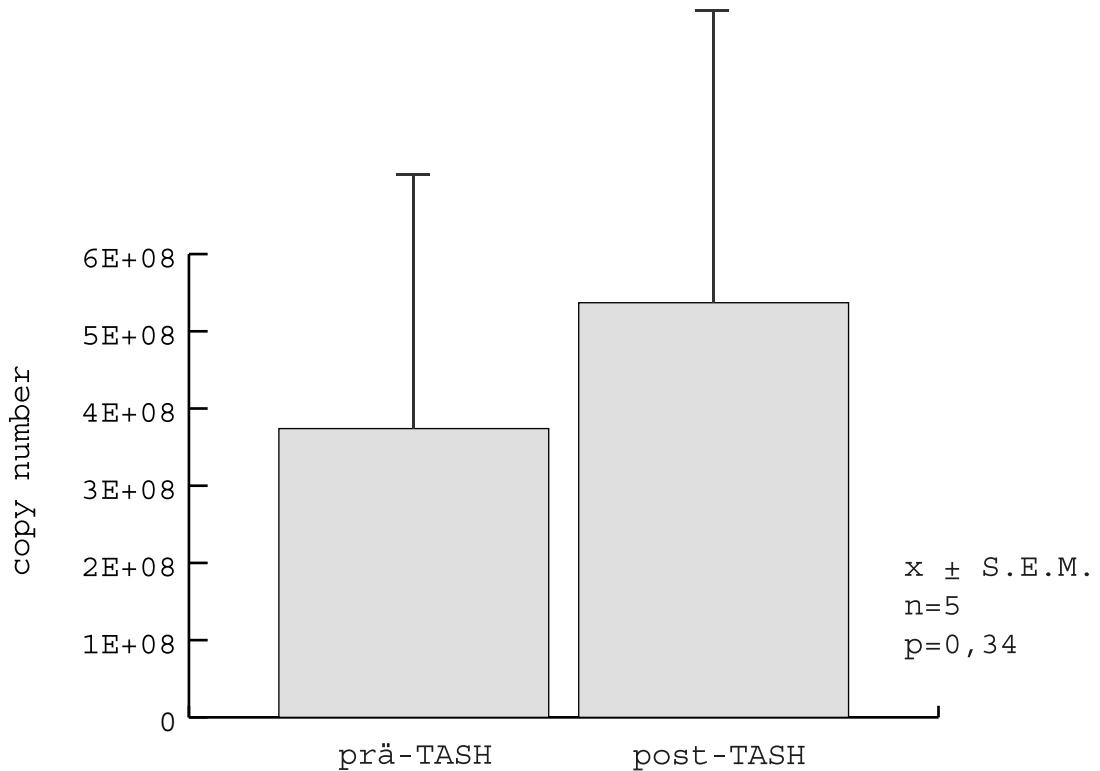
Es folgt die graphische Darstellung der Daten der Expressionsuntersuchungen zur  $\beta$  Untereinheit.



Dies entspricht einer prozentualen Abnahme der Genexpression nach TASH um 64.85% (p = 0.03).

**Expressionsuntersuchungen zur mRNS der SERCA 2a**

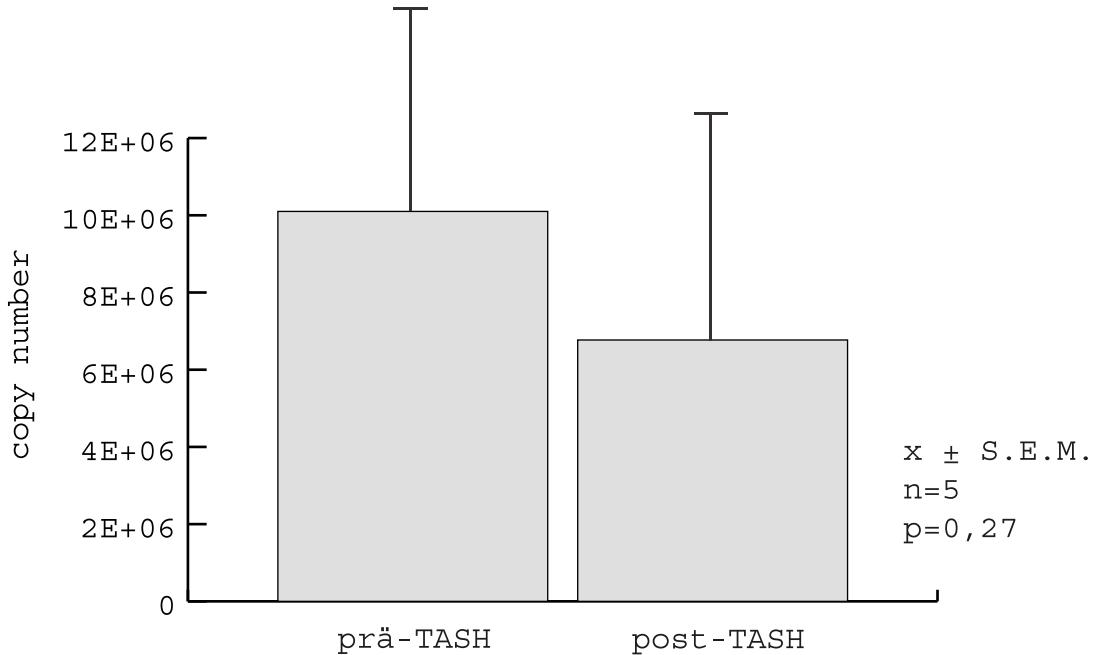
Folgend abgebildet ist die graphische Darstellung der Daten der Expressionsuntersuchungen zur SERCA.



Dieses Ergebnis ist nicht signifikant.

### Expressionsuntersuchungen zum Phospholamban

Auch die Daten der Expressionsuntersuchungen zum Phospholamban sind nachfolgend graphisch dargestellt.



Dieses Ergebnis ist nicht signifikant.

# Kapitel 4

## Diskussion

### 4.1 Kompetitive PCR zur Charakterisierung von Genexpressionsänderungen

Die Untersuchung der Genexpressionsänderungen wurde an Herzmuskelbiopsien durchgeführt. Diese Biopsate sind in der Regel 1 – 5 mg schwer, so dass diese Materialmenge nicht für quantitative proteinbiochemische Untersuchungen ausreicht. Auch pharmakologische Bindungsstudien sind mit diesen Gewebemengen nur schwerlich durchführbar. Daher wurde für unsere Untersuchungen die PCR-Methode (Polymerasekettenreaktion) verwendet, welche aufgrund des Amplifikationsprozesses auch geringe Mengen einer spezifisch kodierenden Sequenz für ein Protein detektieren kann. Allerdings ist durch die exponentielle Amplifikation der kodierenden Sequenz bei einer üblichen PCR eine quantitative Aussage nur mit Einschränkungen möglich. Daher wurde für diese Arbeit die Methode der kompetitiven PCR für die Zielsequenzen angewendet.

Die kompetitive PCR ist ein etabliertes quantitatives Verfahren mit welchem verschiedene klinische Fragestellungen wie zum Beispiel Viruslast bei HIV oder Hepatitis C bei betroffenen Patienten untersucht werden. Unsere Genexpressionsuntersuchungen wurden durchgeführt für kodierende Sequenzen kardial exprimierter Untereinheiten des L-Typ Calciumkanals ( $\alpha_{1c}$ -,  $\alpha_2/\delta$ - und  $\beta$ -Untereinheit) sowie für regulatorische Proteine des Calciumstoffwechsels im sarkoplasmatischen Retikulum (sarkoplasmatische Calcium-ATPase, Phospholamban). Die Kompetition wurde dabei wie unter Methoden und Ergebnisse beschrieben durchgeführt, was mehrere Vorteile vereint:

1. durch die Erzeugung einer internen Deletion mit Hilfe eines Linkerprimers wurde ein Kompetitorfragment erzeugt, welches bis auf die Deletion sequenzidentisch mit dem Zielfragment ist und eine nahezu identische Kinetik der Amplifikationsreaktion gewährleistet;
2. Zielfragment und Kompetitorfragment besitzen identische Primerbindungsstellen, wodurch die Bindungskinetik der jeweiligen Primer an beide Fragmente identisch ist.

Durch diese Konstruktion des Kompetitorfragments ergibt sich eine nahezu identische Amplifikationskinetik der beiden Fragmente. Dadurch kann die in der kompetitiven Reaktion erster Ordnung bestimmte Kopienzahl mit vernachlässigbar kleinem Fehler mit dem Verhältnis der beiden Fragmentlängen zueinander korrigiert werden.

## 4.2 Rechtsventrikuläre versus linksventrikuläre Biopsie

In unseren Untersuchungen wurden im Rahmen einer Herzkatheruntersuchung jeweils vor und sechs Monate nach Behandlung mittels TASH (transkoronarer Alkoholablation) Biopsien entnommen. Die Entnahme des Probematerials erfolgte stets im rechtsventrikulären Anteil des Septums, distal der muskulären Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstrakts.

Eine rechtsventrikuläre anstelle einer linksventrikulären Biopsie hat den grossen Vorteil einer Risikoreduktion für den Patienten. Die maximale Risikoreduktion eines solchen Eingriffs ist gerade vor dem Hintergrund einer wissenschaftlichen Probeentnahme von entscheidender Bedeutung. Die Entnahme in einem Niederdrucksystem wie dem rechten Ventrikel ist in Bezug auf die Auswirkungen einer möglichen Herzmuskelwandverletzung der Entnahme in einem Hochdrucksystem deutlich überlegen. Nicht zuletzt ist die rechtsventrikuläre Entnahme aufgrund der routinierten Erfahrungen mit dieser Technik in den Herzkatheterlabors mit einem geringeren Risiko behaftet. Zusätzlich hat die rechtsventrikuläre Biopsie den Vorteil einer leichten Wiederholbarkeit, was in Bezug auf unsere Untersuchungen mit zweimaliger Entnahme ein entscheidendes Argument darstellt.

Es stellt sich die Frage der Übertragbarkeit der Genexpressionsuntersuchungen basierend auf einer rechtsventrikulären Biopsie auf die Expressionsänderungen im linken Ventrikel. Verschiedene Studien belegen eine nicht unterschiedliche Expression der Gene des Calciumkanals. In Gruver et al. [30] und [44] konnte eine gleiche Genexpression in rechtsventrikulärem und linksventrikulärem Myokard für die  $\alpha_{1c}$ -Untereinheit und in [44] zusätzlich für die  $\beta$ - und  $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit gezeigt werden. Dies waren Untersuchungsergebnisse, welche von einem humanen Modell für diastolische Relaxationsstörungen (kardiale Allografts) ausgingen. Da in der Literatur eine unveränderte Genexpression in rechtem und linkem Ventrikel bereits gezeigt wurde und unsere Untersuchungen an kleinen Patientenzahlen durchgeführt wurden, haben wir keine prospektiv vergleichende Vorstudie hierzu durchgeführt.

### 4.3 Vergleichbarkeit der Genexpressionsunterschiede zwischen den einzelnen Biopsien

Herzmuskelbiopsien unterscheiden sich grundsätzlich in ihrer Grösse und in ihrer Zusammensetzung, das heißt im relativen Anteil von Herzmuskelzellen, extrazellulärer Matrix und anderen Zellen. Um den Vergleich der Genexpression vor und nach erfolgreicher Alkoholablation führen zu können, haben wir einen Genexpressionmarker gesucht, welcher zwei Bedingungen erfüllen mußte:

1. das Protein soll spezifisch in der Herzmuskelzelle exprimiert sein;
2. die Genexpression dieses Proteins soll in der Kardiomyopathie nicht verändert sein.

Kardiales Calsequestrin ist ein spezifisches calciumspeicherndes Protein des sarkoplasmatischen Retikulums der Herzmuskelzelle. Zudem ist die Expression dieses Proteins bei dilatativer und hypertrophischer Kardiomyopathie als unverändert dokumentiert. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde die Genexpression des kardialen Calsequestrins zur Normalisierung der Genexpressionsuntersuchungen herangezogen. Im Gegensatz zur kompetitiven PCR, welche für die Zielsequenzen konstruiert wurde, erfolgte die

Bestimmung der Genexpression des kardialen Calsequestrins mittels konventioneller PCR. Um eine semiquantitative Vergleichbarkeit zu erzielen, wurde die Anzahl der Amplifikationszyklen begrenzt auf eine Zyklenzahl, welche die Reaktion im linearen Amplifikationsbereich stoppt.

## 4.4 Genexpressionsänderungen der Untereinheiten des L-Typ Calciumkanals

Bei unseren Untersuchungen zur Genexpressionsänderung nach erfolgreicher Alkoholablation haben wir uns zunächst auf den L-Typ Calciumkanal konzentriert, da aus der Literatur eine um 33% erhöhte Expression dieses Kanalproteins bei Patienten mit hypertrophisch obstruktiver Kardiomyopathie beschrieben ist (Wagner et al. [97]). Diese Untersuchungen von Wagner et al. waren an rechtsatrialen Vorhofohren durchgeführt worden, welche anlässlich von herzchirurgisch durchgeföhrten Myektomien entnommen worden waren. Obgleich dieses Gewebe nicht ventrikulären Ursprungs und damit nicht aus druckbelastetem Gewebe ist, zeigen pharmakologische Bindungsstudien eine uniforme Genexpression des L-Typ Calciumkanals in allen Myokardanteilen bei Kardiomyopathien [30]. Daher konnten ähnliche Genexpressionänderungen auch für den linken Ventrikel angenommen werden. Interessanterweise weisen unsere Genexpressionsuntersuchungen eine gleichsinnige Abnahme aller L-Typ Calciumkanaluntereinheiten nach erfolgreicher Alkoholablation einer septalen Hypertrophie auf. Diese beträgt für die  $\alpha_{1c}$ -Untereinheit 82.91% ( $p = 0.05$ ), für die  $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit 71.64% ( $p = 0.04$ ) und für die  $\beta$ -Untereinheit 64.85% ( $p = 0.03$ ). Die prozentuale Abnahme der Genexpression ist höher als die um 33% vermehrte Genexpression bei HOCM-Patienten, welche von Wagner et al. beschrieben worden war. Dafür können mehrere verschiedene Gründe verantwortlich sein:

1. wurden die Genexpressionsänderungen bei Wagner et al. im Vergleich zu myokardialem Gewebe von Patienten mit anderen Herzerkrankungen bestimmt;
2. wurden in unseren Untersuchungen Änderungen der Genexpression beim gleichen Patienten vor und sechs Monate nach erfolgreicher Alkoholablation bestimmt;
3. gehen Änderungen der Genexpression auf mRNA Ebene nicht immer im gleichen Verhältnis mit quantitativen Änderungen der Expression auf Proteinebene einher;
4. pharmakologische Bindungsstudien identifizieren nur Proteine, welche sich in der Konformation befinden, die eine Pharmakonbindung ermöglichen;

5. die Untersuchungen wurden an Myokardgewebe unterschiedlicher Herkunft durchgeführt.

Der wichtigste Punkt ist wahrscheinlich der bei Wagner et al. angestellte Vergleich der Genexpression von Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie mit einem heterogenen Patientenkollektiv (dilative Kardiomyopathie, ischämische und hypertrophe Kardiomyopathie). Bei unseren Patienten handelt es sich jedoch um ein homogenes Kollektiv, in welchem Genexpressionsänderungen gegenüber einem gemischten Kollektiv verstärkt oder vermindert auftreten können. Dies wird auch in einer weiteren Untersuchung zur Genexpression zur  $\alpha_{1c}$ -Untereinheit bei terminaler Herzinsuffizienz deutlich [78]: Hier war in einem heterogenen Patientenkollektiv (dilatierende und ischämische Kardiomyopathie) keine relevante Änderung der Genexpression für die  $\alpha_{1c}$ -Untereinheit gesehen worden.

Die signifikante Reduktion der Expression der  $\alpha_{1c}$ -,  $\alpha_2/\delta$ - und  $\beta$ -Untereinheit nach Alkoholablation der septalen Hypertrophie bei Patienten mit hypertrophisch obstruktiver Kardiomyopathie sprechen dafür, dass eine Verbesserung der diastolischen Relaxation nach erfolgreicher Intervention mit Genexpressionsänderungen regulatorischer Proteine der Calciumhomöostase einhergeht. Ob ein kausaler Zusammenhang zwischen den Genexpressionsänderungen und der Verbesserung der diastolischen Relaxationsstörung besteht, kann anhand unserer Untersuchungsergebnisse nicht geklärt werden. Hierzu bedarf es weiterer Forschungsarbeit.

## 4.5 Genexpression der sarkoplasmatischen Calcium-ATPase 2a und des Phospholambans

Keine signifikanten Unterschiede wurden hingegen bei den Untersuchungen der Genexpression der sarkoplasmatischen Calcium-ATPase und des Phospholambans auf mRNS Ebene gefunden. Hierbei muss auch die eingeschränkte Aussagefähigkeit aufgrund der kleinen Fallzahl unserer Untersuchungen, insbesondere bei statistisch geringen Unterschieden, erwähnt werden. In der Literatur ist eine um 20% verminderte Genexpression der SERCA 2a bei Vergleich der mRNS Expression zwischen gesundem und herzinsuffizientem humanen Myokard bei dilatativer Kardiomyopathie nicht ischämischer Genese bekannt [82]. Obwohl im Rahmen dieser Untersuchungen keine Bestimmungen auf Proteinebene durchgeführt wurden, machen unsere Ergebnisse eine unveränderte Expression auch auf Proteinebene wahrscheinlich. Warum keine gleichsinnige Genexpressionsänderung zu den Untereinheiten des L-Typ Calciumkanals erfolgt bleibt hypothetisch, möglicherweise ist der Anteil des zellulären Calciums, welches spannungsaktiviert durch Calciumkanäle in die Herzmuskelzelle gelangt, gering. Phosphorylierung des Phospholambans könnte die SERCA Aktivität kompensatorisch ausreichend erhöhen.

## 4.6 Hypertrophisch obstruktive Kardiomyopathie als humanes Modell für Genexpressionänderungen nach Reduktion des Afterload

In verschiedensten Tiermodellen wurden Genexpressionsänderungen beschrieben, wie sie nach Erhöhung des Afterload auftreten. Üblicherweise wird eine Erhöhung des Afterload durch aortales Banding im Bereich der Aorta ascendens erzielt, die Genexpressionsänderungen werden dann im Intervall zur Operation untersucht, wobei in der Regel Tiere mit aortalem Banding und Scheinoperation verglichen werden. Andere Modelle untersuchen Tiere, welche spontan oder medikamentös induziert eine arterielle Hypertonie entwickeln.

Trotz der Erfolge dieser Modelle stellt sich die Frage, inwieweit die erhaltenen Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind. Beim Menschen sind ähnliche Untersuchungen nicht durchführbar, zum Einen selbstverständlich aus ethischen Gründen, zum Anderen weil reine Modelle meist nicht realisierbar sind. So ist bei Patienten meist die Dauer einer relevanten linksventrikulären Druckbelastung (zum Beispiel durch arterielle Hypertonie oder Aortenklappenstenose) nicht bekannt. Im Falle der arteriellen Hypertonie erhalten viele Patienten eine antihypertensive Medikation, welche den spontanen Verlauf beeinflusst.

Zusammengefasst erschweren solche Umstände die Interpretation von Genexpressionsuntersuchungen im humanen Myokard.

Die HOCM ist eine kardiale Erkrankung, welche durch Obstruktion des linksventrikulären Ausflußtraktes zu einer linksventrikulären Druckbelastung und damit sekundär zu einer linksventrikulären Hypertrophie führt. Durch die gezielte Alkoholablation der muskulär bedingten Obstruktion im linksventrikulären Ausflußtrakt wird der Afterload zu einem definierten Zeitpunkt reduziert. Dies ermöglicht in diesem besonderen klinischen Kontext Genexpressionsänderungen zu verfolgen, welche nach Druckentlastung des linken Ventrikels auftreten. So können retrospektiv mit hoher Wahrscheinlichkeit Genexpressionsänderungen identifiziert werden, welche sekundär mit einer linksventrikulären Druckbelastung verbunden sind.

Der Erfolg dieses Modells zur zeitlich definierten Reduktion der linksventrikulären

Druckbelastung zeigt sich in der signifikanten Abnahme des intraventrikulären Druckgradienten von  $96 \pm 37$  auf  $12 \pm 6$  mmHg bei den untersuchten Patienten. Alle untersuchten Patienten hatten vor der Intervention einen erhöhten linksventrikulären enddiastolischen Druck von  $21.4 \pm 6.5$  mmHg, welcher nach Alkoholablation auf  $11.8 \pm 6.4$  mmHg signifikant reduziert wurde. Die Reduktion des enddiastolischen linksventrikulären Drucks nach Beseitigung der linksventrikulären Obstruktion führte zu einer deutlich höheren physischen Belastbarkeit der untersuchten Patienten ersichtlich an der Abnahme der funktionellen NYHA-Klasse von  $3 \pm 0.8$  auf  $1.6 \pm 0.7$ .

Die in unseren Untersuchungen gezeigte konkordante Abnahme der Expression der Untereinheiten des Calciumkanals nach Reduktion des Afterload kann vor diesem Hintergrund als Anpassungsvorgang der Herzmuskulatur auf die veränderten Druckverhältnisse interpretiert werden. Anhand des hier vorgeschlagenen Modells können in zukünftigen Studien detaillierte Fragestellungen in Bezug auf Genexpressionsveränderungen, welche sekundär bei linksventrikulärer Druckbelastung auftreten, bearbeitet werden.

# Kapitel 5

## Zusammenfassung

Die hypertrophisch obstruktive Kardiomyopathie (HOCM) als Erbkrankheit stellt eine der Haupttodesursachen in der westlichen Welt unter den an Herzkrankheiten plötzlich Verstorbenen dar. Eine intraventrikuläre Obstruktion der Ausflußbahn des linken Ventrikels bedingt eine erhöhte Druckarbeit, was eine Hypertrophie der gesamten Herzmuskulatur des linken Ventrikels nach sich zieht. Klinisch relevant ist die begleitende diastolische Relaxationsstörung. In dieser Arbeit wird untersucht, ob nach erfolgreicher Alkoholablation mit Abnahme der diastolischen Relaxationsstörung Genexpressionsänderungen regulatorischer Proteine der Calciumhomöostase auftreten.

Zu diesem Zwecke wurden Herzmuskelbiopsien von Patienten mit HOCM vor und nach Behandlung der Septalastes mit Alkoholablation (TASH) auf den mRNS-Gehalt folgender Gene untersucht:  $\alpha_{1c}$ -,  $\alpha_2/\delta$ -,  $\beta$ -Untereinheit, SERCA 2a und das Phospholamban. Die Genexpressionsuntersuchungen wurden quantitativ mit Hilfe der reversen kompetitiven Polymerase Kettenreaktion vorgenommen.

Die Ergebnisse zeigen eine prozentuale Abnahme der Genexpression nach Behandlung mit TASH der  $\alpha_{1c}$ -Untereinheit um 82.91% ( $p = 0.05$ ), der  $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit um 71.64% ( $p = 0.04$ ) und der  $\beta$ -Untereinheit um 64.85% ( $p = 0.03$ ). Die Genexpressionsveränderungen der SERCA 2a und des Phospholambans waren nicht signifikant.

Die signifikante Reduktion der Expression der  $\alpha_{1c}$ -,  $\alpha_2/\delta$ - und  $\beta$ -Untereinheit nach Alkoholablation der septalen Hypertophie bei Patienten mit HOCM sprechen dafür, dass der L-Typ Calciumkanal eine Rolle im Rahmen der Anpassungsvorgänge bei hypertrophisch obstruktiver Kardiomyopathie spielt. Dies gilt jedoch nicht für die SERCA2a-

und die Phospholamban-Genexpression bei den untersuchten Patienten. Eingeschränkt wird die Aussagefähigkeit unserer Untersuchungen durch die geringe Fallzahl. Vorteil der Untersuchung ist jedoch, dass die Genexpressionsänderung der unterschiedlichen Gene jeweils am gleichen Patienten zum Zeitpunkt der Behandlung und sechs Monate danach untersucht wurde. Unsere Untersuchungsergebnisse weisen darauf hin, dass eine Verbesserung der diastolischen Relaxation nach erfolgreicher Intervention mit Genexpressionsänderungen regulatorischer Proteine der Calciumhomöostase einhergeht.

# Literaturverzeichnis

- [1] Asahi M., McKenna E., Kurzydlowski K., Tada M., MacLennan H.M., *Physical Interactions between Phospholamban and Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPases Are Dissociated by Elevated Ca<sup>2+</sup>, but Not by Phospholamban Phosphorylation, Vanadate, or Thapsigargin, and Are Enhanced by ATP*. J Biol Chem, 2000; 275:15034-15038
- [2] Birnbaumer L., Campbell K.P., Catterall W.A., Harpold M.M., Hofmann F., Horne W.A., Mori Y., Schwartz A., Snutch T.P., Tanabe T., Tsien R.W., *The naming of voltage-gated calcium channels*, Neuron, 1994; 13:505-64
- [3] Boekstegers P, Steinbigler P, Molnar A, Schwaiblmair M, Becker A, Knez A, Haberl R, Steinbeck G, *Pressure-guided nonsurgical myocardial reduction induced by small septal infarctions in hypertrophic obstructive cardiomyopathy*, J Am Coll Cardiol, 2001; 38(3): 846-53
- [4] Bonow RO., Dilsizian V., Rosing DR., Maron BJ., Bacharad SL., Green MV., *Verapamil-induced improvement in left ventricular diastolic filling and increased exercise tolerance in patients with hypertrophic cardiomyopathy: short- and long-term effects*, Circulation, 1985; 72:853-864
- [5] Bonow RO., Rosing DR., Bacharad SL., et al., *Effects of verapamil on left ventricular systolic function and diastolic filling in patients with hypertrophic cardiomyopathy*, Circulation, 1981; 64:787-796
- [6] Bouaboula M., Legoux B., Delpech X., Dumont M., Piechaczyk P., Shire D., *Standardization of messenger RNA titration using a polymerase chain reaction method*

- involving coamplification with a multispecific internal control*, J Biol Chem, 1992; 267:21830
- [7] Bourinet E., Fournier F., Nargeot J., Charnet P., *Endogenous Xenopus oocyte calcium channels are regulated by protein kinases A and C*, FEBS Letters, 1992; 299:5-9
- [8] Braunwald E., Antman E., Serge Barold S., *Heart Disease; A Textbook of Cardiovascular Medicine*, Philadelphia, 1997
- [9] Braunwald E., *Induced Septal Infarction; A new therapeutic strategy for hypertrophic obstructive cardiomyopathy*, Circulation, 1997; 95:1981-1982
- [10] Brickley K., Campbell V., Berrow N., Leach R., Norman R.I., Wray D., Dolphin A.C., Baldwin S.A., *Use of site-directed antibodies to probe the topography of the alpha<sub>2</sub> subunit of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels*, FEBS Letters, 1995; 364:129-33
- [11] Brust P.F., Simerson S., McCue A.F., Deal C.R., Schoonmaker S., Williams M.E., Velicelebi G., Johnson E.C., Harpold M.M., Ellis S.B., *Human neuronal voltage-dependent calcium channels: studies on subunit structure and role in channel assembly*, Neuropharmacology, 1993; 32:1089-102
- [12] Castellano A., Wei X., Birnbaumer L., Perez-Reyes E., *Cloning and expression of a third calcium channel β subunit*, J Biol Chem, 1993; 268:3450-55
- [13] Cohen LS., Braunwald E., *Amelioration of angina pectoris in idiopathic hypertrophic subaortic stenosis with beta-adrenergic blockade*, Circulation, 1967; 35:847-851
- [14] Collin T., Wang J.J., Nargeot N., Schwartz A., *Molecular cloning of three isoforms of the L-type voltage-dependent calcium channel β subunit from normal human heart*, Circ Res, 1993; 72:1337-44
- [15] Davidson C.J., Fishman R.F., Bonow R.O., *Cardiac catheterization*, in Braunwald(Ed.), Heart disease 5th ed. 1997 Saunders, 177-203
- [16] De Jongh K.S., Warner C., Catterall W.A., *Subunits of purified calcium channels. α<sub>2</sub> and δ are encoded by the same gene*, J Biol Chem, 1990; 265:14738-41

- [17] De Waard M., Liu H., Walker D., Scott V.E., Gurnett C.A., Campbell K.P., *Direct binding of G-protein beta-gamma complex to voltage dependent calcium channels*, Nature, 1997; 385:446-450
- [18] Faber L., Seggeiß H., Faßbender D., *Perkutane transluminale septale Myokardablation bei hypertroph-pbstruktiver Kardiomyopathie: Akutergebnisse bei 66 Patienten unter Berücksichtigung der Myokard-Kontrastechokardiographie*, Z Kardiol, 1998; 87:191-201
- [19] Fabiato A., *Calcium induced calcium release from cardiac sarcoplasmatic reticulum*, American Journal of Physiology, 1983; 245:C1-14
- [20] Fananapazir L., Epstein ND., Curiel RV., Panza JA., Tripodi D., McAreavey D., *Long term results of dual-chamber pacing in obstructive hypertrophic cardiomyopathy*, Circulation, 1994; 90:2731-2742
- [21] Flamm MD., Harrison DC., Hancock EW., *Muscular subaortic stenosis prevention of outflow obstruction with propranolol*, Circulation, 1968; 38:846-858
- [22] Flasnoecker M., *Thiemes Innere Medizin* Stuttgart, Thieme Verlag, 1999
- [23] Flockerzi V., Hofmann F., *Molecular structure of the cardiac calcium channel. in N. Sperelakis (ed.)*, Physiology and Pathophysiology of the Heart. 3 ed. 1995; 91-9
- [24] Forth W., Henschler D., Rummel W., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Spektrum Verlag, Berlin, 1996
- [25] Frank K.F., Bölk B., Brixius K., Kranias E.G., Schwinger R.H. , *Modulation of SERCA: implications for the failing human heart*. BasicRes Cardiol, 2002; Suppl. 1:I/72-I/78
- [26] Gaasch W., Carroll J., *Myocardial relaxation: effects of preload on the time course of isovolumetric relaxation*, Circulation, 1986; 73,5:1037-1041
- [27] Gietzen F., Leuner J., Raute-Kreinsen U., *Acute and long-term results after trans-coronary ablation of septal hypertrophy (TASH)*, European Heart Journal, 1999; 20:1342-1354

- [28] Gleichmann U., Seggewiß H., Faber L., *Kathetertherapie der hypertrophen obstruktiven Kardiomyopathie; DMW*, Thieme Verlag, Stuttgart, 1996; 121:679-685
- [29] Greger R., Windhorst U., *Comprehensive Human Physiology; From Cellular Mechanisms to Integration*, Berlin, Springer Verlag, 1996
- [30] Gruver E.J., Morgan J.P., Stambler B.S., Gwathmey J.K., *Uniformity of calcium channel number and isometric contraction in human right and left ventricular myocardium.*, Basic Res Cardiol, 1994; 89(2):139-48
- [31] Guy H.R., Conti F., *Pursuing the structure and function of voltage-gated channels*, Top Neuro Sci, 1990; 13:201-6
- [32] Haase H., Karczewski P., Beckert R., Krause E.G., *Phosphorylation of the L-type calcium channel beta subunit is involved in beta-adrenergic signal transduction in canine myocardium*, Febs Letters, 1993; 335:217-222
- [33] Haase H., Kresse A., Hohaus A., Schulter H.D., Maier M., Osterziel K.J., Lange P.E., Morano I., *Expression of calcium channel subunits in the normal and diseased human myocardium*, J Mol Med, 1996; 74:99-104
- [34] Hanahan D., J. Mol. Biol., 1983; 166:557-580
- [35] Hanrath P., Mathey DG., Kremer P., Sonntag F., Bleifeld W., *Effects of verapamil on left ventricular isovolumic relaxation time and regional left ventricular filling in hypertrophic cardiomyopathy*, Am J Cardiol, 1980; 45:1258-1264
- [36] Harrison DC., Braunwald E., Glick G., Mason DT., *Effects of beta adrenergic blockade on the circulation, with particular reference to observations in patients with hypertrophic subaortic stenosis*, Circulation, 1964; 29:84-98
- [37] Hasenfuss G., *Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure*, Cardiovascular Research, 1998, 37:279-289
- [38] Heinemann S.H., Terlau H., Stühmer W., Imoto K., Numa S., *Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations*, Nature, 1992; 356:441-3

- [39] Hess OM., Murakami T., Krayenbuehl HP., *Does verapamil improve left ventricular relaxation in patients with myocardial hypertrophy?* Circulation, 1986; 74:530-543
- [40] Hofmann F., Biel M., Hullin R., Bosse E., Flockerzi V., *High voltage activated calcium channels* In: GTPase in Biology. Dickey B., Birnbaumer L., eds., Handbook of Pharmacology Berlin, Heidelberg: Springer, 1993
- [41] Hullin R., Asmus F., Steinbeck G., *Competitive PCR for studying gene expression in micro biopsies*, MCB, 1997
- [42] Hullin R., Khan IF, Wirtz S, Mohacsi P, Varadi G, Schwartz A, Herzig S., *Cardiac L-type calcium channel beta-subunits expressed in human heart have differential effects on single channel characteristics*, J Biol Chem, 2003; 278(24): 21623-30
- [43] Hullin R., Singer-Lahat D., Freichel M., *Calcium channel β subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain*, The EMBO Journal, 1992, 11:885-90
- [44] Hullin R., Asmus F., Ludwig A., Hersel J., Boekstegers P., *Subunit expression of the cardiac L-type calcium channel is differentially regulated in diastolic heart failure of the cardiac allograft*, Circulation, 1999; 100(2):155-63
- [45] Iles D.E., Lehmann-Horn F., Scherer S.W., Tsui L.C., Olde Weghuis D., Suijkerbuijk R.F., Heytens L., Mikala G., Schwartz A., Ellis F.R., Stewart A.D., Deufel T., Wieringa B., *Localization of the gene encoding the α<sub>2</sub>/δ-subunits of the L-type voltage-dependent calcium channel to chromosome 7q and analysis of the segregation of flanking markers in malignant hyperthermia susceptible families*, Hum Mol Genet, 1994; 3:969-75
- [46] Isselbacher, Braunwald, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, New York, MacGraw-Hill, 1998
- [47] Jay S.D., Sharp A.H., Kahl S.D., Vedvick T.S., Harpold M.M., Campbell K.P., *Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel α<sub>2</sub>-subunit and the associated δ peptides*, J Biol Chem, 1991; 266:3287-93

- [48] Jeanrenaud X., Goy JJ., Kappenberger L., *Effects of dual-chamber pacing in hypertrophic obstructive cardiomyopathy*, Lancet, 1992; 339:1318-1323
- [49] Kim H.L., Kim H., Lee P., King R.G., Chin H., *Rat brain expresses an alternatively spliced form of the dihydropyridine-sensitive L-type calcium channel  $\alpha_2$  subunit*, Proc Natl Acad Sci USA, 1992; 89:3251-5
- [50] Knight C., Kurbaan A., Seggewiß H., *Nonsurgical septal reduction for hypertrophic obstructive cardiomyopathy*, Circulation, 1997; 95:2075-2081
- [51] Kramer C., Reichek N., Ferrari V., *Regional Heterogeneity of Function in Hypertrophic Cardiomyopathy*, Circulation, 1994; 90:186-194
- [52] Lacerda A.E., Kim H.S., Ruth P. et al., *Normalization of current kinetics by interaction between the alpha 1 and beta subunits of the skeletal muscle dihydropyridine-sensitive calcium channel*, Nature, 1991; 325:527-530
- [53] Lerch H., Schäfers M., Gietzen F., *Myokardiale Perfusion und Metabolismus nach transkoronarer Ablation der Septumhypertrophie (TASH) bei hypertrophisch obstruktiver Kardiomyopathie*, Nuklearmedizin, 1997; 36:218-222
- [54] Löffler G., Petrides PE., *Biochemie und Pathobiochemie*, Berlin, 1997, Springer Verlag
- [55] MacLennan D.H., Kranias E.G., *Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility*, Nat Rev Mol Cell Biol, 2003; 4(7):566-77
- [56] Maron B., Spirito P., Wesley Y., *Development and progression of left ventricular hypertrophy in children with hypertrophic cardiomyopathy*, New England Journal of Medicine, 1986; 315:610-614
- [57] Mc Culloch RK., Choong C., Hurley CM., *An evaluation of competitor type and size for use in determination of mRNA in competitive PCR*, PCR Methods and Applications, 1995; 4:219
- [58] Mikami A., Imoto K., Tanabe T. Niidome T., *Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine sensitive calcium channel*, Nature, 1989; 340:230-233

- [59] Münch G., Bölk B., Karczewski P, Schwinger R.H., *Evidence for Calcineurin-mediated Regulation of SERCA 2a Activity in Human Myocardium.* J Mol Cell Cardiol, 2002; 34:321-334
- [60] Nagata S., Nimura Y., Beppu S., Park YD., Sakakibara H., *Mechanism of systolic anterior motion of mitral valve and site of intraventricular pressure gradient in hypertrophic obstructive cardiomyopathy,* Br Heart J, 1983; 49:234-243
- [61] Nagueh S., Lakkis N., Middleton K., *Changes in left ventricular diastolic function 6 months after nonsurgical septal reduction therapy for hypertrophic obstructive cardiomyopathy,* Circulation, 1999; 99:344-347
- [62] Neumann J., *Altered phosphatase activity in heart failure, influence on  $Ca^{2+}$  movement.* BasicRes Cardiol, 2002; Suppl. 1:I/91-I/95
- [63] Neely A., Wei X., Olcese R., *Potentiation by the  $\beta$  subunit of the ratio of the ionic current to the charge movement in the cardiac calcium channel,* Science Reports, 1993; 262:575-578
- [64] Negash S., Yao Q., Sun H., Li J., Bigelow D.J., Squier T.C., *Phospholamban remains associated with the  $Ca^{2+}$ - and  $Mg^{2+}$ -dependent ATPase following phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase.* Biochem J., 2002; 351:195-205
- [65] Nishimura RA., Hayes DL., Ilstrup DM., *Effects of dual-chamber pacing on systolic and diastolic function in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy,* J Am Coll Cardiol, 1996; 27:421-430
- [66] Nishimura S., Takeshima H., Hofmann F., Flockerzi V., Imoto K., *Requirement of the calcium channel  $\beta$  subunit for functional conformation,* FEBS Letters. 1993; 324:283-6
- [67] Nishimura RA., Trusty FJ., Hayes DL., *Dual-chamber pacing for hypertrophic cardiomyopathy: a randomized, double blind, crossover trial,* J Am Coll Cardiol, 1997; 29:435-441

- [68] Olcese R., Quin N., Schneider T., *The amino terminus of a calcium channel beta subunit sets rates of channel inactivation independently of the subunits effect on activation*, Neuron, 1994; 13:1433-1438
- [69] Pragnell M., De Waard M., Mori Y., Tanabe T., Snutch T.P., Campbell K.P., *Calcium channel β-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the α<sub>1</sub>-subunit*, Nature, 1994; 368:67-70
- [70] Raff G.L., Glantz S.A., *Volume loading slows left ventricular isovolumic relaxation rate*, Circ Res, 1981; 48:813-24
- [71] Regulla S., Schneider T., Nastainczyk W., Meyer H.E., Hofmann F., *Identification of the site of interaction of the dihydropyridine channel blockers nitrendipine and azidopine with the calcium channel α<sub>1</sub> subunit*, EMBO J, 1991; 10:45-9
- [72] Rosing DR., Kent KM., Maron BJ., Epstein SE., *Verapamil therapy; a new approach to the pharmacologic treatment of hypertrophic cardiomyopathy; Effects on exercise capacity and symptomatic status*, Circulation, 1979; 60:1208-1213
- [73] Ross R., Kleinz R., Reske-Kunz Ab., *A method for rapid generation of competitive standard molecules for RT-PCR avoiding the problem of competitor/probe cross-reactions*, PCR Methods and Applications, 1995; 245:1115
- [74] Ruth P., Rohrkasten A., Biel M., Bosse E., Regulla S., Meyer H.E., Flockerzi V., Hofmann F., *Primary structure of the beta-subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle*, Science, 1989; 245:1115-1118
- [75] Ruzumna P., Gheorghiade M., Bonow RO., *Mechanism and management of heart failure due to diastolic dysfunction*, Current Opinion in Cardiology, 1996; 11:269-275
- [76] Saborido A., Molano F., Moro G., Megias A., *Regulation of dihydropyridine receptor levels in skeletal and cardiac muscle by exercise training*, Pflugers Arch, 1995; 429(3):364-9
- [77] Sanger F., Niklen S., Coulson A.R., *DNA sequencing with chain terminating inhibitors*, Proc Natl Acad Sci USA, 1977; 74:5463-7

- [78] Schroder F, Handrock R, Beuckelmann DJ, Hirt S, Hullin R, Priebe L, Schwiniger RH, Weil J, Herzig S., *Increased availability and open probability of single L-type calcium channels from failing compared with nonfailing human ventricle*, Circulation, 1998; 98(10):969-76
- [79] Schultz D., Mikala G., Yatani A., *Cloning, chromosomal location and functional expression of the  $\alpha 1$ -subunit of the L-type voltage-dependent calcium channel from normal human heart*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993; 90:10494-10498
- [80] Schultz D., Mikala G., Yatani A., Engle D.B., Iles D.E., Segers B., Sinke R.J. Weghuis D.O., Klockner U., Wakamori M., Wang J-J., Melvin D., Varadi G., Schwartz A., *Cloning, chromosomal localization and functional expression of the  $\alpha 1$  subunit of the L-type voltage-dependent calcium channel from normal human heart.*, Proc Natl Acad Sci USA, 1993; 90:6228-32
- [81] Schulte H., Bircks W., Loesse B., *Prognosis of patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy after transaortic myectomy*, J Thorac Cardiovasc Surg, 1993; 106:709-17
- [82] Schwartz K., Mercadier J.J., in Molecular and cellular biology of heart failure, Curr Opin Cardiol, 1996; 11(3):227-36, Review
- [83] Seggewiß H., Gleichmann U., Faber L., *Percutaneous transluminal septal myocardial ablation in hypertrophic obstructive cardiomyopathy: acute results and 3-month follow-up in 25 patients*, J Am Coll Cardiol, 1998; 31:252-258
- [84] Sheehan F.H., Bolson E.L., Dodge H.T., Mathey D.G., Schofer J., Woo H.W., *Advantages and applications of the centerline method for characterizing regional ventricular function*, Circulation, 1986; 75:293-305
- [85] Shuba L.M., McDonald T.F., *Excitation-contraction coupling of calcium currents to contraction*, Physiology and Pathophysiology of the Heart, Sperelakis N. 3d ed., 1995 Kluwer Academic Publishers
- [86] Sigwart U., *Non-surgical myocardial reduction for hypertrophic obstructive cardiomyopathy*; Lancet, 1995; 22;346:211-4.

- [87] Song Q., Schmidt A.G., Hahn H.S., Carr A.N., Frank B., Pater L., Gerst M., Young K., Hoit B.D., McConnel B.K., Haghghi K., Seidman C.E., Seidman J.G., Dorn II G.W., Kranias E.G., *Rescue od cardiomyocyte dysfunction by phospholamban ablation does not prevent ventricular failure in genetic hypertrophy*, J Clin Invest, 2003; 111: 859-867
- [88] Spirito P., Seidmann C., McKenna W., *The management of hypertrophic cardiomyopathy*, New England Journal of Medicine, 1997; 336:11,775-785
- [89] Takahashi T, Allen PD, Lacro RV, Marks AR, Dennis AR, Schoen FJ, Grossman W, Marsh JD, Izumo S., it Expression of dihydropyridine receptor (Ca<sup>2+</sup> channel) and calsequestrin genes in the myocardium of patients with end-stage heart failure, J Clin Invest, 1992; 90(3):927-35
- [90] Takahashi M., Seagar M.J., Jones J.F., Reber B.F.X., Catterall W.A., *Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle*, Proc Natl Acad Sci USA, 1987; 84:5478-82
- [91] ten Cate FJ., Serruys PW., Mey S., Roelandt J., *Effects of short-term administration of verapamil on left ventricular relaxation and filling dynamics measured by a combined hemodynamic-ultrasonic technique in patients with hypertrophic cardiomyopathy*, Circulation, 1983; 68:1274-1279
- [92] Thompson D., Naqvi N., Juul S., *Effects of propranolol on myocardial oxygen consumption, substrate extraction, and haemodynamics in hypertrophic obstructive cardiomyopathy*, Br Heart J, 1980; 44:488-498
- [93] Udelson JE., Bonow RO., OGara PT., et al., *Verapamil prevents silent myocardial perfusion abnormalities during exercise in asymptomatic patients with hypertrophic cardiomyopathy*, Circulation, 1989; 79:1052-1060
- [94] Varadi G., Mori Y., Mikala G., Schwartz A., *Molecular determinants of Ca<sup>2+</sup> channel function and drug action*, Trends Pharmacol Sci, 1995; 16:43-9
- [95] von Scheidt W., *Diastolische Herzinsuffizienz; Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie*, Medizinische Klinik, 1996; 91:28-35

- [96] Wagenknecht T, Radermacher M., *Ryanodine receptors: structure and macromolecular interactions*, Current Opinion in Structural Biology, 1997; 7:258-265
- [97] Wagner J.A., Sax F.L., Weissman H.F., Porterfield J., McIntosh C., Weisfeldt M.L., Snyder S.H., Epstein S.E., *Calcium antagonist receptors in the atrial tissue of patients with hypertrophic cardiomyopathy*, N Engl J Med, 1989; 320:755-61
- [98] Wei X.Y., Perez-Reyes E., Lacerda A.E., *Heterologous regulation of the cardiac calcium channel alpha1 subunit by skeletal muscle beta and gamma subunits. Implications for the structure of cardiac L-type calcium channels*, J. Biol. Chem., 1991; 266:21943-21947
- [99] Wigle E., Sasson Z., Henderson M., *Hypertrophic cardiomyopathy: the importance of the site and the extent of hypertrophy: a review*, Prog Cardiovasc Dis, 1985; 28:1-83
- [100] Williams R.W., Beeler T.J., *Secondary Structure of Calsequestrin in Solutions and in Crystals as Determined by Raman Spectroscopy*. J Biol Chem, 1986; 261:12408-12413
- [101] Williams M.E., Feldman D.H., McCue A.F., Brenner R., Velicelebi G., Ellis S.B., Harpold M.M., *Structure and functional expression of  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , and  $\beta$  subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype*, Neuron, 1992; 8:71-84
- [102] Willis CE., Holmquist GP., *Quantitative measurement of fluorescently-stained DNA in gels from photographic images*, Electrophoreses, 1985; 6:259
- [103] Zamponi G.W., Bourinet E., Nelson D., Nargeot J., Snutch T.P., *Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel  $\alpha_1$  subunit*, Nature, 1997; 385:442-6

## DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. P. Boekstegers, meinem Doktorvater, für die Ermöglichung, für die Betreuung, klinische Unterstützung und kritische Begleitung meiner Dissertation.

Ich danke der Medizinischen Klinik und Poliklinik I, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München, Abteilung Kardiologie, für die freundliche Aufnahme, Mitarbeit bei der Probengewinnung und für die Überlassung der klinischen Daten.

Meinem Betreuer Herrn PD Dr. med. Roger Hullin (aktuell kardiologische Abteilung, Inselspital Bern) danke ich für die Hilfestellung bei den experimentellen Arbeiten und die Unterstützung bei deren Analyse. Danke für den Ansporn und die kritischen Hinweise.

Der Rudolf und Brigitte Zenner Stiftung gilt mein Dank für das entgegengebrachte Vertrauen und die freundliche und grosszügige Unterstützung dieser Arbeit.

Des Weiteren gebührt mein Dank Frau Judith Arcifa (MTA) für ihre freundliche Unterstützung beim Erlernen der Versuchsdurchführungen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern und meiner Schwester, meinen lieben Freunden, insbesondere Ulrike, für ihr unermüdliches Verständnis und ihre Ermunterungen.

## FÖRDERUNG

Bei der Erstellung dieser Arbeit wurde ich finanziell unterstützt von der Rudolf und Brigitte Zenner Stiftung (c/o RAe Dr. Fritz Kempfer, Alexander Gierlinger, Bamer Strasse 48, 80799 München). Die Stiftung hat die Unterstützung von Medizin-Dissertanten und Habilitanten zum Ziel. Diese Förderung hatte kein Abhängigkeitsverhältnis jeglicher Art zur Folge und keinen Einfluss auf die wissenschaftlichen Untersuchungen und Ergebnisse.

## EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. med. P. Boekstegers

PD Dr. med. Roger Hullin,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und das Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

München, den 23.05.2005

Simon Jung

# CURRICULUM VITAE

## SIMON JUNG

### PERSÖNLICHE ANGABEN

Simon Jung

am 23.09.1977 in München geboren

### AUSBILDUNG

#### Schulzeit

1984-1988 Grundschule in Gröbenzell, Bernhard-Rößner-Straße

1988-1997 Gymnasium in Gröbenzell, Wildmoosstraße

Abitur 1997 mit der Note 1

#### Universität

1997-2003 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München

Abschluß Staatsexamen, Gesamtnote 2

### BERUFLICHE TÄTIGKEIT

02-12/2004 Tätigkeit als Arzt im Praktikum im Institut für Neuropathologie  
des Universitätsspitals Zürich, Schweiz

ab 01/2005 Tätigkeit als Assistenzarzt in der Klinik für Neurologie  
des Universitätsspitals Bern, Schweiz

München, den

Simon Jung