

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Hamburg
Direktor: Prof. Dr. T. Eschenhagen

**Identifizierung von Mechanismen der
Krankheitsentwicklung bei der familiären hypertrophen
Kardiomyopathie infolge Mutationen des Myosin-
Bindungsprotein-C**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich der Medizin
der Universität Hamburg vorgelegt von

Carolus Schenke
aus Erlangen

Hamburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 21.09.2006

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. T. Eschenhagen

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. St. Willems

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. H. Ehmke

Meiner Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Phänotyp, Morphologie und Pathologie der hypertrophen Kardiomyopathie	1
1.2	Genetik und Epidemiologie der hypertrophen Kardiomyopathie	2
1.3	Mutationen des Myosin-Bindungsprotein-C als Ursache der hypertrophen Kardiomyopathie	3
1.4	Molekulare Mechanismen der Krankheitsentstehung	5
1.5	Zielsetzung und Fragestellung	8
1.6	Versuchskonzeption	9
2	Material und Methoden	10
2.1	Adenovirusanzucht	10
2.1.1	Restriktionsverdau der Plasmid-DNA.....	11
2.1.2	Transfektion von HEK-Zellen mit adenoviralen Konstrukten	11
2.1.3	Large-scale-Präparation der Adenoviren	12
2.1.4	Aufreinigung der Adenoviren	13
2.1.4.1	<i>Caesiumchlorid -Gradientenzentrifugation</i>	<i>13</i>
2.1.4.2	<i>Dialyse.....</i>	<i>13</i>
2.1.5	DNA-Extraktion.....	13
2.1.6	Photometrische Quantifizierung der DNA	14
2.1.7	Agarose-Gelelektrophorese	15
2.1.8	Titerbestimmung an neonatalen Rattenkardiomyozyten	15
2.2	Zellpräparation	16
2.2.1	Tierhaltung	16
2.2.2	Organentnahme	16
2.2.3	Trypsinverdau.....	16

2.3	2-D Zellkulturmodell	19
2.3.1	Kultivierung der Kardiomyozyten	19
2.3.2	Adenovirale Überexpression von MyBP-C	19
2.3.3	Darstellung von MyBP-C auf mRNA-Ebene.....	19
2.3.3.1	<i>RNA-Isolierung</i>	20
2.3.3.2	<i>Agarosegelelektrophorese und Northern Blot</i>	21
2.3.3.3	<i>Radioaktive Markierung</i>	22
2.3.4	Darstellung von MyBP-C auf Protein-Ebene.....	23
2.3.4.1	<i>Proteinisolierung</i>	23
2.3.4.2	<i>SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese</i>	24
2.3.4.3	<i>Immunoblot</i>	25
2.3.5	Fraktionierungsexperimente	27
2.3.5.1	<i>Trennung Triton-löslicher und Triton-unlöslicher Proteine</i>	27
2.3.5.2	<i>Gelelektrophorese und Immunoblot</i>	27
2.3.6	Untersuchung des proteasomalen Abbauweges.....	28
2.3.6.1	<i>Behandlung der Kardiomyozyten mit MG132</i>	28
2.3.6.2	<i>Gelelektrophorese und Immunoblot</i>	28
2.4	Funktionelle Untersuchungen einer Überexpression von MyBP-C	29
2.4.1	Herstellung und Gehaltsbestimmung von Collagen I	29
2.4.2	Herstellung von Hühnerembryonenextrakt.....	29
2.4.3	Herstellung von rekonstituiertem Gewebe der neonatalen Ratte (engineered heart tissue, EHT).....	30
2.4.3.1	<i>Herstellung der Gußformen</i>	30
2.4.3.2	<i>Herstellung von EHTs</i>	31
2.4.4	Kultur und Gentransfer	33
2.4.4.1	<i>Kultur</i>	33
2.4.4.2	<i>Adenoviraler Gentransfer</i>	34
2.4.4.3	<i>Behandlung mit MG132</i>	34
2.4.5	Erfassung der Kontraktionsparameter	34
2.4.5.1	<i>Kontraktionsmessung</i>	34
2.4.5.2	<i>Datenerfassung und -verarbeitung</i>	37
2.4.6	Erfassung der Proteinexpression.....	38
2.4.6.1	<i>Proteinextraktion</i>	38
2.4.6.2	<i>Gelelektrophorese und Immunoblot</i>	38

2.5	Statistik	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Darstellung von MyBP-C in der 2D-Zellkultur	39
3.1.1	Darstellung von MyBP-C auf mRNA-Ebene	41
3.1.2	Darstellung von MyBP-C auf Protein-Ebene	42
3.1.3	Fraktionierungsexperimente	45
3.1.4	Untersuchung des proteasomalen Abbauweges	47
3.2	Funktionelle Auswirkungen einer Überexpression des Myosin- Bindungsprotein-C und der Mutanten	50
3.2.1	Untersuchung der optimalen Infektionsparameter	50
3.2.1.1	<i>Infektion der EHTs am 0. Kulturtag</i>	50
3.2.1.2	<i>Infektion der EHTs am 9. Kulturtag</i>	50
3.2.2	Behandlung der EHTs mit MG132	52
3.2.3	Bestimmung der Kontraktionsparameter	53
3.2.3.1	<i>Effekt von Calcium</i>	54
3.2.3.2	<i>Effekt von Isoprenalin</i>	57
3.2.4	Histologische Charakterisierung	60
3.2.5	Proteinexpression in EHTs	61
4	Diskussion	65
4.1	Zielsetzung und Fragestellungen dieser Arbeit	65
4.2	Darstellung von MyBP-C auf mRNA- und Proteinebene	66
4.3	Funktionelle Auswirkungen einer Überexpression des Myosin- Bindungsprotein-C und trunkierter C-Proteine	68
4.3.1	Adenoviraler Gentransfer	68
4.3.2	Kontraktionsexperimente	69
4.4	Einschränkungen und offene Fragen	73

4.5	Bedeutung der Ergebnisse für die Erforschung und Therapie der familiären hypertrophen Kardiomyopathie.....	74
5	Zusammenfassung	75
6	Literaturverzeichnis	77
7	Abkürzungsverzeichnis.....	85
8	Verzeichnis der Veröffentlichungen	88
9	Anhang	88
9.1	Substanzen	88
9.2	Hilfsmittel und Geräte	93
9.3	Ergebnistabellen	95
10	Danksagung	102
11	Lebenlauf.....	103
12	Erklärung.....	104

1 Einleitung

1.1 Phänotyp, Morphologie und Pathologie der hypertrophen Kardiomyopathie

Als Kardiomyopathien bezeichnet man primäre Herzmuskelerkrankungen, deren Kennzeichen systolische und diastolische Funktionsstörungen sind, welche mit Veränderungen der Myokardstruktur vergesellschaftet sind. Laut WHO-Definition unterscheidet man vier Untergruppen: die hypertrophe Kardiomyopathie, die dilatative Kardiomyopathie, die restriktive Kardiomyopathie und die arrhythmogene Kardiomyopathie (Richardson et al. 1996).

Gegenstand dieser Arbeit war die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM), für die ein breites Spektrum an klinischen Verläufen, Schweregraden und Komplikationen typisch ist. So kann sich eine HCM durch Symptome wie allgemeine Müdigkeit, Leistungsminderung, Dyspnoe, Angina pectoris-Anfälle sowie ventrikuläre Arrhythmien bis hin zu ventrikulären Tachykardien mit Schwindel und Synkopen bemerkbar machen. In einigen Fällen können klinische Symptome jedoch auch ganz fehlen. Die am meisten gefürchtete Komplikation ist der plötzliche Herztod, meist als Folge von Kammerflimmern. Man schätzt das Risiko bei HCM-Patienten auf 3% pro Jahr. So ist die HCM die häufigste Ursache des plötzlichen Herztodes bei Athleten und Jugendlichen (Maron et al. 1980/1987).

Pathomorphologisch zeigt sich bei der HCM häufig eine ausgeprägte asymmetrische linksventrikuläre Hypertrophie unter Bevorzugung des Interventrikularseptums. Diese kann echokardiographisch zuverlässig festgestellt und beurteilt werden (Maron et al 1984/1987). Histologisch findet sich ein Verlust der regelmäßigen und parallelen Anordnung der Kardiomyozyten im Myokardgewebe (*disarray*). Der damit verbundene Verlust der Zytoplasmabrücken zwischen den Zellen (*gap junctions*) könnte für Störungen der Erregungsausbreitung im Ventrikelmyokard verantwortlich sein. Weitere charakteristische Veränderungen sind eine interstitielle Fibrosierung sowie Verdickungen der Media kleiner Herzgefäße.

Bedingt durch eine verminderte Dehnbarkeit des hypertrophen Myokards zeigt sich pathophysiologisch bei der HCM vor allem eine diastolische Funktionsstörung. Der durch diese Störung verursachte erhöhte diastolische Füllungsdruck kann sich retrograd in

Herzvorhöfe, Lungengefäßsystem und zentrales Venensystem fortsetzen.

1.2 Genetik und Epidemiologie der hypertrophen Kardiomyopathie

Bereits seit mehreren Jahrzehnten ist ein familiär gehäuftes Auftreten der HCM bekannt (Evans W. 1949, Hollmann et al. 1959). Von familiärer hypertropher Kardiomyopathie spricht man, wenn bei einem Patienten mit HCM familienanamnestisch mindestens ein weiteres betroffenes Familienmitglied mit primärer Myokardhypertrophie identifiziert werden kann (Maron et al. 1987). Bei mehr als der Hälfte der Fälle wird ein autosomal-dominanter Vererbungsmodus angenommen (Maron et al. 1987). Des Weiteren sind auch Fälle von Neumutationen bekannt, die bei den Angehörigen des Patienten nicht nachweisbar waren (Watkins et al. 1992). Die Penetranz, welche die Tendenz zur Ausprägung von typischen Symptomen bei genetischen Merkmalsträgern beschreibt, ist bei Kindern und jungen Patienten meist unvollständig. Mit zunehmendem Alter der Patienten erreicht sie jedoch fast 100% (Vosberg 1998).

Bei der familiären hypertrophen Kardiomyopathie handelt es sich um eine Erkrankung mit weltweiter Verbreitung. Beispielsweise zeigte eine Untersuchung der allgemeinen Bevölkerung in Minnesota, USA ein schweres Krankheitsbild in einer Häufigkeit von etwa 1:5000 (Codd et al. 1989). Nach neueren epidemiologischen Untersuchungen mittels eines Bevölkerungsscreenings, welches auch leichtere und asymptomatische Krankheitsfälle mit einbezieht, erhöht sich die Prävalenz der HCM auf etwa 1:500 (Maron et al. 1995). Somit würde die Disposition zur hypertrophen Kardiomyopathie zu den häufigsten dominant erblichen Gesundheitsrisiken des Menschen gehören.

Durch gezielte molekulargenetische Untersuchung betroffener Familien konnte in den letzten Jahren die Fehlbildungsgrundlage auf verschiedenen Chromosomen nachgewiesen und lokalisiert werden (Carrier et al. 1993). Bis heute konnten bei HCM-Patienten mehr als 200 verschiedene Mutationen in 14 verschiedenen Genen auf verschiedenen Chromosomen identifiziert werden (Tabelle 1). Da der Großteil der zahlreichen Mutationen sarkomerische Proteine kodierende Gene betrifft, wurde die HCM auch als eine Krankheit des Sarkomers bezeichnet (Thierfelder et al. 1994). Mittlerweile ist bekannt, dass in seltenen Fällen auch Mutationen in Genen nicht-sarkomerischer Proteine eine HCM auslösen können (Marian und Roberts 2001).

Tabelle 1: Die häufigsten genetischen Ursachen der hypertrophen Kardiomyopathie.

Protein	Gen	Locus	Häufigkeit
Schwere Myosinkette, β -Isoform	<i>MYH7</i>	14q12	~ 40%
Myosin-Bindungsprotein-C	<i>MYBPC3</i>	11p11.2	~ 40%
Kardiales Troponin T	<i>TNNT2</i>	1q32	~ 5%
Kardiales Troponin I	<i>TNNI3</i>	19p13.2	~ 5%
Tropomyosin, α -Isoform	<i>TPM1</i>	15q22.1	< 5%
Regulatorische leichte Myosinkette	<i>MYL2</i>	12q23	< 5%
Kardiales α -Aktin	<i>ACTC 1</i>	1q	< 5%
Titin	<i>TTN</i>	2q24.1	< 2%
Essentielle leichte Myosinkette	<i>MYL3</i>	3p21	< 1%
Untereinheit der Proteinkinase A	<i>PRKAG2</i>	7q22-q31.1	< 1%
Mitochondriale DNA	<i>MTTI</i>	Mitochondrial	< 1%

Tabelle modifiziert nach Marian und Roberts 2001, Richard et al. 2003

1.3 Mutationen des Myosin-Bindungsprotein-C als Ursache der hypertrophen Kardiomyopathie

Das herzspezifische Myosin-Bindungsprotein-C (cMyBP-C) wurde als eines der betroffenen Proteine identifiziert (Bonne et al. 1995, Watkins et al. 1995). Mutationen im kodierenden Gen (Name des Gens: *MYBPC3*) wurden neben Mutationen im Gen der schweren Kette des β -Myosin als eine der häufigsten Ursachen der hypertrophen Kardiomyopathie erkannt (Carrier et al. 1998). In der bislang größten Studie konnten Richard et al. (2003) Mutationen im *MYBPC3* Gen bei 42% der Patienten mit HCM

beobachten. Im Vergleich zu Mutationen anderer HCM-verursachender Gene wurden Mutationen im *MYBPC3* Gen häufiger bei Patienten mit einem milden Krankheitsverlauf beobachtet, bei denen die klinische Ausprägung der Erkrankung erst im hohen Erwachsenenalter manifest wurde (Niimura et al. 1998, Charron et al. 1998).

Beim MyBP-C (C-Protein) handelt es sich um ein sarkomerisches Protein, das 1973 von Offer et al. erstmals beschrieben wurde und von dem drei verschiedene Isoformen existieren. Man unterscheidet die langsame und schnelle Skelettmuskelisoform sowie die kardiale Isoform, welche jeweils von verschiedenen Genen kodiert werden.

Das kardiale MyBP-C ist ein etwa 144 kDa schweres Muskelprotein, das wie viele andere sarkomerische Proteine zur Familie der intrazellulären Immunglobuline gehört. Wie in Abb. 1 ersichtlich, zeigt es einen modularen Aufbau und besteht aus acht Immunglobulin(Ig)- und drei Fibronektin(fn-3)-Domänen (Gautel et al. 1995).

Zahlreiche Befunde unterstreichen die strukturelle und regulatorische Bedeutung des MyBP-C, welches 2-4% der myofibrillären Proteine repräsentiert. MyBP-C ist an der Bildung und Stabilisierung der dicken Filamente in der Muskulatur durch vielfältige Protein-Protein-Interaktionen beteiligt. So bindet das MyBP-C mit seinem C-Terminus an Myosin und Titin, was seine Lokalisation innerhalb der Sarkomere in der C-Zone der A-Banden (Carrier et al. 1998) erklärt. Das kardiale MyBP-C wird durch cAMP- und calmodulinabhängige Proteinkinasen phosphoryliert, wodurch die kontraktile Funktion des Herzmuskels beeinflusst wird (Kunst et al. 2000). Die Phosphorylierungsstellen liegen in der N-terminalen Region des Proteins, dem sog. MyBP-C-Motiv, welches die C1 und die C2 Domäne verbindet. Diese unter den Spezies hochkonservierte Region interagiert mit dem S2-Segment des Myosins (Gruen und Gautel 1999).

Bislang wurden mindestens 14 Mutationen im kardialen MyBP-C-Gen (*MYBPC3*) auf Chromosom 11 beschrieben. Der Großteil dieser Mutationen sind Deletionen bzw. Insertionen oder Mutationen im Bereich der Spleißstellen, die ein Verschieben des Leserasters verursachen. Dies wiederum hat in den meisten Fällen Trunkierungen des MyBP-C mit Verlust der C-terminalen Myosin- und Titin-Bindungsdomänen zur Folge (Carrier et al. 1997; Gilbert et al. 1999).

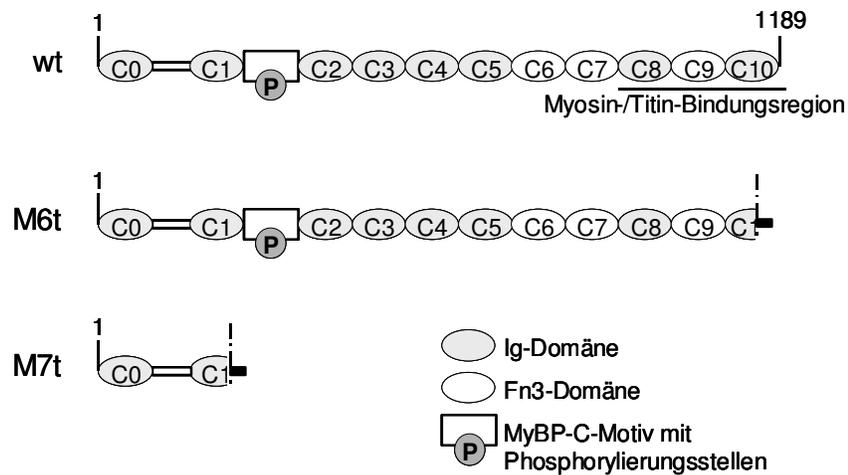


Abb. 1: Struktur des kardialen Wildtyp-Myosin-Bindungsprotein-C und zweier Mutationen des Myosin-Bindungsprotein-C.

1.4 Molekulare Mechanismen der Krankheitsentstehung

Obwohl verschiedene Gene und Mutationen als Ursache der HCM identifiziert wurden, sind die pathogenen Mechanismen der Krankheit noch weitestgehend unbekannt. Auch zeigt sich ein breites Spektrum von Verläufen, Schweregraden und Komplikationen, selbst wenn die Mutationen ein und dasselbe Gen betreffen.

Aufgrund des dominanten Erbgangs besitzen Patienten neben dem mutierten ein nichtmutiertes Allel. Für die Entwicklung einer dominanten Wirkung gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Eine bietet die so genannte *Poison polypeptide*-Hypothese. Sie geht davon aus, dass in den Kardiomyozyten neben den normalen auch dysfunktionale Proteine vorhanden sind und die Anwesenheit der mutierten Proteine Fehlfunktionen des gesamten sarkomerischen Multiproteinkomplexes zur Folge hat. Man spricht hierbei auch von dominant-negativer Wirkung. Hinweise auf diesen Mechanismus zeigten sich bei von Gilbert et al. (1996) durchgeführten Transfektionsstudien an Skelettmyoblasten mit trunkierten cDNA-Konstrukten des MyBP-C. Es zeigte sich, dass die Expression C-terminal deletierter Mutanten zu Störungen von Zelldifferenzierung und Myofibrillensynthese bei den transfizierten Zellen führte, obwohl das mutierte MyBP-C

nicht in die Sarkomere eingebaut wurde, sondern diffus im Zytoplasma nachweisbar war. Die von den Skelettmyoblasten synthetisierten trunkierten Proteine konnten mittels Westernblot nachgewiesen werden.

Grundlage einer alternativen Hypothese ist, dass eine Mutation einen Proteinverlust zur Folge hat. Das mutierte Genprodukt könnte entweder gar nicht oder als inaktives Fragment entstehen bzw. umgehend wieder abgebaut werden. In beiden Fällen wäre das mutierte Gen funktionell ein Nullallel und die gestörte Gesamtaktivität wäre Folge eines Mangels an normalen Genprodukten, einer so genannten Haploinsuffizienz (Vosberg 1998). So untersuchten Yang et al. (1998) transgene Mauslinien, die trunkierte Formen des herzspezifischen MyBP-C exprimierten. Das transgene Protein, dem die Myosin- und Titin-Bindungsdomäne fehlte, war stabil, wurde jedoch nicht effektiv in die Sarkomere integriert. Des Weiteren führte die Überexpression des mutierten MyBP-C zu einer Abnahme des endogenen C-Proteins. Dies könnte die Ursache der verminderten Kontraktilität sowie der nachgewiesenen Veränderungen der Sarkomerstruktur sein. Auch war es nicht möglich, in Myokardbiopsien von HCM-Patienten das C-terminal trunkierte Protein im Westernblot nachzuweisen, obwohl die entsprechende mRNA exprimiert wurde (Rottbauer et al. 1997, Moolman et al. 2000). Diese Befunde sprechen für einen vermehrten Abbau der mutierten Proteine, wodurch sich möglicherweise das stöchiometrische Verhältnis der kontraktilen Proteine zueinander verändert und der normale Aufbau der Sarkomere beeinträchtigt wird. Jedoch war die Konzentration des normalen MyBP-C in Myokardbiopsien von HCM-Patienten im Vergleich zu Referenzproben unverändert (Rottbauer et al. 1997). Diese Ergebnisse wiederum sprechen eher gegen eine Haploinsuffizienz.

Jüngere Daten geben zusätzlich zu der Vermutung Anlass, dass mutiertes MyBP-C nicht nur indirekt durch Störung des Aufbaus der Sarkomere, sondern auch unmittelbar die kontraktile Funktion der Sarkomere beeinträchtigt. Kunst et al. (2000) untersuchten die Wirkung eines N-terminalen, die Phosphorylierungsstellen einschließenden (C1-C2) Fragmentes des MyBP-C auf die Kontraktionskraft von Triton-gehäuteten Muskelfasern. Diffusion des nicht-phosphorylierten Peptides in die Muskelfasern verursachte eine Abnahme der Ca^{2+} -abhängigen maximalen Kontraktionskraft und eine Zunahme der Ca^{2+} -Sensitivität. Diese Effekte waren hingegen nicht nachweisbar, wenn die MyBP-C-Fragmente zuvor PKA-abhängig phosphoryliert wurden. Demnach regulieren N-terminale

MyBP-C-Fragmente direkt und phosphorylierungsabhängig die Kontraktilität des Herzmuskels. Die Ergebnisse dieser Studie geben jedoch auch Hinweise darauf, dass die charakteristischen histologischen Myokardveränderungen bei HCM-Patienten, wie myofibrilläre Disorganisation und interstitielle Fibrosierung, möglicherweise erst sekundär entstehen. Demnach besteht zunächst eine Störung im Ablauf der Kontraktion, welche nicht zwingend die Folge von abnormen Sarkomerstrukturen sein muss. Erst sekundär, als Kompensationsreaktion der Zellen zum Ausgleich leichter Leistungsdefizite bei der Kontraktion, kommt es zur Hypertrophie und zum Verlust der normalen Anordnung der Zellen und der kontraktilen Elemente (Vosberg 1998). Zur Erklärung der Pathogenese wäre also zwischen primären Dysfunktionen und sekundären funktionellen und morphologischen Veränderungen des Myokards zu unterscheiden. Diese Hypothese wird gestützt durch Befunde von Patel et al. (2001). Die Autoren führten Versuche an einem Tiermodell der menschlichen HCM (β -MHC-Q⁴⁰³ transgene Kaninchen) durch und zeigten, dass pathologische Veränderungen, wie myokardiale Hypertrophie, interstitielle Fibrose und kontraktile Dysfunktion durch eine Pharmakotherapie mit dem HMG-CoA-Reduktaseinhibitor Simvastatin aufgehoben werden konnten. Da die medikamentöse Therapie keinen Einfluß auf den genetischen Defekt hat, spricht dieser Befund dafür, dass in diesem Tiermodell wesentliche pathophysiologische Veränderungen sekundärer, also adaptiver Natur sind.

1.5 Zielsetzung und Fragestellung

Die widersprüchlichen Befunde bisheriger Studien geben keine eindeutige Antwort auf die Frage nach den Mechanismen, die initial an der Krankheitsentwicklung der hypertrophen Kardiomyopathie infolge von Mutationen des MyBP-C beteiligt sind. Zur Abschätzung der Prognose des Patienten, zur Therapieplanung und gegebenenfalls zur Entwicklung neuer Therapiestrategien ist es daher notwendig, die molekularen Mechanismen der Pathogenese der HCM besser zu verstehen.

Daher lässt sich das Ziel dieser Arbeit wie folgt zusammenfassen:

Identifizierung von Mechanismen der Krankheitsentwicklung bei der familiären hypertrophen Kardiomyopathie infolge Mutationen des Myosin-Bindungsprotein-C

Exemplarisch wurden dazu zwei typische Mutationen des MyBP-C untersucht, die beim Menschen zur Ausbildung einer HCM führen (siehe Abb. 1): M6t (12 bp Insertion, 4 bp Deletion in Exon 33) und M7t (Deletion von Exon 6). Aus diesen Mutationen resultieren C-terminal um 3% bzw. 80% verkürzte Formen des MyBP-C.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Sind die aufgrund von Mutationen im MyBP-C-Gen veränderten MyBP-C-Transkripte und Proteine stabil und werden die veränderten Proteine in die Sarkomere integriert?
2. Beeinträchtigen Mutationen des MyBP-C die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten?

1.6 Versuchskonzeption

Angesichts der eingeschränkten Verfügbarkeit menschlichen Biopsiematerials ist es notwendig, die Mechanismen der Krankheitsentstehung an einem geeigneten Modellsystem zu untersuchen.

Neben dem zweidimensionalen Standardzellkulturmodell steht in unserer Arbeitsgruppe das 1997 von Eschenhagen et al. erstmals publizierte und inzwischen erfolgreich weiterentwickelte (Zimmermann et al. 2000) Modell des *engineered heart tissue* (EHT) zur Verfügung, welches es ermöglicht, *in vitro* funktionstüchtiges künstliches Herzgewebe aus Herzmuskelzellen neonataler Ratten herzustellen. Dieses Zellkulturmodell verfügt über eine Reihe von Eigenschaften, die zur Untersuchung der oben genannten Fragestellung von Vorteil sind. So handelt es sich bei den EHTs um eine hochvernetzte, dreidimensionale, elektrisch verbundene und somit den physiologischen Verhältnissen *in vivo* nahe kommende Struktur, welche über Tage bis Wochen stabil bleibt. Bei den neonatalen Rattenkardiomyozyten in den EHTs kommt es im Laufe der Kultivierung zur Ausbildung eines relativ reifen Phänotyps und infolgedessen zum Aufbau einer geordneten Myofilamentstruktur (Zimmermann et al. 2002). Des Weiteren ist ein adenoviraler Gentransfer mit hoher Effizienz möglich und die Herstellung entsprechender adenoviraler Vektoren ermöglicht folglich, mutiertes MyBP-C zur Expression zu bringen. Überdies sind die eingebetteten Kardiomyozyten einer mikroskopischen Untersuchung *in situ* relativ gut zugänglich und ihre Proteine sind ohne größere Schwierigkeiten aufzuschließen. Außerdem erlauben EHTs aufgrund ihrer mechanischen Festigkeit und ihrer geometrischen Form gut reproduzierbare Messungen ihrer kontraktile Parameter unter isometrischen Bedingungen in Standardorganbädern. Da es sich um ein Zellkultursystem mit isolierten Herzzellen handelt, kann eine Beeinflussung der gemessenen Effekte durch hämodynamische oder durch andere Organe bedingte Störeffekte ausgeschlossen werden.

2 Material und Methoden

Alle verwendeten Materialien, Hilfsmittel und Geräte sind, soweit nicht bereits im Text erwähnt, im Anhang unter Punkt 9.1 und 9.2 tabellarisch aufgeführt. Alle Arbeitsschritte wurden, wenn nicht anders im Text angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.1 Adenovirusanzucht

Die Wildtyp-cDNA der humanen kardialen Isoform des MyBP-C sowie die cDNA verschiedener Mutationen des MyBP-C wurden dankenswerter Weise vom Labor von Dr. Lucie Carrier, INSERM U-523, Institut de Myologie, Paris, zur Verfügung gestellt.

Es wurden exemplarisch zwei verschiedene bei Patienten mit HCM identifizierte Mutationen untersucht (siehe Abb.1): M6t (12 bp Insertion, 4 bp Deletion in Exon 33) und M7t (Deletion von Exon 6). Unter Verwendung der entsprechenden cDNA wurden in unserem Labor rekombinante, replikationsdefiziente Adenoviren hergestellt, die Wildtyp- oder mutiertes MyBP-C sowie *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) jeweils unter der Kontrolle eines Cytomegalovirus-Promotors exprimieren. Die Herstellung der verschiedenen Adenoviren erfolgte nach dem von He et al. (1998) publizierten Verfahren. Die entsprechende cDNA wurde zunächst in den Shuttle-CMV-Vektor (pAdTrack-CMV) subkloniert, welcher auch EGFP unter der Kontrolle eines CMV-Promotors beinhaltet, um später die Identifikation der infizierten Zellen möglich zu machen. Des Weiteren wurde dem Startcodon folgend die Sequenz eines myc-Tags eingefügt, um später die Unterscheidung des endogenen von dem adenoviral überexprimierten MyBP-C zu ermöglichen. Anschließend erfolgte die Rekombination des Shuttle-MyBP-C-Plasmids mit dem adenoviralen Vektor pAdEasy. Der Erfolg der Subklonierung und der Rekombination wurde durch Restriktionsanalysen bzw. Sequenzierung überprüft.

Die Transfektion sowie die Aufzucht und Vermehrung der Adenoviren erfolgte in der Nierenzelllinie HEK 293, welche *in vitro* durch Adenovirus-E1-Transformation aus humanen Nierenzellen hergestellt wird (Graham et al. 1977).

2.1.1 Restriktionsverdau der Plasmid-DNA

Um die adenovirale Plasmid-DNA zu linearisieren, erfolgte zunächst ein Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuclease *PacI*.

Ansatz für *PacI*-Verdau:

10 µg Plasmid-DNA, 10 µl 10x Reaktionspuffer No.1, 10 µl 10x bovines Serumalbumin (BSA), 5 µl *PacI*, USF-Wasser ad 100 µl.

Der Ansatz wurde bei 37 °C für 2 h inkubiert. Anschließend wurde die DNA in Ethanol gefällt, 1 µl Glycogen als Trägermolekül hinzupipettiert, die Probengefäße 15 sec geschüttelt (Vortex) und für 30 min bei 4 °C mit 20800 g zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg). Schließlich wurde der Überstand komplett abgesaugt, das Pellet 10 min an der Luft getrocknet und in 15 µl Aqua ad iniectionabilia resuspendiert.

2.1.2 Transfektion von HEK-Zellen mit adenoviralen Konstrukten

Die Aufnahme der adenoviralen Plasmid-DNA wurde durch eine Liposomen-vermittelte Transfektion erreicht (Felgner et al. 1987). Hierbei bildet die DNA Komplexe mit artifiziellen Liposomen, welche über eine Verschmelzung mit der Plasmamembran eine Aufnahme der DNA in die Zellen vermitteln.

HEK 293 Zellen wurden im Zellkulturschrank bis zu einer Kohärenz von 70% kultiviert (Ø 35 mm Zellkulturschalen). Nach Absaugen des HEK- Nährmediums und der Zugabe von 1000 µl OptiMEM je Schale erfolgte eine Inkubation der Zellen bei 37 °C für 60 min. In zwei Probengefäße wurde parallel zu jeweils 250 µl OptiMEM 10 µg Plasmid-DNA bzw. 6 µl Lipofectamine2000 pipettiert. Dem Schütteln der Probegefäße für 60 sec (Vortex) folgte eine Inkubation von 5 min bei RT. Anschließend wurden beide Ansätze gemischt, erneut geschüttelt und schließlich für 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Ansatzes zu den bereits mit OptiMEM versorgten HEK 293 Zellen. Nach 6 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und durch frisches HEK-Medium ersetzt. Der Erfolg der Transfektion konnte in den folgenden Tagen anhand der EGFP-Expression immunfluoreszenzmikroskopisch überprüft werden.

Nach 9 bis 11 Tagen lösten sich die Zellen von den Zellkulturschalen und begannen zu lysieren.

HEK-Nährmedium:

Dulbeccos Minimal Essential Medium (DMEM), 10% Hitze-inaktiviertes FKS, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin G/ Streptomycin (P/S).

2.1.3 Large-scale-Präparation der Adenoviren

Die nun freigesetzten replikationsdefizienten Adenoviren konnten nur in der E1-komplementierenden Zelllinien HEK 293 vermehrt werden. Nach vollständiger Lyse der transfizierten Zellen wurde das nun die Adenoviren enthaltende Medium abgenommen, zentrifugiert (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg; 2000 g, 3 min, 4 °C) und mit dem Überstand eine größere Zellkulturschale (Ø 6 cm) infiziert. Auf diese Art erfolgte die Infektion immer größerer Mengen von HEK 293 Zellen und schließlich die Large-scale-Präparation der Adenoviren. Für die Large-scale-Präparation wurden 40 Zellkulturschalen (Ø 15cm) infiziert. Nach Ablösung von etwa 70% der HEK 293 Zellen vom Boden der Zellkulturschalen wurden die noch anhaftenden Zellen mit einer weitlumigen Pipette vorsichtig abgespült und samt Überstand in 175 ml Sammelgefäße (Falcon, Heidelberg) überführt. Im Anschluss wurden die Sammelgefäße in einer Kühlzentrifuge mit Schwenkbecherrotor zentrifugiert (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg; 60 g, 15 min, 4 °C). Der klare Überstand wurde abgenommen, die Pellets vorsichtig in jeweils 20 ml PBS resuspendiert, in ein Sammelgefäß überführt und erneut für 15 min bei 60 g und 4 °C zentrifugiert. Nach der Abnahme des Überstandes wurde der Bodensatz schließlich in 5 ml PBS resuspendiert.

Zur Lyse der HEK 293 Zellen wurde das Sammelgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren, anschließend wieder aufgetaut und geschüttelt (Vortex). Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt. Schließlich wurde das Lysat in kleine Probengefäße überführt und 5 min bei 16000 g zentrifugiert (Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg).

Phosphat-gepufferte physiologischer Kochsalzlösung (PBS):

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na₂HPO₄(H₂O)₇, 0,2 g KH₂PO₄, USF-Wasser ad 1000 ml; pH mit HCl auf 7,4 einstellen; autoklavieren.

2.1.4 Aufreinigung der Adenoviren

2.1.4.1 Caesiumchlorid -Gradientenzentrifugation

Zur Aufreinigung der Adenoviren wurde der Überstand zunächst auf einen diskontinuierlichen Caesiumchlorid(CsCl)- Gradienten (leichte Phase 22,4% w/w, schwere Phase 42,2% w/w jeweils in 50 mM Tris, pH 7,4) aufgetragen. Nach einer Zentrifugation bei 27000 g und 4 °C über Nacht (Ultrazentrifuge Beckmann L7-65 mit Schwingbecherrotor SW 40) bildeten sich in den Zentrifugenröhrchen zwei Banden aus, deren untere mit Hilfe von Injektionskanülen abgezogen werden konnte.

2.1.4.2 Dialyse

Das Zentrifugat wurde anschließend über Nacht zweimal gegen PBS dialysiert (Dialysekassetten Slide-A-Lyser MWCO 7 kDa). Das Dialysat wurde mit dem gleichen Volumen an zweifach konzentriertem *Virus Storage Buffer* (VSB) verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Ein Teil des Dialysats wurde für die DNA-Präparation entnommen.

Zweifach konzentrierter VSB:

10 mM Tris pH 8,0; 100 mM NaCl; 0,1% bovines Serumalbumin (BSA), 50% Glycerol.

2.1.5 DNA-Extraktion

Zur DNA-Präparation wurden zunächst 250 µl Virus-Dialysat mit 350 µl TNE-Puffer versetzt. Um die Viruskapsel zu zerstören wurden 60 µl SDS (10%) zugegeben und die Proben für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 66 µl 2,5 M beta-Mercaptoethanol zur Spaltung der Disulfidbrücken der Proteine erfolgte eine Inkubation von 30 min bei 37 °C. Im Anschluss wurden 19,5 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben und die Proben erneut bei 37 °C für 30 min inkubiert.

Alle weiteren Schritte der DNA-Extraktion wurden auf Eis ausgeführt. Zunächst erfolgte die Zugabe von 800 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; pH 7,5); daraufhin wurden die Probengefäße für 30 sec geschüttelt (Vortex) und anschließend zur Beschleunigung der Phasenauffrennung für 5 min bei 4 °C mit 12000 g zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg). Danach wurde die hydrophile, DNA-haltige Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Die hydrophobe, phenolische Phase wurde gesondert entsorgt. Der Überstand wurde mit 800 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt um das restliche Phenol auszuwaschen, kurz geschüttelt (Vortex), erneut für 5 min bei 4 °C mit 12000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Nach Zugabe von 600 µl Isopropanol und 60 µl 3 M Natriumacetat pH 5,4 wurde die DNA bei -20°C für 2 h gefällt. Anschließend wurde die DNA mit 20800 g bei 4 °C für 30 min pelletiert, der klare Überstand verworfen und das Pellet in 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 4 °C, 20.800 g) wurde der Überstand komplett abgesaugt, die DNA für 10 min an der Luft getrocknet und schließlich in 20 µl Aqua ad iniectabilia gelöst.

TNE-Puffer:

200 µl 5 M NaCl; 100 µl 1 M TrisHCl pH 7,4; 20 µl 0,5 M EDTA und 9,7 ml Aqua ad iniectabilia.

2.1.6 Photometrische Quantifizierung der DNA

Um den Virustiter abschätzen zu können wurde die Virus-DNA-Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch ermittelt. Zur Bestimmung des Reinheitsgrades der isolierten DNA wurde gleichzeitig die optische Dichte bei 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine) gemessen und der Quotient OD 260/OD 280 gebildet, der bei allen Messungen zwischen 1,7 und 2,0 lag.

21 µg (1 pmol) Virus-DNA entsprechen $6,23 \times 10^{11}$ Viruspartikeln, von denen etwa 1/30 biologisch aktiv sind. Der somit errechnete Titer biologisch aktiver Viren (bav) lag bei den verschiedenen Präparationen zwischen 2×10^{10} und 2×10^{11} bav/ml.

2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der photometrisch ermittelten Virus-DNA-Konzentration und um eine etwaige DNA-Degradation auszuschließen wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Je 50 ng Virus-DNA sowie 10, 20, 30, 40 und 50 ng Standard-DNA (linearisierte DNA des adenoviralen Vektor AdEasy) wurden in 10 µl Aqua ad iniectionem aufgenommen und mit 2 µl DNA-Ladepuffer versetzt. Anschließend wurden die Proben sowie 2 µl eines DNA-Längenstandards auf ein 0,7%iges Agarosegel aufgetragen und 2 h bei einer konstanten Spannung von 45 V in 1 x Tris-Acetat-EDTA (TAE-) Puffer aufgetrennt. Zur Dokumentation wurden die mit Ethidiumbromid gefärbten Gele unter UV-Beleuchtung photographiert. Neben der Beurteilung der Qualität der Präparation und der ermittelten DNA-Konzentration konnte so eine Degradation oder Verunreinigungen der DNA ausgeschlossen werden.

10x TAE-Puffer:

48,46 g Tris-Acetat, 3,72 g EDTA; USF-Wasser ad 1000 ml; pH 8,0.

1x TAE-Puffer:

100 ml 10x TAE-Puffer, USF-Wasser ad 1000 ml.

0,7%iges Agarosegel:

0,7 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer unter leichtem Aufkochen lösen und anschließend 2 µl Ethidiumbromid hinzupipettieren.

2.1.8 Titerbestimmung an neonatalen Rattenkardiomyozyten

Zur Überprüfung der Effizienz des Gentransfers wurden neonatale Rattenkardiomyozyten mit den verschiedenen Viren und mit unterschiedlichen Titern (*multiplicity of infection*, MOI zwischen 1 und 50) infiziert wie unter 2.3.2 beschrieben. Nach 48 h erfolgte die Kontrolle der Infektionseffizienz mittels eines konfokalen Lasermikroskops (Axiovert 100, Zeiss, Jena) anhand der Grünfluoreszenz (EGFP-Expression).

2.2 Zellpräparation

2.2.1 Tierhaltung

Männliche und weibliche Wistar-Ratten aus Eigenzucht des Instituts für Pharmakologie der Universität Erlangen-Nürnberg wurden bei handelsüblichem Labortierfutter (Altromin®) und Leitungswasser ad libitum gehalten. Für die Versuchsdurchführung wurden je Präparation zwischen 20 und 170 neonatale Tiere aus verschiedenen Würfen im Alter von 1 bis 3 d verwendet.

2.2.2 Organentnahme

Nach Dekapitation der Tiere und Eröffnung des Thorax durch Sternotomie erfolgte die zügige Entnahme des gesamten Herzens. Anschließend wurden diese umgehend in gekühltem calcium- und bicarbonatfreiem Hanks Puffer mit HEPES (CBFHH) gelagert.

CBFHH:

136,9 mM NaCl, 5,36 mM KCl, 0,81 mM $MgSO_4(H_2O)_7$, 5,55 mM Glucose, 0,44 mM KH_2PO_4 , 0,34 mM $Na_2HPO_4(H_2O)_7$, 20 mM [2-Hydroxyethyl]piperazin -N-[2-ethansulfonsäure] (HEPES) gelöst in destilliertem, deionisiertem und pyrogenfreiem Wasser (Aqua ad iniectabilia), pH 7,5. Zur Herstellung wurden Stammlösungen benutzt, die mit Aqua ad iniectabilia angesetzt und autoklaviert wurden. Die Glucose- und HEPES-Stämme, welche nicht autoklavierbar sind, wurden steril filtriert. Stammlösungen und CBFHH wurden bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

2.2.3 Trypsinverdau

Nach der Herzentnahme erfolgten die Zellpräparation und die anschließende Zellkultur unter sterilen Bedingungen. Zur Antibiose wurden Penicillin G und Streptomycin (P/S; 10000 U/ml und 10000 µg/ml) eingesetzt. Alle für den Verdau verwendeten Lösungen wurden vor jeder Präparation frisch angesetzt, steril filtriert oder autoklaviert. Das Präparationsbesteck (Scheren, Pinzetten) sowie das später verwendete Zellsieb wurden vor jeder Präparation autoklaviert.

Nach Säuberung der Herzen wurden der Gefäßstiel sowie die Vorhöfe abgetrennt, in eine neue Kulturschale mit CBFHH überführt und in der Mitte zweigeteilt. Nach dreimaligem Spülen mit je 10 ml CBFHH erfolgte die Zerkleinerung der Herzen mit einer gebogenen chirurgischen Präparationsschere bis auf eine Größe von etwa 1mm^2 . Mit einer mit CBFHH benetzten, weitlumigen Pipette wurde der Gewebebrei in ein 50 ml Sammelgefäß (Falcon, Heidelberg) transferiert, in dem nach weiterem dreimaligem Spülen mit je 10 ml CBFHH anschließend der enzymatische Gewebeaufschluss mit Trypsin nach einer modifizierten Methode von Webster et al. (1993) erfolgte. Die zerkleinerten Gewebestücke wurden mit 10 ml (bei 60-70 Herzen) Trypsin-Arbeitslösung versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur auf einer Kippwippe (Desaga SM1, Sarstedt, Nümbrecht; Neigungswinkel 15° , 60 Kippbewegungen/min) unter kontinuierlichem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde der trübe Überstand verworfen. Nach Resuspension der Gewebestücke in 10 ml Trypsin-Arbeitslösung und 10 min Inkubation unter fortwährendem Schwenken erfolgte erstmalig die Überführung des Überstandes in ein steriles 50 ml Sammelgefäß, das bereits 2 ml Hitze-inaktiviertes fetales Kälberserum (FKS) zur Inaktivierung des Trypsins enthielt. Nach Inkubation der Gewebestücke in 9 ml Trypsin-Arbeitslösung und Trituierung (25x; weitlumige Pipette) wurde der Überstand ebenfalls in das Sammelgefäß überführt. Bei den weiteren Inkubationen mit Trypsin-Arbeitslösung wurde der Überstand bei Einsetzen einer Trübung nach etwa 3 bis 5 min abgenommen, um einen Überverdau zu vermeiden. Dieser Wechsel von Proteinverdau und Inaktivierung des Trypsins durch in der DNase-Arbeitslösung enthaltenes FKS erfolgte unter Reduktion der Volumina in 0,5 ml Schritten auf 6 ml (Trypsin-Arbeitslösung) bzw. 5 ml (DNase-Arbeitslösung), jeweils nach Füllung eines Sammelgefäßes. Die Durchführung des kompletten Verdau der Gewebestücke dauerte bei 60-70 Herzen im Mittel 4 h. Gefüllte Sammelgefäße wurden währenddessen auf Eis gelagert.

Im Anschluss an den Verdau wurden die Sammelgefäße in einer Kühlzentrifuge mit Schwenkbecherrotor zentrifugiert (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg; 60 g, 15 min, 4°C). Nach Abnahme des klaren Überstandes erfolgte die Resuspension der pelletierten Zellen in jeweils 2 ml Nicht-Kardiomyozyten-Medium (NKM) sowie das Poolen in einem Sammelgefäß (50 ml). Noch vorhandene extrazelluläre DNA wurde durch Zugabe von 0,8% des Gesamtvolumens an DNase-Stammlösung verdaut, und wiederum bei 60 g und 4°C für 15 min zentrifugiert und nach Absaugen des Überstands in 32 ml NKM aufgenommen. Die Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb (Maschengröße: $250\ \mu\text{m}$)

gegeben und das Sammelgefäß und das Sieb mit 10 ml NKM gespült. Nach Färbung mit Trypanblau (250 µl Trypanblau, 150 µl PBS, 100 µl Zellsuspension) wurde die Zahl der vitalen, in diesem Fall nicht gefärbten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Abnehmen der für EHTs benötigten Zellen wurde die restliche Zellsuspension auf Gewebekulturschalen (Ø 10 cm, Falcon, Heidelberg) verteilt, und für 60 bis 90 min bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert um die Kardiomyozyten durch ihre im Vergleich zu den Nichtkardiomyozyten deutlich langsamere Anheftung an die Kulturschale im Überstand anzureichern.

Anschließend wurden die Zellkulturschalen mit den Überständen gespült und alle diese in ein Sammelgefäß (50 ml) überführt. Die somit erhaltenen Zellen wurden nach erneuter Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer für die 2D-Zellkultur verwendet.

Trypsin-Stammlösung:

100 mg Trypsin pro ml CBFHH bei 4 °C über Nacht rotierend lösen.

Vor Gebrauch durch 0,2 µm Filter steril filtrieren.

P/S Stammlösung (100x):

10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin.

DNase - Stammlösung:

100 mg DNase in 50 ml PBS ansetzen.

Durch 0,2 µm Filter steril filtrieren und bei -20 °C lagern.

Trypsin-Arbeitslösung:

1,5 ml Trypsin-Stammlösung, 0,5 ml P/S und 0,7 ml DNase - Stammlösung mit CBFHH auf 50 ml auffüllen. Auf Eis lagern.

DNase - Arbeitslösung:

0,5 ml P/S, 0,7 ml DNase - Stammlösung und 1 ml FKS (inaktiviert) mit CBFHH auf 50 ml auffüllen. Auf Eis lagern.

PBS:

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na₂HPO₄(H₂O)₇, 0,2 g KH₂PO₄, Aqua ad iniectabilia ad 1000ml; pH mit HCl auf 7,4 einstellen.

Nicht-Kardiomyozyten-Medium (NKM):

Dulbeccos Minimal Essential Medium (DMEM), 10% Hitze-inaktiviertes FKS, 1% P/S und 1% L-Glutamin.

2.3 2-D Zellkulturmodell

2.3.1 Kultivierung der Kardiomyozyten

Vor Aussaat wurden die Zellkulturschalen (\varnothing 3,5 cm) mit Gelatine in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ PBS beschichtet und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Beschichtung diente einer besseren und schnelleren Adhäsion der Kardiomyozyten. Anschließend wurden 1×10^6 Zellen pro Kulturschale in Kardiomyozyten-Medium (KM) ausgesät. Der im KM-Medium enthaltene Zellteilungsinhibitor 5'-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) sollte eine Überwucherung der postmitotischen Kardiomyozyten mit sich *in vitro* fortwährend teilenden Zellen, wie Fibroblasten oder Endothelzellen, verhindern. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO_2 im Brutschrank gehalten, ein Mediumwechsel fand alle 48 h statt.

Kardiomyozyten-Medium (KM):

Minimal Essential Medium (MEM), 10% Hitze-inaktiviertes FKS, 1% P/S und 1% 5-Bromo-2-Desoxyuridin (BrdU).

2.3.2 Adenovirale Überexpression von MyBP-C

An Kulturtag 3 erfolgte die Infektion der Kardiomyozyten mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 1. Die Infektionseffizienz wurde am 4. Kulturtag mikroskopisch anhand der Grünfluoreszenz mittels des konfokalen Lasermikroskops (Axiovert 100, Zeiss, Jena) überprüft.

2.3.3 Darstellung von MyBP-C auf mRNA-Ebene

Die RNA wurde in der HEK-Zellkultur mittels einer modifizierten Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987) präpariert. Durch ein Northern Blot Verfahren mit anschließender radioaktiver Markierung konnte die transkribierte MyBP-C-mRNA dargestellt werden.

2.3.3.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus den HEK-Zellen erfolgte mittels TRIZOL[®], einer monophasischen Lösung aus Phenol und Guanidinisothiozyanat, welche die Zellen unter Erhaltung der Integrität der RNA lysiert. Die so gewonnene RNA war weitgehend frei von Proteinen und DNA.

In der 2-D Kultur wurden die Zellen nach Zugabe von 500 µl TRIZOL[®] mit einem Zellschaber von der Schale gelöst und in Sammelgefäße überführt. Anschließend wurde zu den Proben 100 µl Chloroform hinzupipettiert, die Probengefäße für 45 s geschüttelt (Vortex) und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Beschleunigung der Phasenauftrennung erfolgte eine Zentrifugation der Proben für 15 min bei 4 °C mit 12.000 g (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg). Die hydrophile RNA-haltige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Gefäß überführt, die hydrophobe phenolische Phase wurde verworfen. Anschließend wurde der Überstand mit 250 µl eisgekühltem Isopropanol versetzt und nach erneutem kurzen Schütteln (Vortex) wiederum für 10 min inkubiert. Schließlich wurde die RNA pelletiert (10 min, 4 °C, 12.000 g), der klare Überstand verworfen und das Pellet mit 1000 µl Ethanol (70%) gewaschen. Wiederholt wurde das Gefäß kurz geschüttelt (Vortex) um das präzipitierte Sediment vom Gefäßboden zu lösen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 4 °C, 12.000 g) wurde der Überstand komplett abgesaugt und das Pellet für 10 min an der Luft getrocknet. Die Resuspension der RNA erfolgte in 15 µl Wasser, welches den RNase-Inhibitor Diethylpyrocarbonat (DEPC, 0,1%) enthielt. Schließlich konnte die photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes in einer Verdünnung von 1:50 bei einer Wellenlänge von 260 nm in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Als Reinheitskontrolle der RNA wurde zugleich die optische Dichte bei 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine) bestimmt, und der Quotient OD 260/OD 280 gebildet (1,6-2,0 bei allen Versuchen).

DEPC-H₂O:

1 ml DEPC in 1000 ml USF-Wasser; autoklavieren.

2.3.3.2 Agarosegelelektrophorese und Northern Blot

Zur Auftrennung der isolierten RNA wurde eine horizontale Agarose-Gel-Elektrophorese durchgeführt (Sambrook et al. 1989). Je 5 µg RNA wurden mit einer äquivalenten Menge an RNA-Lade-Puffer versetzt und für 5 min bei 65 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben 1 min auf Eis abgekühlt, auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und bei einer Spannung von 45 V in 1x Morpholinopropansulfonsäure- (MOPS-) Puffer aufgetrennt. Um die Gleichmäßigkeit der RNA-Beladung zu überprüfen sowie etwaige RNA-Degradationen auszuschließen wurden die Ethidiumbromid markierten 18S- und 28S-RNA Banden der ribosomalen RNA unter UV-Beleuchtung sichtbar gemacht. Die aufgetrennte RNA wurde durch Northern Kapillartransfer auf eine Nylonmembran übertragen, wobei 20 x SSC als Transfermedium diente. Nach 72 h wurde der Erfolg des Blottens durch den Transfer der 18S- und 28S-RNA Bande unter UV-Licht dokumentiert. Anschließend erfolgte eine UV-Licht-Bestrahlung der Nylonmembran von beiden Seiten mit 150 Millijoule (GS Gene Linker, Bio Rad, München), um eine kovalente Bindung der RNA an diese zu erreichen.

10 x MOPS-Puffer:

0,01 M EDTA; 0,05 M Natriumacetat; 0,2 M MOPS; pH 7,0.

1% Agarosegel:

1,2 g Agarose in 100 ml USF-Wasser unter leichtem Aufkochen lösen; anschließend 1,8 ml Formaldehyd 37% und 10 ml 10 x MOPS hinzupipettieren.

RNA-Lade-Puffer:

1,0 ml Formamid; 440 µl Formaldehyd 37%; 250 µl 10x MOPS; 200 µl Ladepuffer; 10 µl Ethidiumbromid.

Ladepuffer:

50% Glycerol und 50% gesättigte Bromphenolblau-Lösung mit 47,5% Formamid.

20x SSC:

350,6 g NaCl; 176,6 g Natriumcitrat x 2H₂O in 2,0 l USF-Wasser, pH 7,0.

2.3.3.3 Radioaktive Markierung

2.3.3.3.1 Herstellung der radioaktiven Sonde

Die radioaktive Markierung der Sonde erfolgte basierend auf der Methode des *random Prime labeling* (Feinberg und Vogelstein, 1983) mit dem *Prime It II Random Primer Labeling Kit* (Stratagen, La Jolla, USA) und dem radioaktivem Nukleotid Desoxycytidin-5'-[α - ^{32}P]-triphosphat (^{32}P -dCTP; 3000 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$). Zunächst wurden 25 ng der entsprechenden cDNA (cMyBP-C oder Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als internes Standardprotein) zu 5 μl Random 9-ner Primer gegeben und mit Aqua ad iniectabilia auf ein Gesamtvolumen von 24 μl aufgefüllt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für 5 min bei 95 °C denaturiert, mit 10 μl dCTP 5x Puffer, 5 μl ^{32}P -dCTP und 1 μl Klenow-Polymerase versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Schließlich folgte der Abbruch der Synthese-Reaktion durch Zugabe von 5 μl EDTA-Stop-Mix.

Die markierte cDNA-Sonde wurde zur Abtrennung ungebundener Radioaktivität mit STE-Puffer über eine Reinigungssäule gegeben. Das Eluat wurde in denaturierter Lachssperma-DNA (SS-DNA) aufgefangen, für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend zur Verhinderung einer erneuten Basenpaarung auf Eis abgekühlt.

STE-Puffer:

100 mM NaCl; 20 mM TrisHCl pH 7,5 und 10 mM EDTA.

2.3.3.3.2 Hybridisierung der Membran

Um unspezifische Bindungsstellen auf der Nylonmembran abzudecken wurde diese in 15 ml Prähybridisierungslösung mit 75 μl denaturierter SS-DNA (10 mg/ml) für 2-3 h bei 42 °C in kontinuierlich rotierenden Hybridisierungsröhren (*Mini Hybridisation Oven*, Appligene, Heidelberg) inkubiert. Nach Zugabe der Sonde erfolgte die Hybridisierung bei 42 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden folgende Waschschrte durchgeführt:

- dreimal mit 2x SSPE für 5 min bei 42 °C
- zweimal mit 2x SSPE / 2% SDS für 20 min bei 62 °C

Schließlich erfolgte die Detektion der radioaktiv markierten Banden durch Belichtung von Phosphorimagerplatten (GS 525 *Molecular Imager System*[®], Bio Rad, München). Die Auswertung der Phosphorimagerplatten wurde mittels des Volldokumentationssystem *Multi Analyst* (Bio Rad, München) durchgeführt.

Prähybridisierungslösung :

50 ml 20x SSPE; 100 ml deionisiertes Formamid; 20 ml 50x Denhardts; 20 ml 20% SDS; 10 ml DEPC-H₂O. Durch 0,2 µm Filter steril filtrieren und bei -20 °C lagern.

50x Deinhardts:

5 g Ficoll; 5 g Polyvinylpyrrolidon; 5 g bovines Serumalbumin (BSA) gelöst in 500 ml DEPC-H₂O.

20% SDS:

100 g SDS ad 500 ml DEPC-H₂O. Durch 0,2 µm Filter steril filtrieren.

Bei eventueller Kristallbildung vor Filtration auf 80 °C erhitzen.

20x SSPE:

174 g NaCl, 27,6 g NaH₂PO₄, 7,4 g EDTA, USF-Wasser ad 1000ml; pH 7,4; autoklavieren.

2x SSPE / 2% SDS:

50 ml 20% SDS; 56,9 ml 20x SSPE in 400 ml DEPC-H₂O.

2.3.4 Darstellung von MyBP-C auf Protein-Ebene

2.3.4.1 Proteinisolierung

Die Präparation der Proteine erfolgte 48 h nach Infektion der neonatalen Kardiomyozyten. Zunächst wurde 250 µl Lysepuffer auf die Kulturschalen gegeben und die Zellen mittels eines Zellschabers gelöst.

Lysepuffer (Ladepuffer nach Lämmler, modifiziert):

5 ml TrisHCl (0,5 M, pH 6,8), 8 ml SDS (10%), 4 ml Glycerol, 19,5 ml USF-Wasser, 4 mg Bromphenolblau, 0,1 ml Aprotinin (2 g/l) und 0,2 ml PMSF (100 mM).

2.3.4.2 SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese

Die Proben wurden für 5 min bei 95°C gekocht und anschließend durch eine SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese unter Verwendung eines 5%-igen Sammelgels und eines 10%-igen Trenngels (Tabelle 2) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Tabelle 2: Bestandteile des Trenn- und Sammelgels für die Gelelektrophorese.

	Trenngel 10%	Sammelgel 5%
Akrylamid (30%, Mix 37,5 : 1)	3,3 ml	1,7 ml
Aqua ad iniectionabilia	4,0 ml	5,6 ml
TrisHCl	(1,5 M, pH 8,8): 2,5 ml	(0,5 M, pH 6,8): 2,5 ml
10% SDS	100 µl	100 µl
10% Ammoniumpersulfat	100 µl	100 µl
N,N,N',N-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	4 µl	10 µl

Je Spur wurden 10 µl des Zelllysats aufgetragen. Parallel zu den Proben lief ein Molekulargewichtsstandard (Roti-Mark, Roth). Die Elektrophorese erfolgte zu Beginn mit einer konstanten Stromstärke von 10 mA/Gel und wurde nach 15 min Laufzeit auf 30 mA/Gel erhöht. Nachdem die Laufmittelfront die Unterkante erreicht hatte (ca. 2 h) wurde die Elektrophorese beendet.

Laufpuffer:

3,02 g Tris, 14,4 g Glycin, 1,0 g SDS gelöst in 1000 ml USF-Wasser.

2.3.4.3 Immunoblot

Die im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine wurden im anschließenden Nassblot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Protein-Transfer erfolgte für 150 min bei einem konstanten Gleichstrom von 300 mA. Der Blot-Puffer enthielt 20% Methanol um eine Quellung des Gels während des Transfers zu verhindern. Der elektrophoretische Transfer wurde durch Anfärbung der geblotteten Proteine auf der Membran mit Ponceaurot S kontrolliert und die Höhe der Banden des Molekulargewichtsstandards dauerhaft markiert. Anschließend wurde die Membran bis zur vollständigen Entfärbung in TBS mit TWEEN 20 (TBST) gewaschen. Die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran erfolgte mit 5% in TBST gelöstem Magermilchpulver bei 4 °C über Nacht.

Am folgenden Tag erfolgte der immunologische Nachweis der Proteine. Zunächst wurde die Membran mit dem primären, spezifisch gegen das entsprechende Protein gerichteten Antikörper für 2 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST für je 10 min folgte die Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppeltem Sekundär-Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist. Sämtliche Antikörper wurden mit Magermilchpulverlösung verdünnt. Die Verdünnungen der einzelnen Antikörper sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

Anschließend wurde dreimal für je 10 min in TBST gewaschen und die Membran für 5 min mit dem *ECL+ Western Blot-Detektions-Kit* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) inkubiert, das ein Substrat der Peroxidase enthält, welches nach Umsetzung eine Chemolumineszenz zeigt. Zur Visualisierung wurden Filme (*Hyperfilm ECL*, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) je nach Stärke der Lumineszenz für 1 s bis 20 min, belichtet und sofort entwickelt (*Hyperprocessor*, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Nach der Entwicklung wurden die Filme digitalisiert (Durchlichtscanner Agfa *Snapscan* 600) und mittels Densitometrie mit Hilfe des Volldokumentationssystems *Multi-Analyst* (BioRad, München) ausgewertet. Um die densitometrischen Ergebnisse aus unterschiedlichen Blots miteinander vergleichen zu können, wurde auf die jeweiligen Kontrollen der einzelnen Blots normiert.

Tabelle 3: Antikörper für Immunoblot.

Protein	Spezies	AK-Typ	Verdünnung	Hersteller	Kat.-Nr.
Anti-c-myc	rabbit	polyklonal	1 : 10000	Sigma	C-3956
Anti-c-myc	mouse	monoklonal	1 : 1000	Invitrogen	R950-25
Anti-MyBP-C	rabbit	polyklonal	1 : 1000	Dr. Lucie Carrier	—
Anti-MLC-Typ 2	mouse	monoklonal	1 : 10000	Alexis	F109.3E1
Anti-GFP	rabbit	polyklonal	1 : 10000	Santa Cruz	sc-8334
Anti-mouse IgG	goat	Serum	1 : 15000	Sigma	A-3682
Anti-rabbit IgG	goat	Serum	1 : 15000	Sigma	A-0545

Transferpuffer:

3,0 g Tris, 14,4 g Glycin, 200 ml Methanol, USF-Wasser ad 1000 ml.

Lagerung bei 4 °C. Bis zu dreimal verwendbar.

Ponceaurot S Lösung

0,5 g Ponceaurot S, 1 ml Essigsäure (100%), USF-Wasser ad 100 ml.

Durch Faltenfilter geben.

10x TBS

242,3 g Tris, 175,3 g NaCl, USF-Wasser ad 2000 ml; pH 7,5.

TBST

100 ml 10x TBS, 1 ml Tween 20, USF-Wasser ad 1000 ml.

2.3.5 Fraktionierungsexperimente

2.3.5.1 Trennung Triton-löslicher und Triton-unlöslicher Proteine

Um zu untersuchen, zu welchem Anteil das adenoviral exprimierte MyBP-C bzw. die trunkierten Proteine mit den sarkomerischen Proteinen assoziiert sind, wurde eine Trennung Triton-löslicher (v.a. zytosolischer) und Triton-unlöslicher (v.a. sarkomerischer) Proteine durchgeführt.

Die Kardiomyozyten wurden 48 h nach Infektion mit 300 µl hypotonem Lysepuffer versetzt und mit einem Zellschaber von der Kulturschale gelöst. Nach Zugabe von 33 µl Triton X-100 (10%) folgte eine Inkubation von 30 min. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 4 °C mit 20800 g (Centrifuge 5417 R, Eppendorf; 20800 g) zentrifugiert, der die Triton-lösliche Proteinfraction enthaltende Überstand vorsichtig abpipettiert und in neue Gefäße überführt. Das Triton-unlösliche Pellet wurde in 1000 µl hypotonem Lysepuffer mit 1% Triton gewaschen und erneut für 10 min bei 4 °C mit 20800 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 150 µl Hochsalz-Lysepuffer resuspendiert.

Nach Zugabe von 150 µl SDS (10%) und 20 min Inkubation bei 12 °C erfolgte eine Zentrifugation der Proben für 10 min bei 12 °C und 20800 g. Schließlich wurde der Überstand, welcher die Triton-unlösliche Proteinfraction umfasste, abpipettiert und in neue Gefäße überführt.

Hypotoner Lysepuffer:

5 mM TrisHCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂.

Hochsalz-Lysepuffer:

50 mM TrisHCl pH 7,5, 1 M NaCl, 2 mM DTT, 5 µg/ml Aprotinin, 0,5 mM PMSF.

2.3.5.2 Gelelektrophorese und Immunoblot

Zunächst wurde 10 µl der jeweiligen Probe entnommen und mit 2 µl sechsfach konzentriertem Ladepuffer nach Lämmli versetzt. Die anschließende Behandlung der

Proben, die Gelelektrophorese sowie der Immunoblot erfolgten wie unter 2.3.4.2 und 2.3.4.3 beschrieben.

Um den Erfolg der Fraktionierung zu überprüfen wurden Primärantikörper verwendet, die gegen EGFP, das vor allem im Cytosol der Zellen akkumuliert, bzw. gegen ventrikuläre leichte Myosinketten vom Typ 2 (MLC-2v), welche ein sarkomerisches Protein darstellen, gerichtet sind (siehe Tabelle 3).

Sechsfach konzentrierter Ladepuffer nach Lämmli:

1,2 g SDS, 6,0 g Glycerol, 0,93 g DTT, 6 mg Bromphenolblau, 1,2 ml TrisHCl (0,5 mol/l, pH 6,8), USF-Wasser ad 10 ml.

2.3.6 Untersuchung des proteasomalen Abbauweges

Um den Einfluss des proteasomalen Abbaus auf des MyBP-C bzw. die trunkierten Mutanten zu untersuchen, wurden die infizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten mit einem Proteasominhibitor behandelt.

2.3.6.1 Behandlung der Kardiomyozyten mit MG132

Die Behandlung mit dem spezifischen Proteasominhibitor MG132 (Carbobenzoxyl-Leucinyl-Leucinyl-Leucinal, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) erfolgte 48 h nach Infektion der neonatalen Kardiomyozyten.

Hierzu wurden 50 μ M MG132 in KM-Medium gelöst zu den NNRKM gegeben und diese für 120 min bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Als Kontrolle wurden nicht mit MG132 behandelte Kardiomyozyten mitgeführt. Anschließend folgte die Proteinisolierung wie unter 2.3.4.1 beschrieben.

2.3.6.2 Gelelektrophorese und Immunoblot

Die anschließende Behandlung der Proben, die Elektrophorese, der Immunoblot sowie die densitometrische Auswertung wurde wie unter 2.3.4.2 und 2.3.4.3 beschrieben durchgeführt.

2.4 Funktionelle Untersuchungen einer Überexpression von MyBP-C

2.4.1 Herstellung und Gehaltsbestimmung von Collagen I

8 Rattenschwänze wurden von den Kadavern abgetrennt und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Vor der Collagenpräparation wurden sie aufgetaut und mit Ethanol (70%) desinfiziert. Die gesamte Präparation wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Entfernung der Haut erfolgte mit Hilfe einer chirurgischen Pinzette nach Inzision in der Längsachse des Schwanzes. Danach wurden die bindegewebigen, Collagen I - Fasern enthaltenden Stränge von der Schwanzbasis beginnend mit einer Pinzette abgezogen, in eine Schale mit „Earle's based salt solution“ (EBSS) überführt und zweimal mit EBSS gewaschen. Nach Überführung und gleichmäßiger Verteilung der Sehnenfäden in 500 ml Glasgefäße erfolgte die Zugabe von je 300 ml Essigsäure (0,1% in Aqua ad iniectionem). Die Sehnenfäden wurden über mehrere Tage bis zur fast vollständigen Auflösung bei 4 °C gerührt und anschließend in Zentrifugengefäße überführt. Nach Zentrifugation bei 20.000 g für 2 h bei 4 °C (Ultrazentrifuge Beckmann L7-65 mit Festwinkelrotor 19) zur Abtrennung von nicht gelösten Geweberesten wurde der Überstand gesammelt. Um das Collagen auszufällen, wurde die Salzkonzentration in der Suspension durch die langsame Zugabe eisgekühlter NaCl-Lösung (25%) unter ständigem Rühren auf etwa 4% angehoben. Nach einer Inkubation bei 4 °C über Nacht wurde die Suspension erneut zentrifugiert (20.000 g, 30 min, 4 °C). Anschließend wurden die Überstände verworfen und die Pellets in jeweils 250 ml kalter Essigsäure (0,1%) aufgenommen. Nach Lösung der Pellets durch Rühren über Nacht bei 4 °C wurde durch zweimalige Dialyse gegen Essigsäure (0,1%) der NaCl-Gehalt in der Collagensuspension reduziert. Die Proteinkonzentration konnte durch Lösen des Collagens in 0,003% SDS bei 95 °C und anschließender photometrischer Bestimmung nach der Methode von Bradford (1976) ermittelt werden.

2.4.2 Herstellung von Hühnerembryonenextrakt

120 angebrütete Eier (9. Bruttag, Landesversuchsanstalt für Kleintierzucht, Kitzingen) wurden mehrmals mit 70% Ethanol desinfiziert, die Schalen am runden Pol vorsichtig mit einer Schere geöffnet und die Embryonen mit einer sterilen Pinzette entnommen. Nach

Dekapitation wurden Köpfe und Körper auf vier 500 ml Flaschen mit je 150 ml eisgekühltem CBFHH + 2% P/S verteilt, homogenisiert (Polytron® Homogenisator; 6x 15 sec bei Stufe 11) und anschließend zentrifugiert (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg; 1000 g, 15 min, 4 °C). Die abgenommenen Überstände wurden gesammelt, die Pellets vereinigt, anschließend mit CBFHH auf 300 ml aufgefüllt und erneut homogenisiert (6x 15 s bei Stufe 11, 3x 5 s bei Stufe 20). Nach erneuter Zentrifugation (1000 g, 15 min, 4 °C) und Poolen aller Überstände wurde der Hühnerembryonenextrakt in Aliquots á 14 ml bei – 20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Eine Präparation mit 120 angebrüteten Eiern ergab durchschnittlich 500 ml Hühnerembryonenextrakt.

2.4.3 Herstellung von rekonstituiertem Gewebe der neonatalen Ratte (engineered heart tissue, EHT)

2.4.3.1 Herstellung der Gußformen (Abb. 2)

In autoklavierbare Kulturschalen (Ø 6 cm, Glas) wurden je zwei Silikondochte (Ø 3,5 mm, etwa 80% der Schalenhöhe) eingeklebt. Anschließend wurden Teflonscheiben (Ø 15,5 mm) über diese Dochte gestülpt und die Schalen zu 1/3 ihrer Höhe mit Silikon ausgegossen. Nach dem Aushärten des Silikons wurden die Teflonscheiben wieder entfernt. Anschließend wurden Zylinder aus Teflon (Ø 8,2 mm, etwa 80% der Schalenhöhe) auf die Dochte aufgesteckt, wodurch 2 ringförmige Gußformen (Innendurchmesser 8,2 mm, Außendurchmesser 15,5 mm) mit einem Fassungsvermögen von je 900 µl entstanden. Schließlich wurden die Kulturschalen vor der ersten Benutzung mehrmals intensiv ausgekocht, autoklaviert und bis zur weiteren Verwendung steril gelagert.

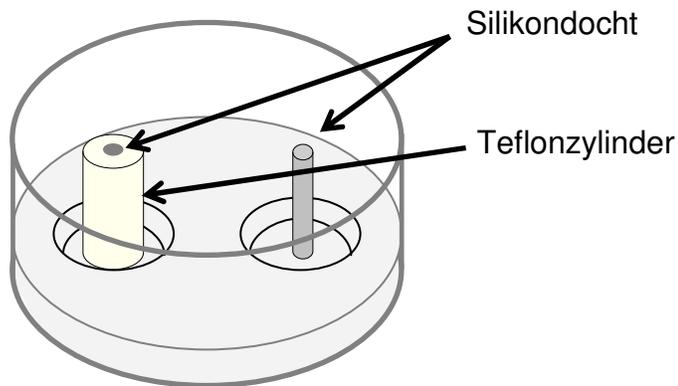


Abb. 2: Schemazeichnung einer Gußform.

2.4.3.2 Herstellung von EHTs

Nach Einstellung der gewünschten Zellkonzentration im Sammelröhrchen zum Abschluss der Zellpräparation wurde die Zellsuspension bis zur weiteren Verwendung auf Eis gekühlt. Alle zur Herstellung der EHTs notwendigen Pipettierschritte wurden auf Eis mit vorgekühlten Reaktionsgefäßen, Pipetten, Substanzen und Lösungen durchgeführt, um eine vorzeitige Aushärtung des Collagens zu verhindern. Die Zugabe der Bestandteile erfolgte stets in der gleichen Reihenfolge. Zunächst wurde die gewünschte Menge Collagen Typ I vorgelegt und volumengleich mit zweifach konzentriertem EHT-Medium vermischt. Der zu diesem Zeitpunkt saure pH-Wert des Gemischs wurde mit Natronlauge (0,1 mol/l) neutralisiert. Nach Zugabe von extrazellulärer Matrix des Engelbreth-Holm-Swarm Tumors der Maus (Harbor Bio-Products, Norwood, MA, USA) erfolgte die Vermengung mit der Zellsuspension, deren Zellkonzentration zuvor auf den benötigten Wert eingestellt wurde. Nach wiederholtem Triturieren des Collagen-Zell-Gemischs wurde davon je 900 µl zügig in die Gußformen pipettiert (Abb. 3). Um eine Aushärtung des Collagen-Zell-Gemisches zu erreichen wurden die Kulturschalen anschließend für 1 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert und nachfolgend vorsichtig mit 6 ml EHT-Medium pro Kulturschale mit 2 EHTs überschichtet.

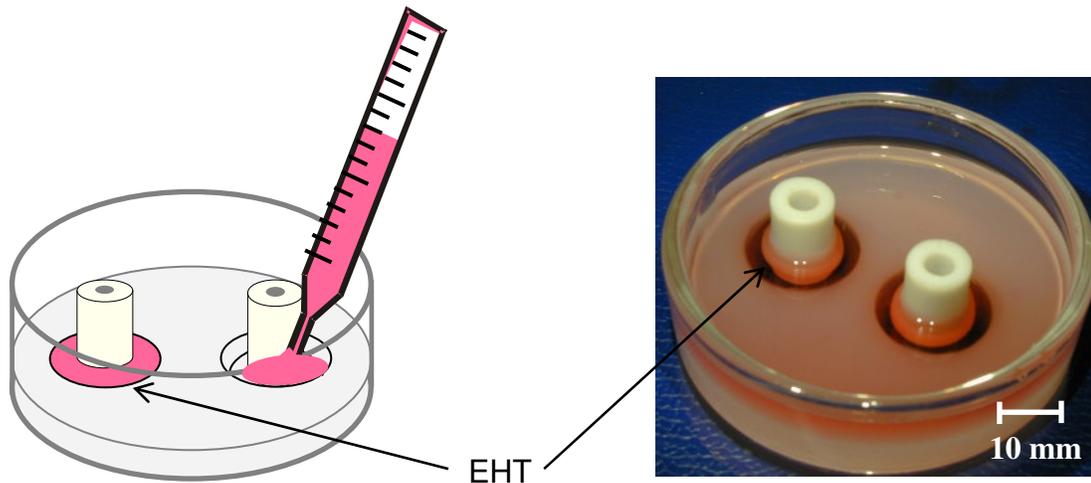


Abb. 3: Schematische Darstellung des Ausgießens von EHTs (links) und Fotografie einer Gußform mit EHTs am 6. Kulturtag (rechts).

10x DMEM:

133 mg 10x DMEM Pulver in 10 ml Aqua ad iniectabilia.

Vor Gebrauch durch 0,2 µm Filter steril filtrieren. Bei 4 °C lagern.

Zweifach konzentriertes EHT- Medium:

1,0 ml 10x DMEM, 1,0 ml Pferdeserum (inaktiviert), 0,2 ml Hühnerembryonenextrakt und 0,1 ml P/S, Aqua ad iniectabilia ad 5 ml. Vor Herstellung der EHTs frisch ansetzen.

Standard-Pipettierschema zur Herstellung von vier EHTs:

Collagen (5,5 mg/ml)	640 µl	→ 0,8 mg/EHT
2x EHT-Medium	640 µl	
NaOH 0,1 N	129 µl	
extrazelluläre Matrix	400 µl	→ 10%
Zellsuspension ($5,0 \times 10^6$ Zellen/ml)	2181 µl	→ $2,5 \times 10^6$ Zellen/EHT

Das eingesetzte Volumen des Collagens wurde dem Gehalt der jeweiligen Charge so angepasst, dass 0,8 mg pro EHT eingesetzt wurden. Das Volumen des Mediums sowie des NaOH richtete sich nach der Menge an Collagen-Lösung. Da mit der Zellsuspension

auf 4 ml aufgefüllt wurde, erfolgte die Einstellung der Zellkonzentration entsprechend. Aufgrund der Viskosität der Mischung musste ein Pipettierverlust von 100 µl pro EHT kalkuliert werden. Deshalb konnten mit einem Ansatz von 4 ml 4 EHTs mit einem Volumen von je 900 µl gegossen werden.

EHT-Medium:

Dulbeccos Minimal Essential Medium (DMEM), 10% Pferdeserum (inaktiviert), 2% Hühnerembryonenextrakt und 1% P/S

2.4.4 Kultur und Gentransfer

2.4.4.1 Kultur

Die Kultur der EHTs erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37 °C und 5% CO₂ im Zellkulturschrank. Ein Mediumwechsel wurde am ersten, dritten und fünften Tag nach der Herstellung durchgeführt. Am 6.Tag wurden die EHTs auf Abstandshalter (Abb. 4) überführt, um eine bessere Versorgung zu gewährleisten. Anschließend wurde das Medium jeden zweiten Tag gewechselt. Die Kulturdauer betrug im Normalfall 11 Tage.

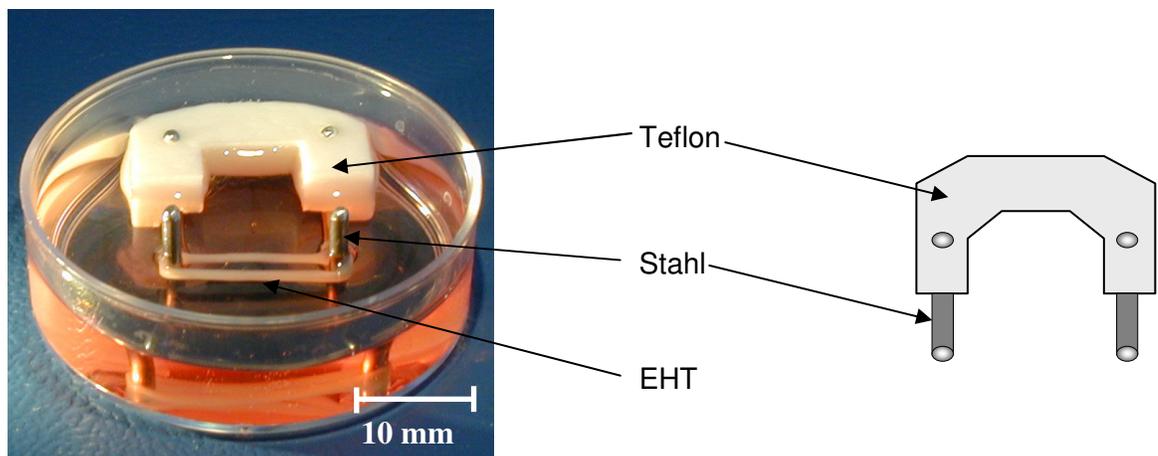


Abb. 4: Abbildung eines Abstandhalters.

2.4.4.2 Adenoviraler Gentransfer

Die Infektion der EHTs mit den verschiedenen Viren erfolgte am 9. Kulturtag. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die EHTs vorsichtig mit jeweils 1.25×10^8 bav (MOI 50) in 250 μ l MEM / 1% P/S überschichtet. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ wurden zusätzlich 2,5 ml EHT-Medium zugegeben.

2.4.4.3 Behandlung mit MG132

Am 11. Kulturtag erfolgte die Behandlung der EHTs mit 50 μ M MG132 in EHT-Medium. Nach 120 min Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ wurde direkt mit der Kontraktionsmessung begonnen.

2.4.5 Erfassung der Kontraktionsparameter

2.4.5.1 Kontraktionsmessung

Die Kontraktionsparameter der EHTs wurden in modifizierter Tyrode-Lösung (0,2-0,4 mmol/l Calcium) in temperierten Standardorganbädern (Abb. 5) ermittelt. Zunächst wurden die EHTs ohne Vordehnung (L_0) zwischen induktiven Kraftaufnehmern und statischen Haltepolen in Organbädern mit Tyrode-Lösung aufgehängt. Die Kontraktionsexperimente erfolgten unter elektrischer Stimulation (Frequenz 2 Hz, Pulsdauer 5 ms, Stromstärke 20% über Schwelle) bei 37 °C und kontinuierlicher Begasung mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂). Sämtliche Interventionen wurden an optimal vorgedehnten Muskelpräparaten (L_{max}) durchgeführt, wobei zwischen den einzelnen Schritten zur Äquilibration Pausen von jeweils 5 min eingelegt wurden. Die durch den Abstandhalter während der Kultur vorgegebene Gewebelänge von 14,5 mm wurde als L_0 definiert.

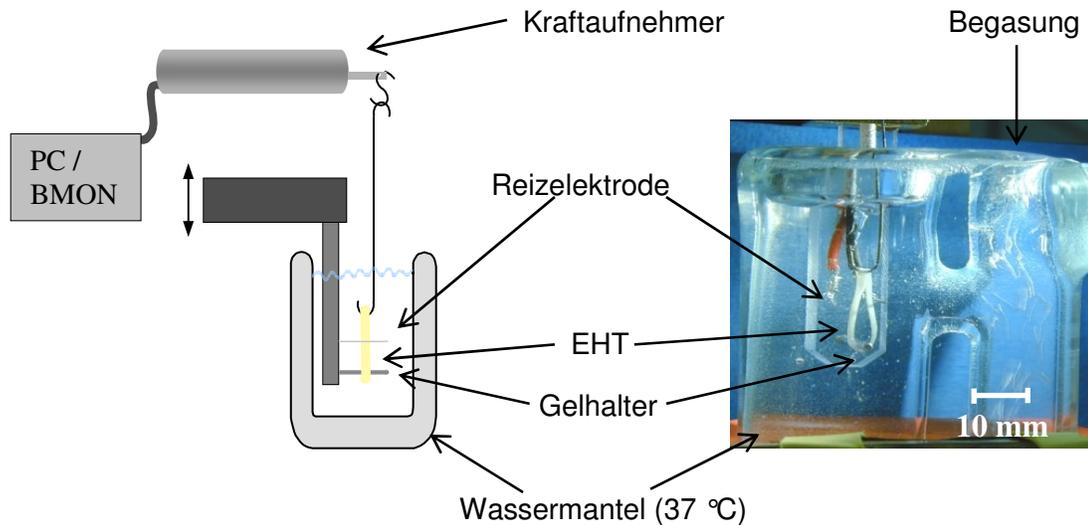


Abb. 5: Darstellung eines Organbades.

Dem Aufhängen der EHTs folgte eine Äquilibrationszeit von 60 min ohne elektrische Stimulation und ohne Vordehnung bei 0,4 mmol/l Calcium. Anschließend wurde die elektrische Stimulation gestartet und die Vordehnung in Schritten von 0,1 mm von L_0 auf L_{max} gesteigert und somit die Kraft-Längen Beziehung ermittelt.

Danach wurde die Tyrode-Lösung abgelassen, durch Tyrode-Lösung mit 0,2 mmol/l Calcium ersetzt und für 15 min äquilibriert. Anschließend wurden die Kontraktionsparameter unter steigenden Konzentrationen von Calcium (0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; 2,4 und 2,8 mmol/l) ermittelt.

Durch zweimaligen Wechsel der Tyrode-Lösung wurde die Calcium-Konzentration zunächst auf 0,4 mmol/l und nach einer Äquilibrationszeit von 15 min weiter auf 0,2 mmol/l gesenkt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Reaktion auf betaadrenerge Stimulation durch eine kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Isoprenalin (10^{-10} - 10^{-6} mol/l). Schließlich wurde die Antagonisierbarkeit des Isoprenalin-Effekts durch muskarinerge Stimulation durch zusätzliche Carbacholgabe (10^{-6} mol/l) bestimmt.

Den Kontraktionsversuchen folgend wurde die Infektionseffizienz der adenoviralen Vektoren mittels Konfokalmikroskopie (Axiovert 100, Zeiss, Jena) anhand der EGFP-Expression dokumentiert. Anschließend wurden die EHTs in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

An einigen EHTs erfolgte eine genauere histologische Betrachtung. Sie wurden zunächst durch Butandionmonoxim (BDM; 30 mmol/l in PBS) relaxiert, zwischen zwei Objektträgern gequetscht und zur Fixierung für 4-6 Tage bei 4 °C mit 4% Formaldehyd in PBS behandelt. Formaldehyd bewirkt eine Quervernetzung der Proteine, wodurch die Zellen konserviert werden. Nach zweimaligem Waschen mit TBS und Eindeckeln der Zellen mit Mowiol wurden mittels eines konfokalen Lasermikroskops (Axiovert 100, Zeiss, Jena) Fluoreszenzbilder erstellt.

Zusammensetzung der modifizierten Tyrode-Lösung:

119,8 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,2 mM CaCl₂, 1,05 mM MgCl₂, 22,6 mM NaHCO₃, 0,42 mM NaH₂PO₄, 5,05 mM Glucose, 0,05 mM Na₂EDTA, 0,56 mM Ascorbinsäure
in USF-Wasser.

CaCl₂-Stamm 2,25 mol/l:

165,57 g CaCl₂ (H₂O)₂, USF-Wasser ad 500 ml.

MgCl₂-Stamm 1,05 mol/l:

106,83 g MgCl₂ (H₂O)₆, USF-Wasser ad 500 ml.

Stamm I für Tyrode-Lösung:

175 g NaCl, 10 g KCl, 2,22 ml CaCl₂-Stamm, 25 ml MgCl₂-Stamm, USF-Wasser ad 1000 ml.

Stamm II für Tyrode-Lösung:

50 g NaHCO₃, USF-Wasser ad 1000 ml.

Stamm III für Tyrode-Lösung:

5,8 g NaH₂PO₄, USF-Wasser ad 1000 ml.

Herstellung der modifizierten Tyrode-Lösung:

40 ml Stamm I, 38 ml Stamm II, 10 ml Stamm III, 1 g Glucose, 100 mg Ascorbinsäure, 18,6 mg Na₂EDTA; USF-Wasser ad 1000 ml.

Mowiol

2,4 g Mowiol 4-88, 6,0 g Glycerol, 6 ml USF-Wasser, 12 ml TrisHCl (0,2 mol/l, pH 8,5).

Mowiol in Glycerol und Wasser durch mehrstündiges Rühren lösen, TrisHCl zugeben und

10 min bei 50°C schütteln. Anschließend 15 min bei 5000 g zentrifugieren und den Überstand bei -20°C lagern.

2.4.5.2 Datenerfassung und -verarbeitung (Abb. 6)

Die Daten wurden mittels eines PC-gestützten Biomonitoring Systems (BMON, Ingenieurbüro G. Jäckel, Hanau) erfasst. Die Kalibrierung der Messverstärker erfolgte vor jeder Messung mittels eines Gewichtes von 100 mg. Die Ausgabe der minimalen und maximalen Kraft erfolgte durch die Messsoftware als Mittelwert einer Sekunde. Die Kontraktionskraft wurde aus der Differenz von maximaler und minimaler Kraft errechnet. Die minimale Auflösung der Datenerfassung betrug 0,01 mN. Zur Erfassung der aufgezeichneten Daten wurden die Zeitpunkte, an welchen die Daten zu Weiterverarbeitung mittels Tabellenkalkulation (EXCEL®, Microsoft AG, Ismaning) gewonnen werden sollten, manuell festgelegt.

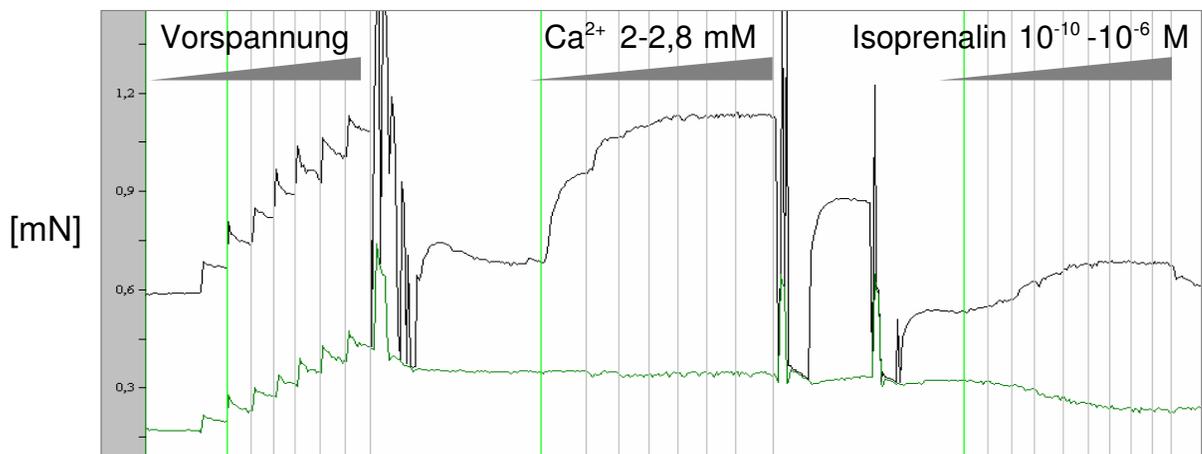


Abb. 6: Darstellung der Kontraktionsparameter anhand einer Originalregistrierung.

2.4.6 Erfassung der Proteinexpression

2.4.6.1 Proteinextraktion

Während der Etablierung der Messung der Proteinexpression in EHTs stellte sich die Aufarbeitung der EHTs zu Lysaten als kritischster Schritt für die Qualität der mittels Immunoblot gewonnenen Ergebnisse dar. Hierbei zeigte sich die Homogenisierung mittels des Polytron® Homogenisators in dem unten beschriebenen Lysepuffer gegenüber anderen Methoden überlegen, da es nach dieser Methode zu einer fast vollständigen Auflösung des Collagens und bei der Auswertung des Immunoblots zu klaren, unverschmierten Banden kam.

Zu den gefrorenen EHTs wurden 100 µl Hochsalz-Lysepuffer (siehe 2.3.5.1) gegeben und die EHTs homogenisiert (Polytron® Homogenisator PT 1200 B, Kinematica AG, 60 sec bei 15000 rpm). Nach Zugabe von 100 µl SDS (10%) wurden die Proben für 30 min bei 12 °C inkubiert und anschließend 15 min zentrifugiert (Centrifuge 5417 R, Eppendorf; 20800 g, 12 °C). Schließlich wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und in neue Gefäße überführt.

2.4.6.2 Gelelektrophorese und Immunoblot

Anschließend wurden 10 µl des Gesamtlisats entnommen und mit 2 µl sechsfach konzentriertem Ladepuffer nach Lämmli versetzt.

Die weitere Behandlung der Proben, die Gelelektrophorese sowie der Immunoblot erfolgten wie unter 2.3.4.2 und 2.3.4.3 beschrieben.

2.5 Statistik

Alle dargestellten Werte sind arithmetische Mittelwerte +/- dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und wurden mit dem Computerprogramm Prism4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) aus den Einzelwerten (n) berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test für unverbundene oder verbundene Stichproben ermittelt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant angenommen.

3 Ergebnisse

Alle Ergebnisse sind ausführlich in tabellarischer Form am Ende dieser Arbeit (Anhang; Kapitel 9.3) aufgeführt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Darstellung der Daten im Text auf ein für das Verständnis notwendiges Maß beschränkt.

3.1 Darstellung von MyBP-C in der 2D-Zellkultur

Zunächst erfolgte die konfokalmikroskopische Kontrolle der Transfektionseffizienz anhand der EGFP-Expression 48 Stunden nach Infektion der neonatalen Rattenkardiomyozyten mit den verschiedenen adenoviralen Vektoren (MOI: 1). Wie in Abb. 7 erkennbar, war bei allen Proben eine etwa identische EGFP-Expression zu beobachten.

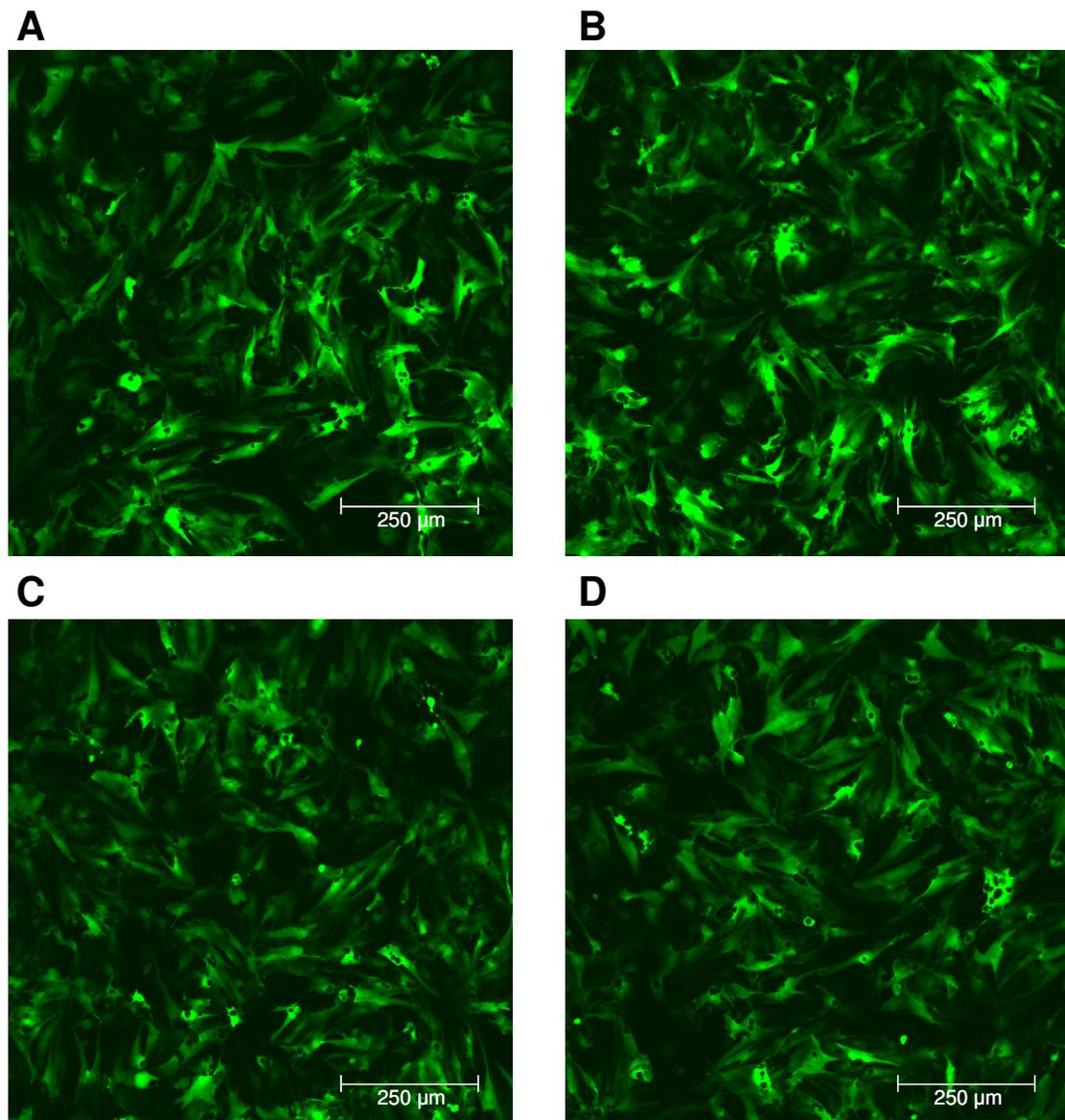


Abb. 7: EGFP-Expression 48 h nach Infektion von neonatalen Rattenkardio-myozyten mit den verschiedenen Adenoviren (MOI: 1).

Abb. 7A: Ad.EGFP, Abb. 7B: Ad.WT. Abb. 7C: Ad.M6t. Abb. 7D: Ad.M7t.

3.1.1 Darstellung von MyBP-C auf mRNA-Ebene

Die Versuche zur Untersuchung der mRNA-Expression wurden an HEK 293 Zellen durchgeführt, da diese kein cMyBP-C exprimieren. Somit konnten lediglich die adenoviral exprimierten Transkripte nachgewiesen werden. Die Infektion der Zellen mit Ad.WT bzw. Ad.M6t und Ad.M7t erfolgte 48 h vor Beginn der mRNA-Isolierung. Bei allen Proben zeigten sich etwa identische mRNA-Spiegel (siehe Abb. 8). Um größere Unterschiede bezüglich der Zellzahl der verschiedenen Proben auszuschließen, wurde parallel die mRNA-Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als interne Kontrolle untersucht.

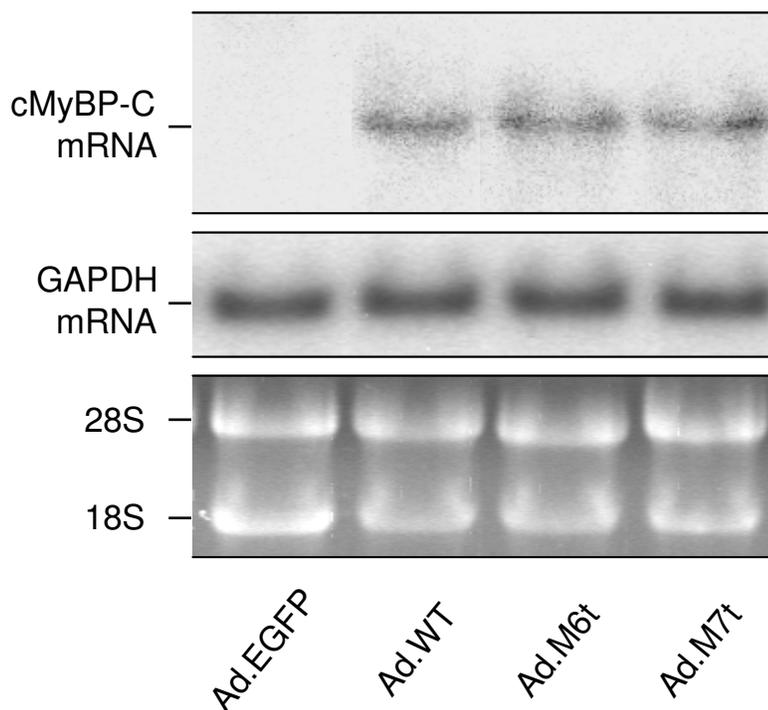


Abb. 8: MyBP-C mRNA-Expression in mit Ad.EGFP, Ad.WT, Ad.M6t bzw. Ad.M7t infizierten HEK Zellen.

Repräsentatives Autoradiogramm eines Northern Blot, der mit ^{32}P -markierter cDNA-Sonde für MyBP-C und GAPDH hybridisiert wurde.

3.1.2 Darstellung von MyBP-C auf Protein-Ebene

Bei der Darstellung des überexprimierten cMyBP-C 48 Stunden nach Infektion der NNRKM mit Ad.WT zeigte sich bei Verwendung eines gegen das myc-Tag gerichteten polyklonalen Antikörpers die zu erwartende Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 144 kDa. Bei den Proben der mit dem Ad.M6t bzw. M7t infizierten Zellen kamen im Western Blot erwartungsgemäß die Banden der trunkierten Proteine mit einem Molekulargewicht von 140 kDa bzw. 34 kDa zur Darstellung. Wie in Abb. 9 und Abb. 10A erkennbar, war hierbei auffällig, dass die Proteinmenge der trunkierten cMyBP-C, vor allem die des M7t, deutlich unter WT-Niveau lagen. Um Unterschiede der Transfektionseffizienz und der Zellzahl der Proben zu minimieren wurde bei allen Proben parallel die EGFP-Konzentration mitbestimmt (Abb. 10B) und die Menge an C-Protein dementsprechend normiert. Im Vergleich zum WT-Protein zeigte die densitometrische Auswertung bei den M6t-überexprimierenden Kardiomyozyten eine um $35\pm 7\%$ ($n=5$) verminderte Proteinmenge, bei den mit Ad.M7t infizierten Zellen eine Reduktion des überexprimierten C-Proteins um $94\pm 1\%$ ($n=5$; Abb. 10C).

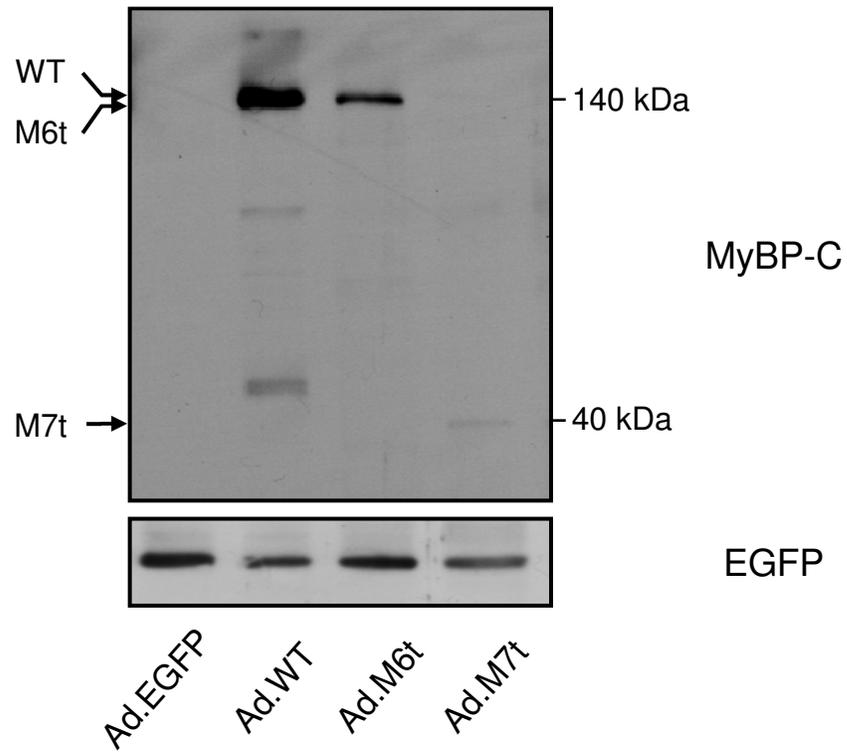


Abb. 9: Proteinkonzentration von WT und trunkiertem cMyBP-C in neonatalen Rattenkardiomyozyten.

Repräsentativer Ausschnitt eines Western Blot mit Anti-myc Antikörper, der adenoviral überexprimiertes cMyBP-C detektiert. Als interne Kontrolle wurde die EGFP-Konzentration mitbestimmt. Die Zelllysate stammen von neonatalen Rattenkardiomyozyten 48 h nach Infektion mit Ad.EGFP, Ad.WT, Ad.M6t bzw. Ad.M7t.

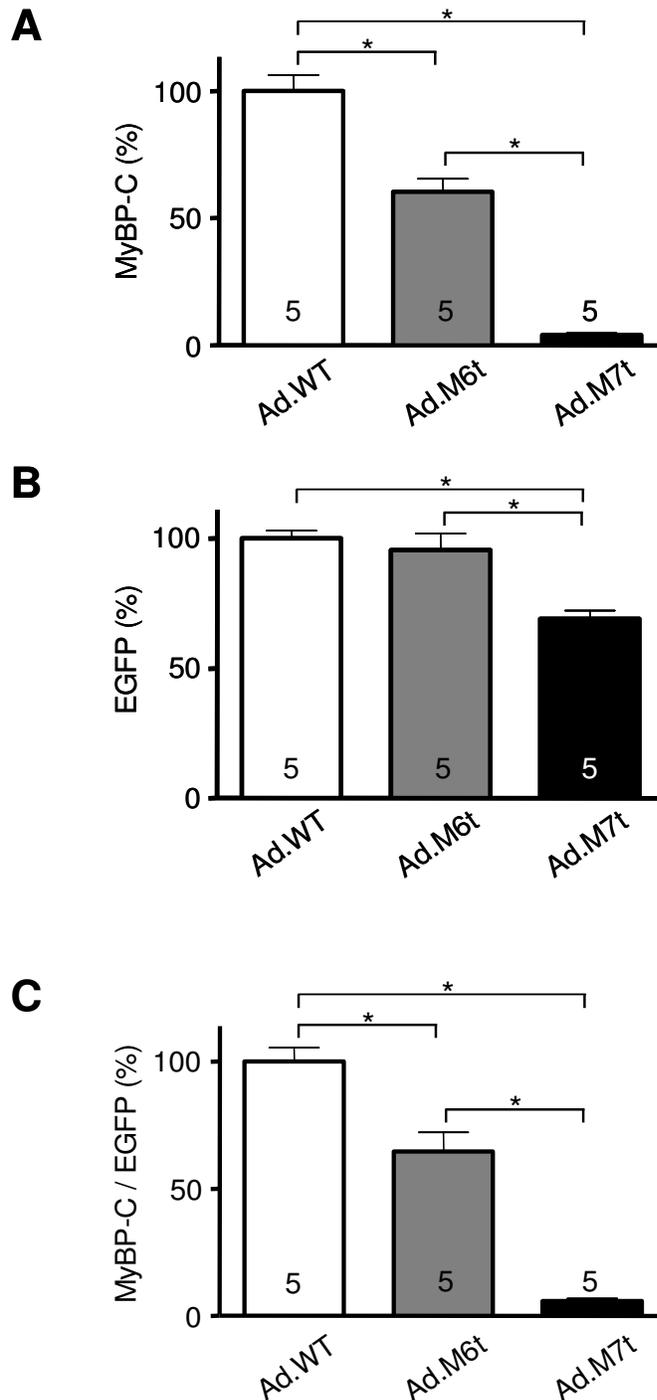


Abb. 10: Proteinkonzentration von WT und trunkiertem cMyBP-C in neonatalen Rattenkardiomyozyten.

Lysate von NNRKM 48 h nach Infektion mit Ad.WT, Ad.M6t bzw. Ad.M7t.

Abb. 10A: Densitometrische Auswertung der Western Blots mit Anti-myc Primärantikörper. Abb. 10B: Densitometrische Auswertung der Western Blots mit Anti-EGFP Primärantikörper. Abb. 10C: Auswertung der MyBP-C-Konzentration normiert auf die EGFP-Konzentration. * $p < 0,05$.

3.1.3 Fraktionierungsexperimente

Die Untersuchung der Frage, ob und in wieweit die adenoviral überexprimierten C-Proteine in den neonatalen Rattenkardiomyozyten mit sarkomerischen Strukturen assoziiert sind, erfolgte anhand einer Sarkomerpräparation. Hierzu wurde die Trennung der Triton X-100-löslichen- (v. a. zytosolischen) von der Triton X-100-unlöslichen (v. a. sarkomerischen) Proteinfraction durchgeführt.

Es zeigte sich, dass alle überexprimierten cMyBP-C, sowohl das WT-Protein als auch die beiden trunkierten C-Proteine mit nicht unwesentlichem Anteil in der sarkomerischen Proteinfraction vorhanden waren (siehe Abb. 11). Die erfolgreiche Trennung der Proteinfractionen konnte anhand der parallel durchgeführten Versuche unter Verwendung von Primärantikörpern, welche gegen das im Zytosol akkumulierende EGFP bzw. gegen die rein sarkomerisch lokalisierten ventrikulären leichten Myosinketten vom Typ 2 (MLC-2v) nachgewiesen werden.

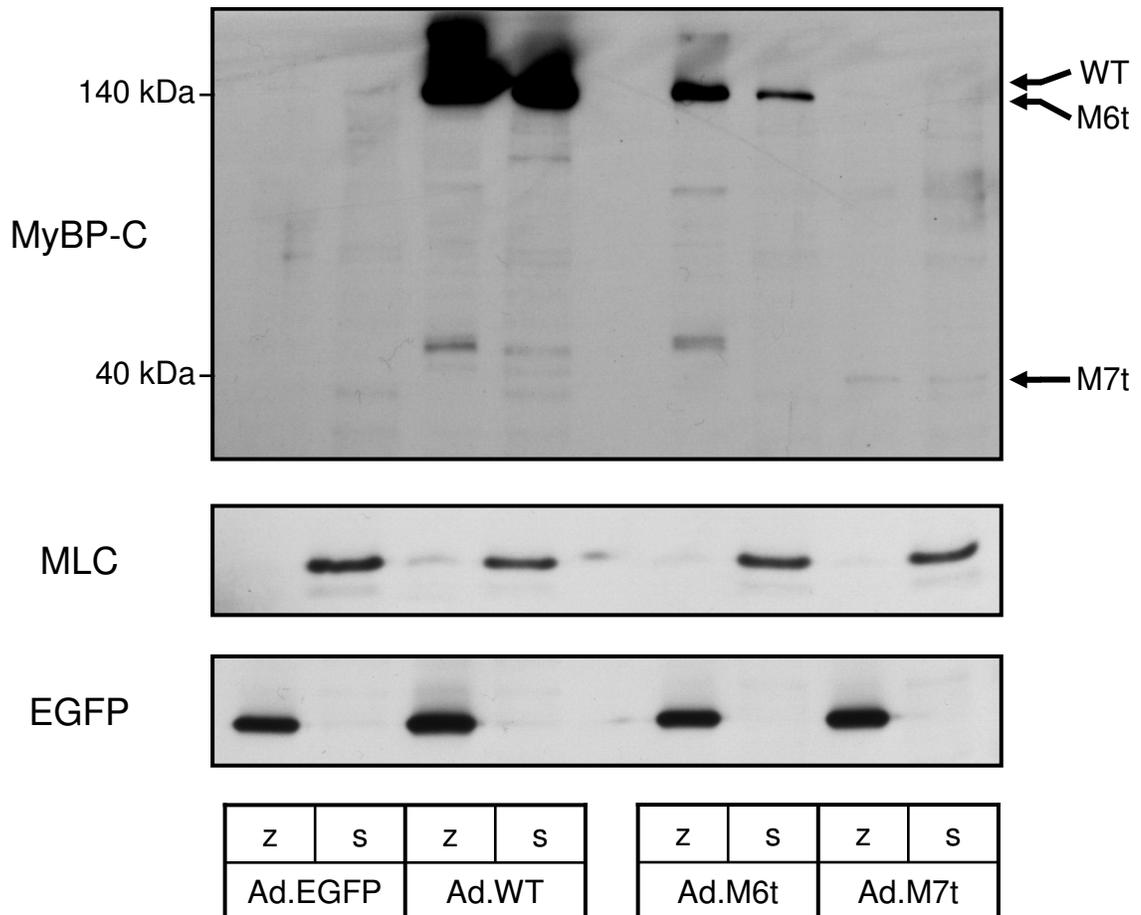


Abb. 11: Sarkomerpräparation von mit Ad.WT, Ad.M6t und Ad.M7t infizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten.

Western Blots mit Anti-myc, Anti-MLC bzw. Anti-EGFP Primärantikörpern nach Trennung von Triton X-100-löslicher (zytosolischer) und sarkomerischer Proteinfraction der Zelllysate. Mit Ad.EGFP infizierte NNRKM wurden als Kontrolle mitgeführt. z, Triton X-100 lösliche Proteine; s, sarkomerische Proteine.

3.1.4 Untersuchung des proteasomalen Abbauweges

Um zu evaluieren, ob die im Vergleich zum WT-MyBP-C deutlich verminderte Proteinmenge bei Überexpression der trunkierten C-Proteine durch eine verstärkte Proteindegradation verursacht ist, wurde die Beteiligung des proteasomalen Abbausystems (Ubiquitin-Proteasom-System, UPS) durch Verwendung eines spezifischen Proteasominhibitors untersucht.

Hierzu wurden die infizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten zwei Stunden mit 50 μ M MG132 (Carbobenzoxyl-Leucinyll-Leucinyll-Leucinal), einem reversiblen Hemmstoff der „Chymotrypsin-artigen“ Aktivität des Proteasom behandelt.

Es zeigte sich, dass die Zugabe des Proteasominhibitors die Proteinmenge aller MyBP-Cs, insbesondere die der trunkierten C-Proteine, deutlich erhöhte (Abb. 12 und Abb. 13). Wie in Abb. 13A zu erkennen, kam es bei den Ad.WT-infizierten Zellen zu einem Anstieg des überexprimierten MyBP-C um $68 \pm 12\%$ ($n=3$), bei den Ad.M6t-infizierten bzw. den M7t-infizierten KM zu einem Anstieg um $144 \pm 11\%$ ($n=3$) bzw. $2333 \pm 5\%$ ($n=3$). Da sich nach Zugabe von MG132 jedoch auch ein Anstieg der EGFP-Konzentration zeigte (Abb. 13B) und um Unterschiede bezüglich Transfektionseffizienz und Zellzahl zu eliminieren, wurde die cMyBP-C-Konzentration auch bei diesen Versuchen auf die EGFP-Konzentration normiert. Wie aus Abb. 13C ersichtlich kam es bei den WT-MyBP-C-überexprimierenden Zellen nach Zugabe von MG132 EGFP-normiert zu einem Anstieg der C-Protein-Konzentration um $35 \pm 3\%$ ($n=3$), die C-Protein-Konzentration der mit Ad.M6t- bzw. Ad.M7t-infizierten Kardiomyozyten erhöhte sich in Relation zur EGFP-Konzentration um $100 \pm 13\%$ ($n=3$) bzw. $1957 \pm 10\%$.

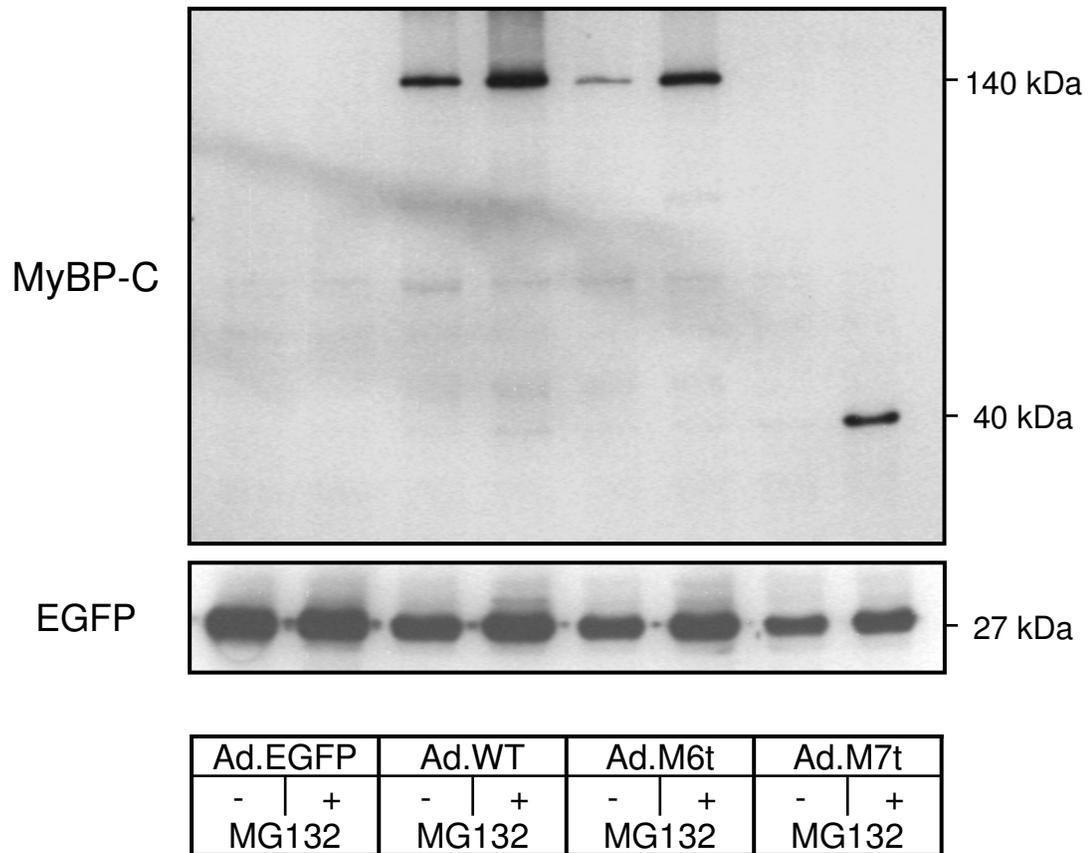


Abb. 12: Hemmung des proteasomalen Abbauweges.

Repräsentativer Ausschnitt eines Western Blot mit Anti-myc Primärantikörper, der adenoviral überexprimiertes cMyBP-C detektiert. Ad.WT-, Ad.M6t- bzw. Ad.M7t- infizierte neonatale Rattenkardiomyozyten wurden mit dem Proteasominhibitor MG132 (50 μ M, 2 h) behandelt, bzw. nicht mit diesem inkubiert. Parallel erfolgte als Kontrolle die Mitbestimmung der EGFP-Konzentration.

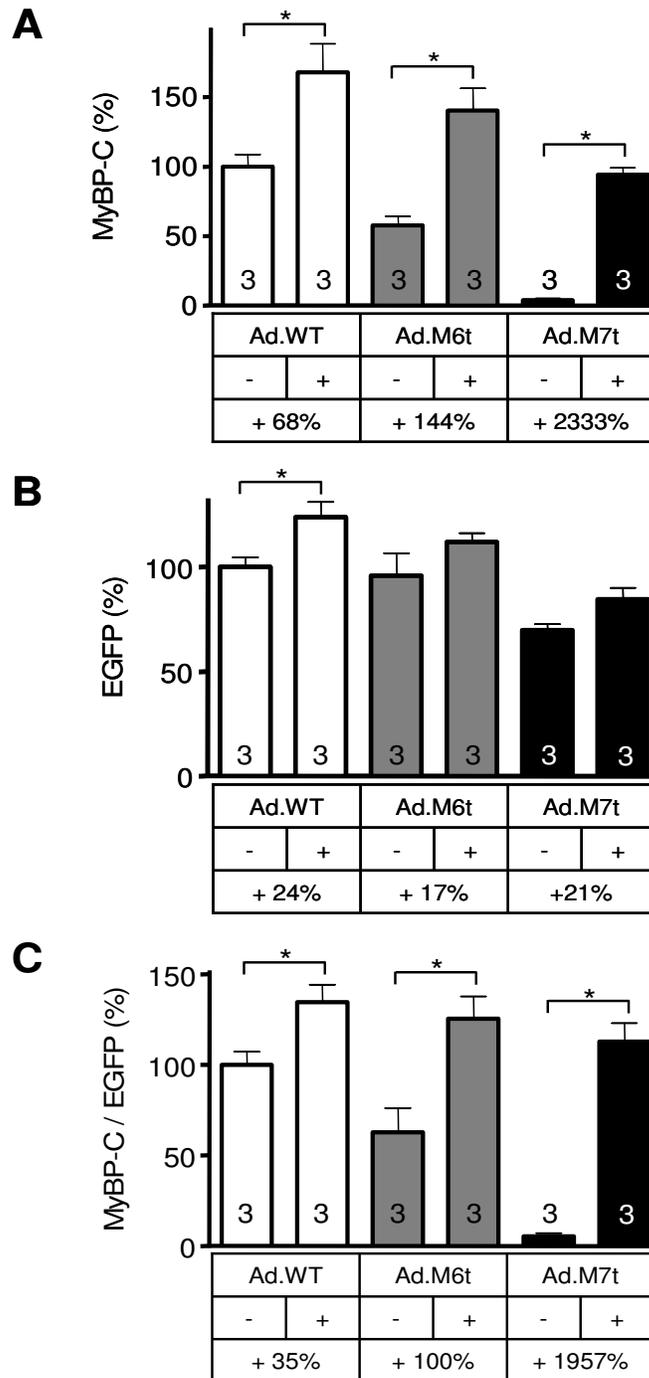


Abb. 13: Hemmung des proteasomalen Abbauweges.

Ad.WT-, Ad.M6t- bzw. Ad.M7t-infizierte neonatale Rattenkardiomyozyten nach Behandlung mit dem Proteasominhibitor MG132 (50 μ M, 2 h), bzw. ohne Behandlung.

Abb. 13A: Densitometrische Auswertung der Western Blots mit Anti-myc Primärantikörper. Abb. 13B: Densitometrische Auswertung der Western Blots mit Anti-EGFP Primärantikörper. Abb. 13C: Auswertung der MyBP-C-Konzentration normiert auf die EGFP-Konzentration. +, nach Behandlung mit MG132; -, ohne Behandlung mit MG132. * $p < 0,05$.

3.2 Funktionelle Auswirkungen einer Überexpression des Myosin-Bindungsprotein-C und der Mutanten

3.2.1 Untersuchung der optimalen Infektionsparameter

Zur Gewährleistung eines suffizienten Transfers der adenoviralen cDNA musste zunächst der optimale Infektionszeitpunkt sowie die optimale Viruskonzentration zur Infektion der EHTs ermittelt werden.

3.2.1.1 Infektion der EHTs am 0. Kulturtag

In einem Pilotversuch wurden die NNRKM bereits direkt bei der Herstellung der EHTs mit den adenoviralen Vektoren infiziert (*multiplicity of infection: 1*). Konfokalmikroskopisch war anhand der EGFP-Expression in den folgenden Tagen eine sehr gute Transfektionseffizienz erkennbar. Allerdings war das mikroskopische Bild der auf diese Art und Weise hergestellten EHTs im weiteren Verlauf durch abgerundete avitale Zellen und homogen verteilte Zelltrümmer geprägt und es kam nicht zur Ausbildung schlagender Zellstränge. Die Methode der Infektion der EHTs am 0. Kulturtag schied somit von vornherein aus.

3.2.1.2 Infektion der EHTs am 9. Kulturtag

Bei allen weiteren Versuchen wurden die EHTs am 9. Kulturtag, also 48 Stunden vor Durchführung der Kontraktionsmessungen infiziert, um genügend Zeit für eine suffiziente Überexpression der verschiedenen C-Proteine in den Kardiomyozyten zu gewährleisten.

In weiteren Pilotexperimenten wurden die EHTs mit verschiedenen Viruskonzentrationen zwischen einer MOI von 1 und 100 behandelt, um die optimale Viruskonzentration für eine gleichmäßige Infektion aller Kardiomyozyten zu ermitteln. Dazu wurde die EGFP-Expression 48 Stunden nach Infektion der EHTs konfokalmikroskopisch ausgewertet. Ab einer MOI von 50 ($1,2 \times 10^8$ bav) war eine gleichmäßige Grünfluoreszenz fast aller Zellen und somit eine suffiziente Transfektionseffizienz zu beobachten (Abb. 14).

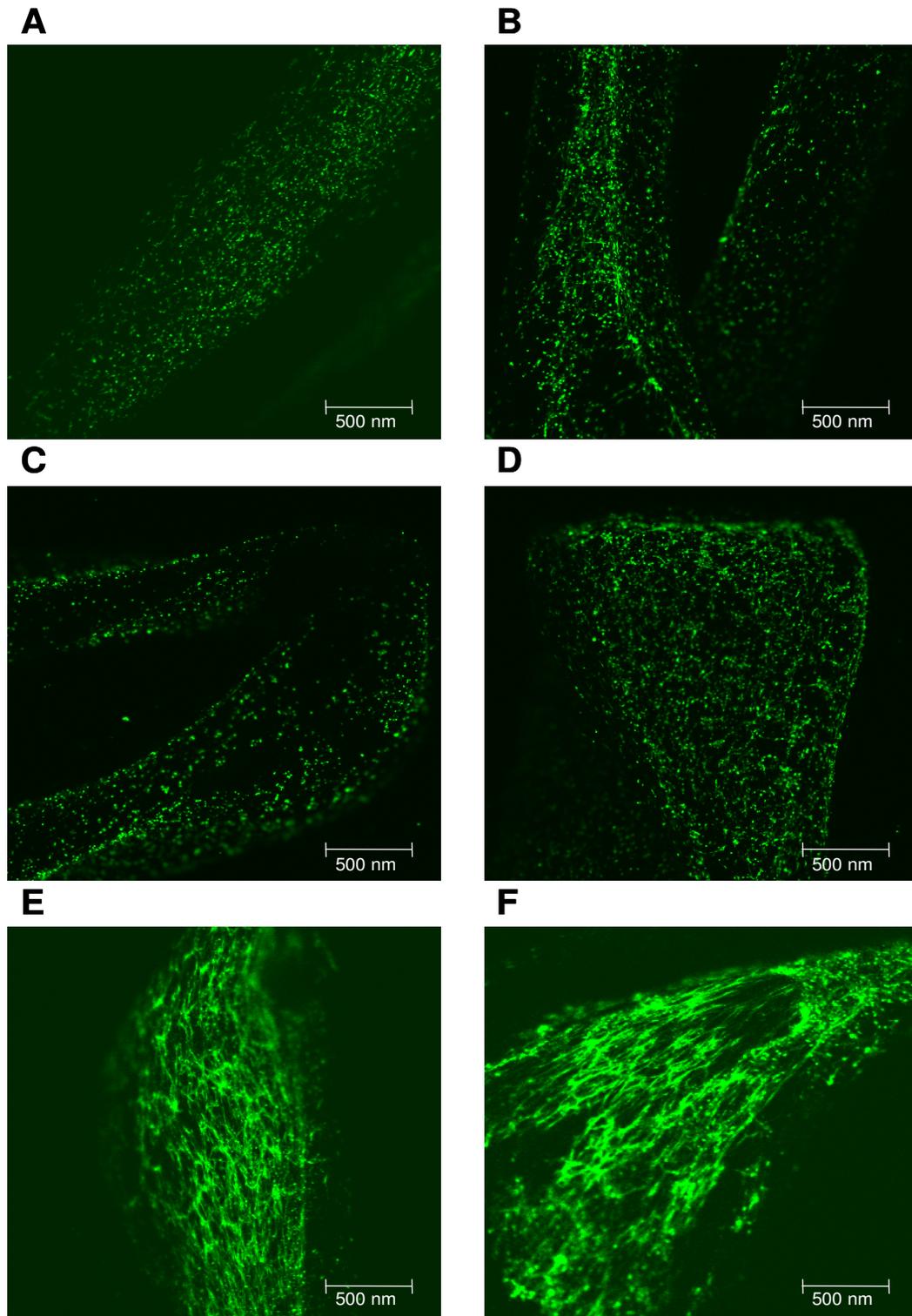


Abb. 14: Expression von EGFP bei Infektion der EHTs mit verschiedenen Viruskonzentrationen.

Konfokalmikroskopische Bilder 48 h nach Infektion der EHTs.

Abb. 14A: MOI: 1; Abb. 14B: MOI: 2; Abb. 14C: MOI: 5; Abb. 14D: MOI: 20;
Abb. 14E: MOI: 50; Abb. 14F: MOI: 100.

3.2.2 Behandlung der EHTs mit MG132

Ziel der Versuche war, die funktionellen Auswirkungen einer Überexpression des MyBP-C bzw. der trunkierten C-Proteine zu untersuchen. Da die trunkierten MyBP-C jedoch einer massiven proteasomalen Degradation unterliegen (siehe oben), erfolgte 2 h vor Durchführung der Kontraktionsexperimente die Behandlung aller EHTs mit dem Proteasominhibitor MG132, um bei allen Präparaten annäherungsweise gleiche Proteinspiegel der überexprimierten MyBP-Cs zu erreichen.

Abbildung 15 zeigt eine schematische Übersicht über den zeitlichen Verlauf der funktionellen Versuche an EHTs.

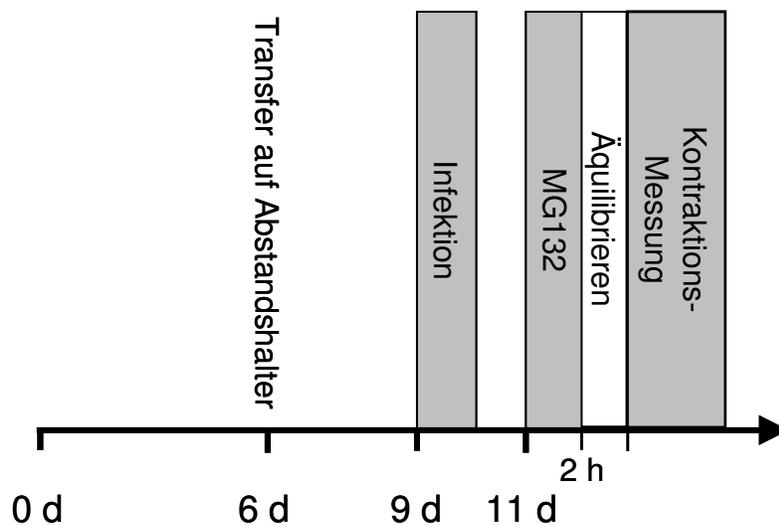


Abb. 15: Zeitlicher Verlauf der Untersuchung der funktionellen Auswirkung einer Überexpression von MyBP-C und der trunkierten C-Proteine an EHTs.

3.2.3 Bestimmung der Kontraktionsparameter

Wie in Abbildung 16 zu sehen, zeigten die WT-MyBP-C bzw. die trunkierten C-Proteine überexprimierenden EHTs basal (ohne Zugabe von Calcium oder Isoprenalin) keine signifikanten Unterschiede der Kontraktionskraft.

Alle adenoviral transfizierten Präparate zeigten im Vergleich zu nicht-infizierten EHTs eine deutlich verminderte basale Kontraktionskraft sowie eine vergleichsweise geringere Kraftzunahme und maximale Kontraktionskraft sowohl unter Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration als auch unter Stimulation mit dem β -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin.

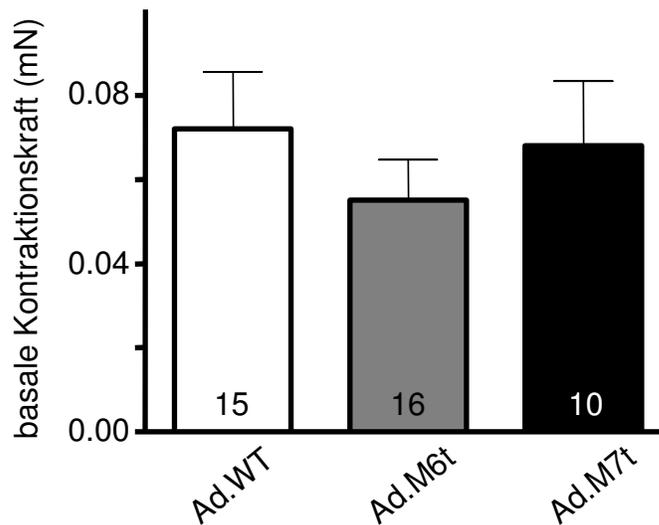


Abb. 16: Kontraktionsdaten von WT-, M6t- und M7t-MyBP-C überexprimierenden EHTs.

Kontraktionskraft unter basalen Bedingungen.

3.2.3.1 Effekt von Calcium

Auf die Erhöhung der extrazellulären Konzentration von Calcium reagierten die mit dem Ad.WT infizierten Präparate mit einer geringeren Kraftzunahme als jene EHTs, welche die M7t-Mutante überexprimierten. Des Weiteren zeigten sie eine verminderte maximale Kontraktionskraft. Die Kraftzunahme sowie die maximale Kontraktionskraft der mit dem Ad.M6t infizierten Präparaten nahm zwischen den beiden erstgenannten Gruppen von EHTs eine Mittelstellung ein (Abb.17).

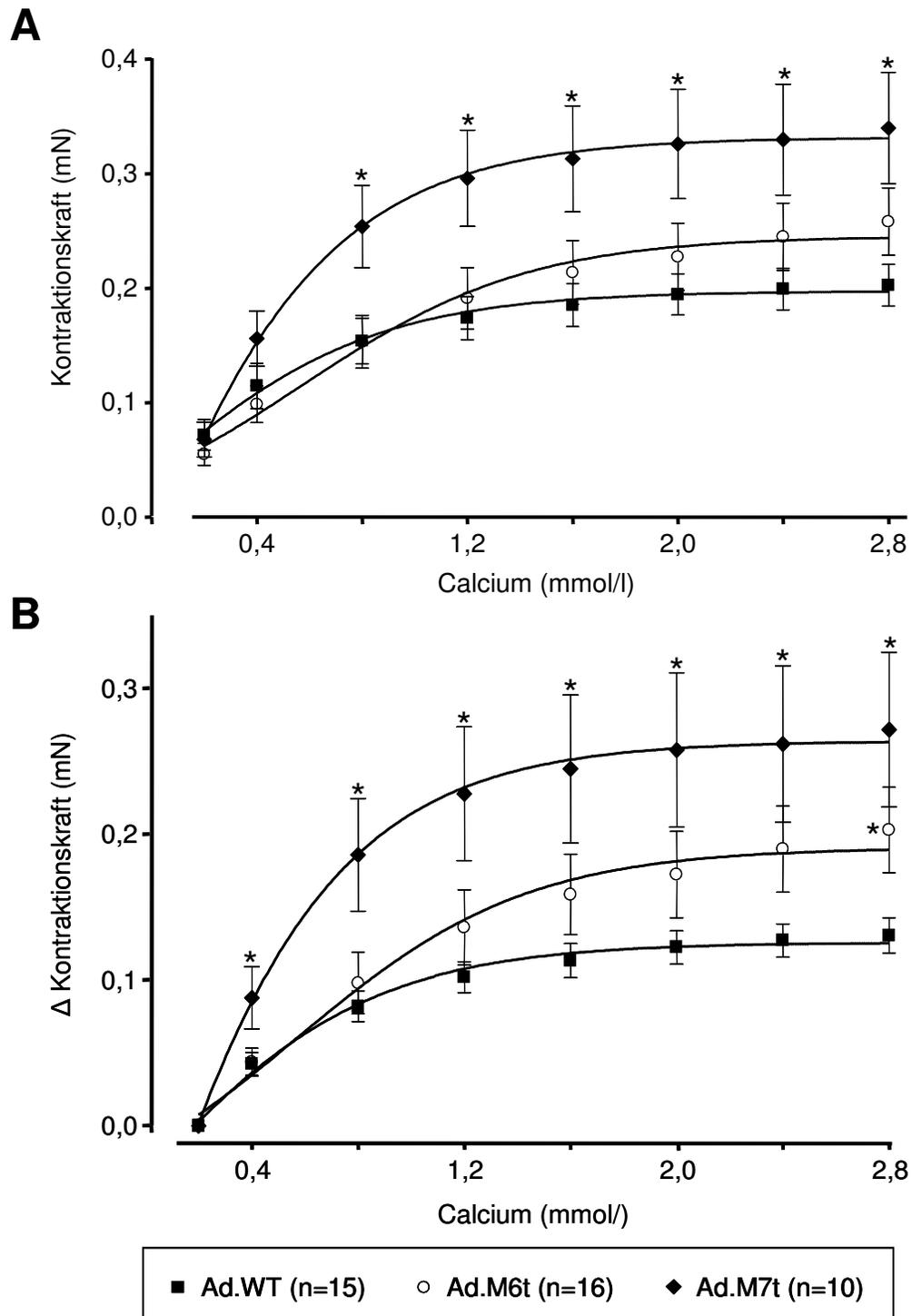


Abb. 17: Kontraktionsdaten der WT-, M6t- und M7t-MyBP-C überexprimierenden EHTs.

Abb. 17A: Absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von extrazellulärem Calcium, Abb. 17B: Änderung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von extrazellulärem Calcium. Die Werte sind arithmetische Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. WT.

Zur Beurteilung der Sensitivität gegenüber Calcium ist in Abb. 18 die Kraftentwicklung der EHTs auf den Maximalwert normiert dargestellt. Hierbei fand sich ein am deutlichsten im Bereich einer extrazellulären Calciumkonzentration von 1,2 mmol/l erkennbarer flacherer Anstieg der Ca^{2+} -Konzentrationswirkungskurve (KWK) der mit Ad.M6t infizierten Präparate im Vergleich zur Ca^{2+} -KWK der WT-überexprimierenden Präparate. Außerdem war ebenfalls im mittleren Ca^{2+} -Konzentrationsbereich ein steilerer Anstieg der Ca^{2+} -KWK der M7t-überexprimierenden EHTs erkennbar.

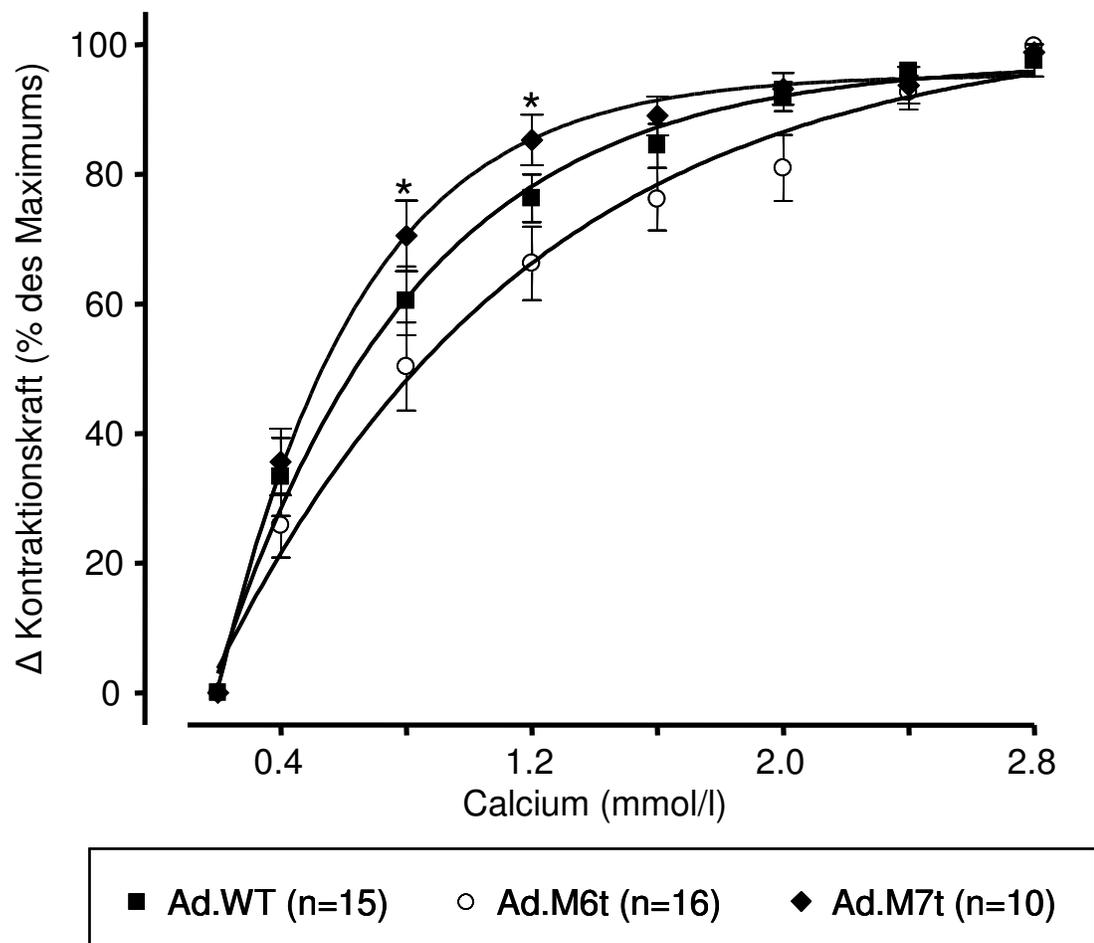


Abb. 18: Kontraktionsdaten von WT-, M6t- und M7t-MyBP-C überexprimierenden EHTs.

Zunahme der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen des extrazellulären Calciums, bezogen auf die maximale Kontraktionskraft.

* $p < 0,05$ vs. M6t.

3.2.3.2 Effekt von Isoprenalin

Wie aus Abbildung 19 ersichtlich, zeigten die mit Ad.WT infizierten EHTs auf Stimulation mit dem β -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin vergleichsweise die geringste Kraftzunahme und maximale Kontraktionskraft. Bei den die M6t-Mutante überexprimierenden Präparaten fand sich im Vergleich tendenziell eine größere Steigerung der Kontraktionskraft sowie eine größere maximale Kraftentwicklung.

Die mit dem Ad.M7t infizierten EHTs reagierten auf die Stimulation mit Isoprenalin mit einer größeren Zunahme der Kontraktionskraft als die WT- oder M6t-MyBP-C überexprimierenden Präparate. Auch die maximale Kontraktionskraft lag über WT- und M6t-Niveau.

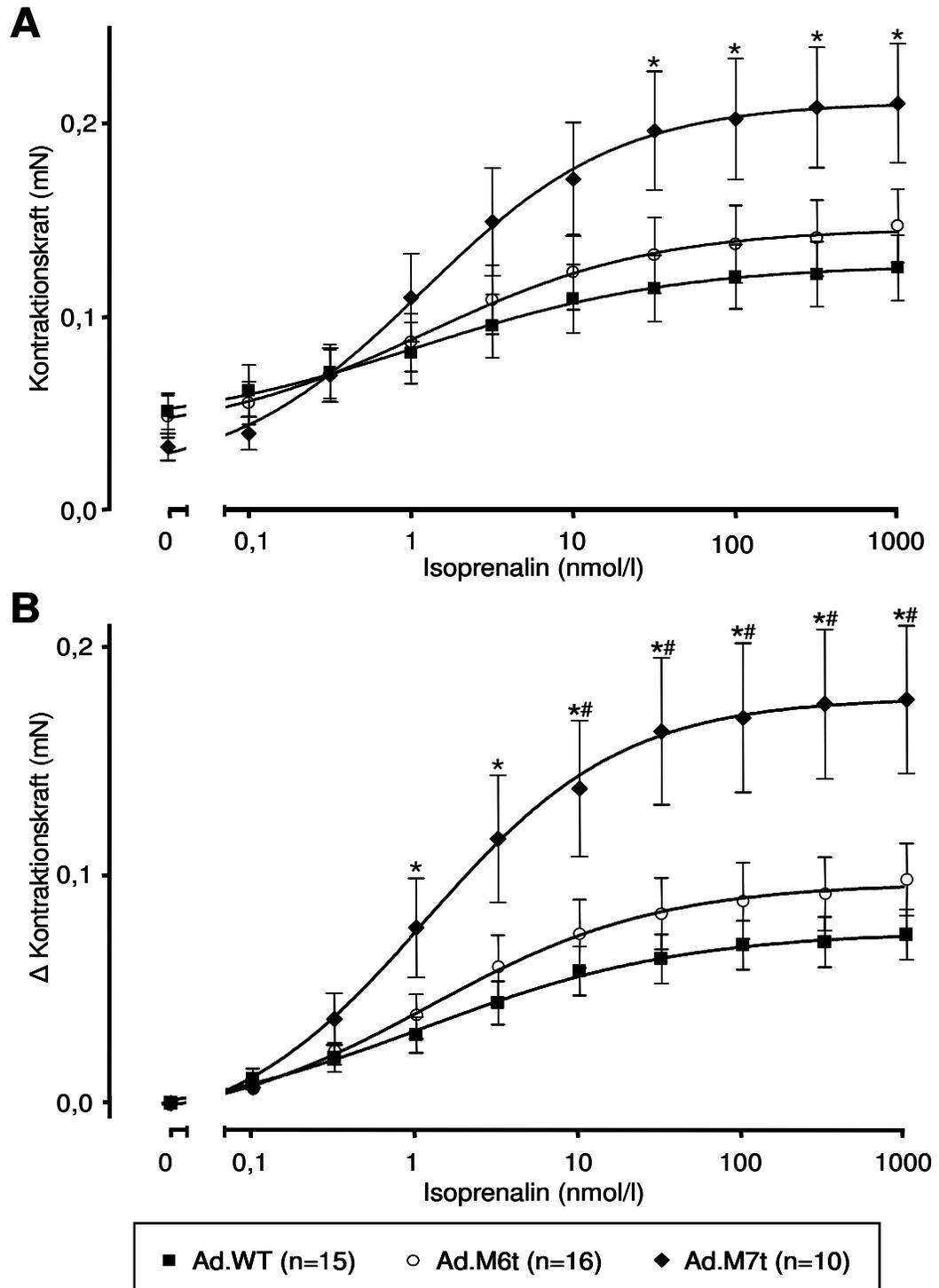


Abb. 19: Kontraktionsdaten von WT-, M6t- und M7t-MyBP-C überexprimierenden EHTs

Abb. 19A: Absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Isoprenalin, Abb. 19B: Änderung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Isoprenalin. * p < 0,05 vs. WT. # p < 0,05 vs. M6t.

Zur Beurteilung der Sensitivität gegenüber Isoprenalin ist in Abb. 20 die Kraftzunahme auf den Maximalwert normiert dargestellt. Hierbei zeigte sich eine andeutete Linksverschiebung der Isoprenalin-Konzentrationswirkungskurve (KWK) der M7t-überexprimierenden EHTs im Vergleich zur KWK der mit Ad.WT infizierten Kontrollen. Zwischen den WT und M6t überexprimierenden Präparaten waren keine Unterschiede erkennbar, die ISO-KWKs dieser beiden Gruppen sind annähernd deckungsgleich.

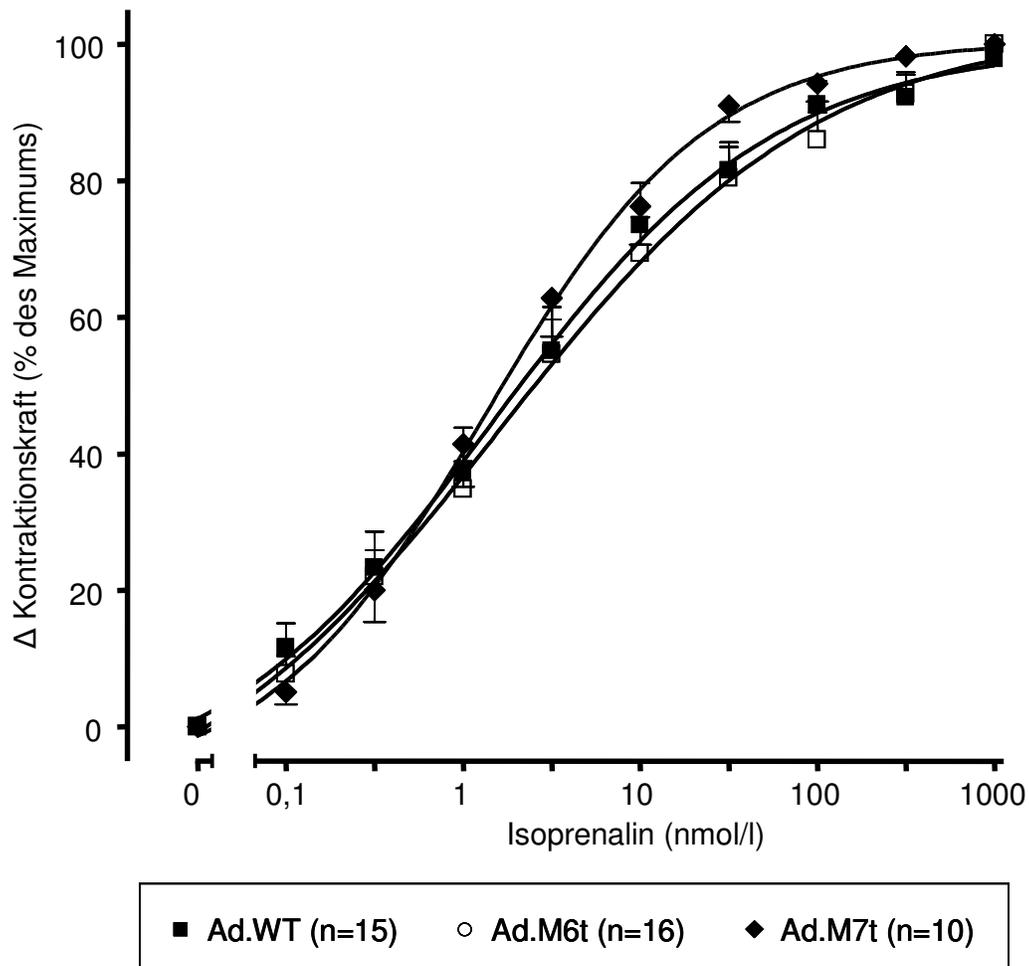


Abb. 20: Kontraktionsdaten von WT-, M6t- und M7t-MyBP-C überexprimierenden EHTs.

Zunahme der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Isoprenalin, bezogen auf die maximale Kontraktionskraft.

3.2.4 Histologische Charakterisierung

Zur Beurteilung der Morphologie der infizierten Kardiomyozyten wurden EHT-Quetschpräparate konfokalmikroskopisch untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt. Anhand der Grünfluoreszenz ließen sich Kardiomyozyten mit langen und dünnen Zellausläufer und sternförmiger dreidimensionaler Morphologie beobachten, die ein netzartiges Geflecht ausbildeten. Neben vitalen Zellen befanden sich auch zahlreiche nicht spreitende, vermutlich avitale Zellen innerhalb der Matrix. Bei der histologischen Untersuchung waren zwischen den WT-, M6t- und M7t-MyBP-C überexprimierenden Präparaten keine morphologischen Unterschiede erkennbar.

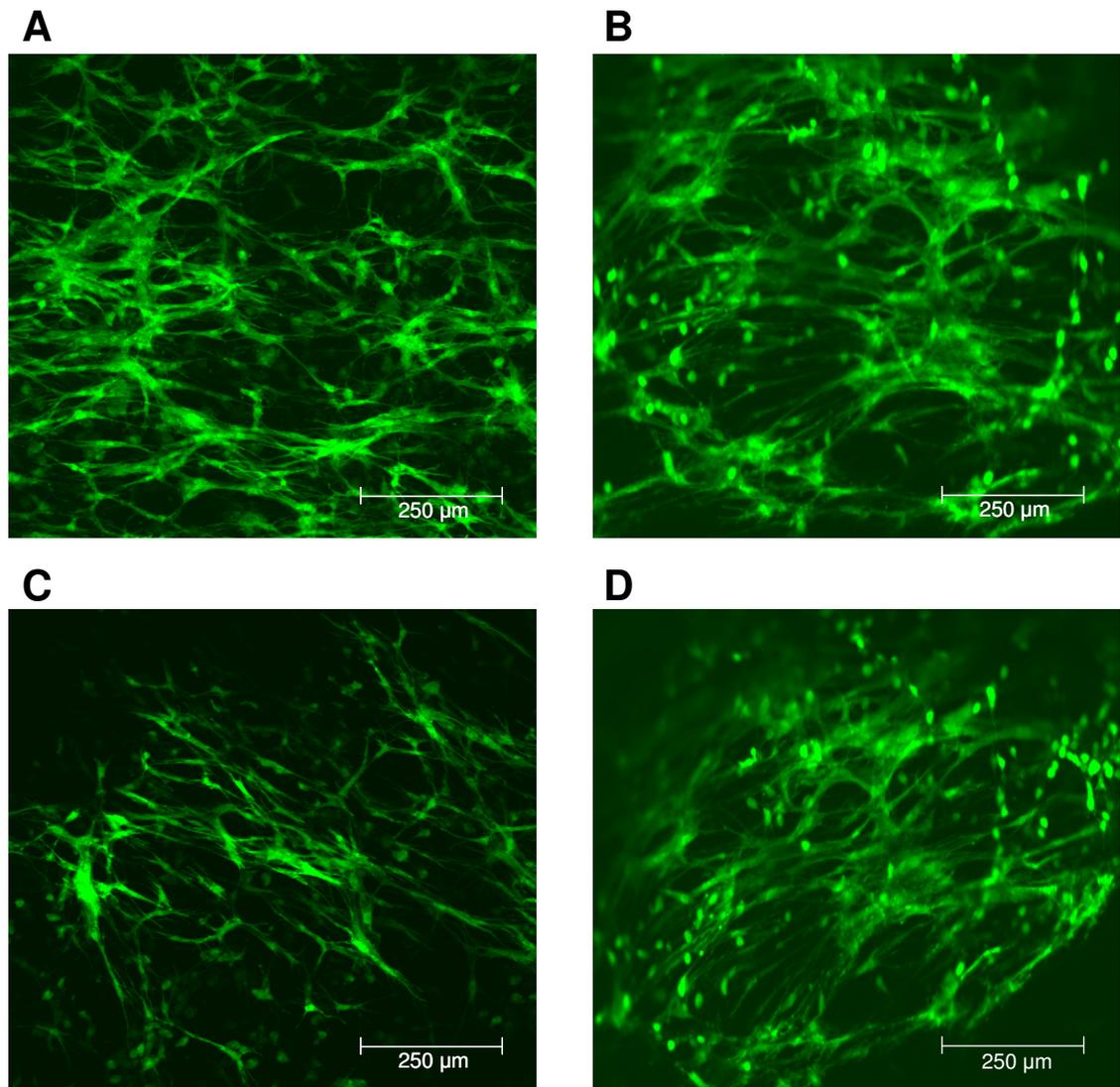


Abb. 21: Morphologie der infizierten Kardiomyozten in EHTs.

Konfokalmikroskopische Bilder von EHT-Quetschpräparaten 48 h nach Infektion der EHTs mit den adenoviralen Vektoren.

3.2.5 Proteinexpression in EHTs

Wie in Abbildung 22 und 23 zu erkennen fanden sich bei der Untersuchung der Proteinexpression der mit dem Proteasominhibitor MG132 behandelten EHTs mittels Western Blot annäherungsweise den Ergebnissen der mit MG132 behandelten Kardiomyozyten in 2D-Kultur entsprechende Befunde.

Die M6t-MyBP-C-Konzentration lag $32\pm 10\%$ ($n=3$) unter Wildtyp-Niveau, die M7t-MyBP-C-Konzentration war um $25\pm 11\%$ ($n=3$) vermindert (Abb. 23A). Um Unterschiede bezüglich der Infektionseffizienz zu minimieren, wurde parallel die EGFP-Konzentration mitbestimmt (Abb. 23B) und die Ergebnisse auf diese normiert. Es zeigte sich EGFP-normiert bei den mit Ad.M6t infizierten EHTs eine im Vergleich zum WT-MyBP-C um $4\pm 10\%$ ($n=3$) verminderte Proteinkonzentration, bei den M7t-MyBP-C überexprimierenden Präparaten lag sie $10\pm 11\%$ ($n=3$) unter WT-Niveau (Abb. 23C).

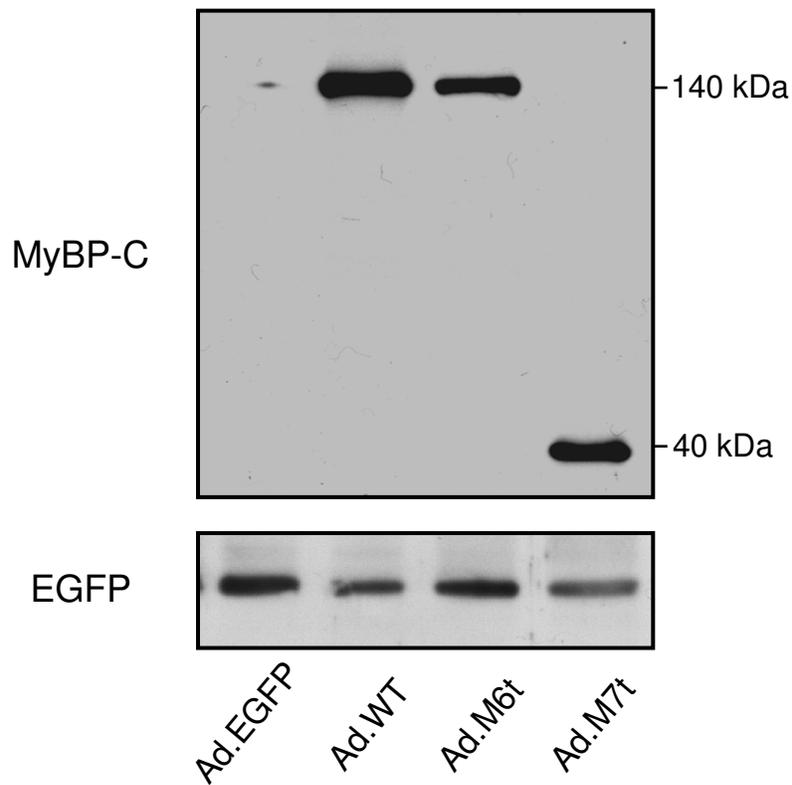


Abb. 22: Proteinkonzentration von Wildtyp und trunkiertem cMyBP-C in EHTs.

Repräsentativer Ausschnitt eines Western Blot unter Verwendung des Anti-myc Primärantikörpers, der adenoviral überexprimiertes cMyBP-C detektiert. Die untersuchten Proben stammen von mit Ad.EGFP-, Ad.WT-, Ad.M6t- bzw. Ad.M7t-infizierten EHTs, die mit dem Proteasominhibitor MG132 (50 μ M, 2 h) behandelt wurden. Als interne Kontrolle wurde parallel die EGFP-Konzentration mitbestimmt.

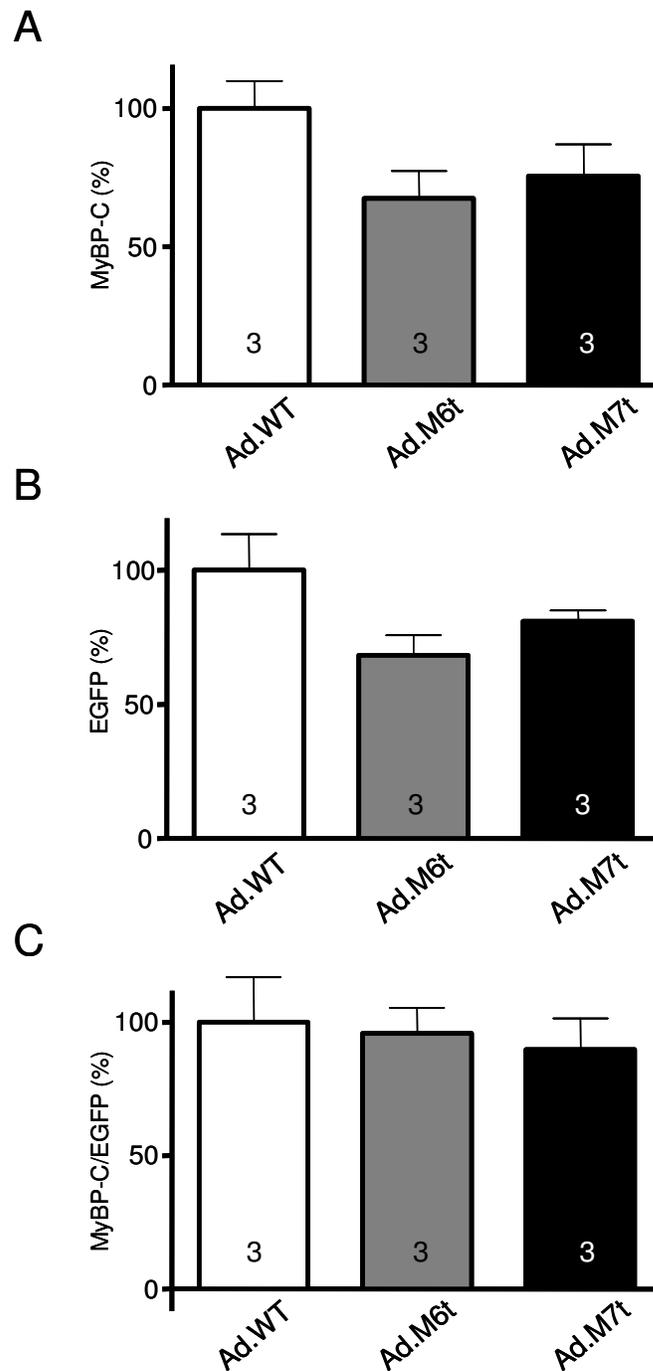


Abb. 23: Proteinkonzentration von Wildtyp und trunkiertem cMyBP-C in EHTs.

Lysate von EHTs 48 h nach Infektion mit Ad.WT, Ad.M6t bzw. Ad.M7t. Die Proben wurden mit dem Proteasominhibitor MG132 (50 μ M, 2 h) behandelt.

Abb. 23A: Densitometrische Auswertung der Western Blots mit Anti-myc Primärantikörper. Abb. 23B: Densitometrische Auswertung der Western Blots mit Anti-EGFP Primärantikörper. Abb. 23C: Auswertung der MyBP-C-Konzentration normiert auf die EGFP-Konzentration.

4 Diskussion

4.1 Zielsetzung und Fragestellungen dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Mechanismen der Krankheitsentwicklung bei der familiären hypertrophen Kardiomyopathie infolge Mutationen des Myosin-Bindungsprotein-C.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Sind die aufgrund von Mutationen im MyBP-C-Gen veränderten MyBP-C-Transkripte und Proteine stabil und werden die veränderten Proteine in die Sarkomere integriert?
2. Beeinträchtigen Mutationen des MyBP-C die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten?

Hierbei wurden folgende Hauptergebnisse erzielt:

1. Die aufgrund von Mutationen im MyBP-C-Gen veränderte MyBP-C-mRNA ist stabil. Die entsprechenden Proteine unterliegen einer verstärkten proteasomalen Degradation. Dies gilt vor allem für die am stärksten verkürzte Mutante M7t. Des Weiteren kommt es zu einer Assoziation der trunkierten C-Proteine mit sarkomerischen Proteinen.
2. Eine Überexpression von M7t-MyBP-C führt im Vergleich zu einer Überexpression von Wildtyp-MyBP-C im EHT-Modell zu einer verbesserten inotropen Antwort auf Zugabe von Calcium und auf betaadrenerge Stimulation sowie zu einer Erhöhung der maximalen Kontraktionskraft. Bei Überexpression von M6t-MyBP-C kommt es im Vergleich zu einer Überexpression des Wildtyp-C-Protein zu keinen signifikanten Veränderungen der Kontraktionsparameter.

4.2 Darstellung von Myosin-Bindungsprotein-C auf mRNA- und Proteinebene

Bei der Untersuchung der MyBP-C Transkripte der mit den rekombinanten Viren infizierten HEK-Zellen zeigten sich zwischen den Wildtyp- und den mutierten C-Proteinen keine quantitativen Unterschiede. In weiteren Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass dies auch für neonatale Rattenkardiomyozyten gilt (Sarikas et al. 2005). Man kann daher annehmen, dass die Stabilität der überexprimierten mRNA nicht beeinträchtigt ist. Auch bei Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie verursacht durch Mutationen im cMyBP-C-Gens konnte in Myokardbiopsien die veränderte mRNA dargestellt werden, obwohl die zu erwartenden trunkierten C-Proteine nicht nachweisbar waren (Rottbauer et al. 1997, Moolman et al. 2000).

Eine Plasmid-vermittelte Überexpression von menschlichen trunkierten MyBP-Cs in neonatalen Rattenkardiomyozyten oder bei transgenen Mäusen resultierte in deutlich verminderten C-Proteinmengen (Flavigny et al. 1999, Yang et al. 1999). Die durchgeführten Untersuchungen zur Darstellung der überexprimierten MyBP-Cs unterstreichen diese Beobachtungen. Bei den M6t-überexprimierenden Kardiomyozyten kam es im Vergleich zum Wildtypprotein zu einer Reduktion der C-Proteinkonzentration um 35%, bei der stärker trunkierten M7t-Mutante war die Proteinkonzentration um 94% vermindert.

Es konnte gezeigt werden, dass die deutlich verminderte Proteinkonzentration auf einen verstärkten Abbau der mutierten Proteine durch das proteasomale Abbausystem zurückzuführen ist. Berücksichtigt man die Tatsache, dass bei dieser Versuchsanordnung ein starker CMV-Promotor für die Überexpression der C-Proteine verantwortlich ist, so erscheint es durchaus möglich, dass es bei Patienten mit HCM zu einer vollständigen Degradation der trunkierten Proteine kommt und diese folglich nicht nachweisbar sind. Durch Zugabe des Proteasominhibitors MG132 kam es zu einem Anstieg der Proteinmenge der trunkierten MyBP-C auf Wildtypniveau. In weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die M7t-Mutante nicht nur einer verstärkten Degradation durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) unterliegt, sondern auch den Abbau anderer Proteine durch das UPS beeinflusst (Sarikas et al. 2005). Einschränkend ist zu bedenken, dass der verstärkte Abbau durch die starke Überexpression der exogenen C-Proteine mitbedingt sein könnte. Nichtsdestotrotz könnte

der bei den experimentellen Versuchen beobachtete Effekt in gewisser Hinsicht bei der Pathogenese der HCM von Bedeutung sein. So nimmt mit zunehmendem Alter und bei oxidativem Stress die Aktivität des proteasomalen Abbausystems ab (Bulteau et al. 2000; Okada et al. 1999). Wenn man berücksichtigt, dass trunkierte cMyBP-C-Mutanten möglicherweise eine dauerhafte, lebenslange Mehrarbeit des UPS bedingen, so könnte dies einen verminderten Abbau durch Alterung oder oxidativen Stress entstandener abnormaler Proteine zur Folge haben. Die Akkumulation derartiger Proteine könnte möglicherweise toxisch sein und/oder die zelluläre Homöostase stören und somit Auslöser einer spätauftretenden Kardiomyopathie sein, wie sie für die FHC bedingt durch Mutationen des MYBPC3-Gens typisch ist (Niimura et al. 1998).

Die trunkierten Proteine assoziieren in unterschiedlichem Ausmaß mit sarkomerischen Strukturen. So konnte anhand der Sarkomerpräparation nachgewiesen werden, dass die trunkierten Proteine zu erheblichem Anteil in der sarkomerischen Proteinfraction vorhanden sind. Durch immunhistochemische Versuche unserer Arbeitsgruppe konnte zudem gezeigt werden, dass das überexprimierte humane Wildtypprotein in neonatalen Rattenkardiomyozyten (NNRKM) erwartungsgemäß in die A-Bande des Sarkomers integriert wird. Die M6t-Mutante wird ebenfalls in die A-Bande inkorporiert, jedoch diffuser und in geringerem Ausmaß als das Wildtyp-C-Protein. Das M7t-Protein wird nicht in A-Bande eingebaut, sondern fehlintegriert vor allem im Bereich der Z-Bande (Sarikas et al. 2005). Diese Befunde decken sich mit den Beobachtungen von Squire et al. (2003). Die Autoren führten Sequenzanalysen des cMyBP-C durch und entdeckten eine mögliche Aktinbindungsstelle zwischen der C0- und der C1-Domäne des kardialen C-Proteins. Auch Immunpräzipitations- und Cosedimentationsversuche an NNRKM zeigten, dass humane cMyBP-C-Fragmente, welche lediglich die C0-Domäne des C-Proteins beinhalten, an Aktin binden (Kulikovskaya et al. 2003).

4.3 Funktionelle Auswirkungen einer Überexpression des Myosin-Bindungsprotein-C und trunkierter C-Proteine

4.3.1 Adenoviraler Gentransfer

EHTs zeigten nach der Infektion mit den verschiedenen Adenoviren (Ad.WT, Ad.M6t, Ad.M7t; MOI 50) eine Transfektionseffizienz von nahezu 100% der vitalen Zellen, ohne dass zytopathische Effekte beobachtet werden konnten. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Zimmermann et al. (2000) überein, die erstmals einen adenoviralen Gentransfer am EHT-Modell vornahmen. Hingegen liegt die Transfektionseffizienz von adenoviralen Vektoren *in vivo* nach direkter Injektion in das Myokard oder nach intrakoronarer Injektion bei Werten von maximal 70% (Li et al 1997, Shah et al. 2000, Schmidt et al. 2000). Andere Methoden wie die Applikation ungeschützter cDNA oder Lipofektion, die eine kurzfristige Expression von transgenem Material ermöglichen, zeigen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durchweg niedrigere Transfektions- bzw. Transduktionseffizienzen (Übersicht bei Harsdorf und Dietz 1998, Flavigny et al. 1999).

Bezüglich der Proteinexpression der verschiedenen humanen cMyBP-Cs zeigten die mit dem Proteasominhibitor MG132 behandelten EHTs den Ergebnissen der neonatalen Rattenkardiomyozyten in 2D-Zellkultur entsprechende Befunde. Es waren zwischen den die verschiedenen C-Proteine exprimierenden Präparaten keine signifikanten Unterschiede der Proteinkonzentration erkennbar. Diese Beobachtungen lassen in Verbindung mit Ergebnissen der histologischen Untersuchungen, die eine gute Transfektionseffizienz zeigen, auf eine erfolgreiche Überexpression der humanen MyBP-Cs und somit einen suffizienten adenoviralen Gentransfer im verwendeten EHT-Modell schließen.

4.3.2 Kontraktionsexperimente

Das cMyBP-C kann durch betaadrenerge Stimulation via cAMP-abhängiger Proteinkinase (PKA; Lim und Walsh 1986) oder durch die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase (Schlender und Bean 1990) phosphoryliert werden. Die Phosphorylierungsstelle, das sog. MyBP-C-Motiv, verbindet die C1- und die C2-Domäne des C-Proteins. Durch die Phosphorylierung kommt es zu einer Aufhebung der Bindung zwischen dem C-Protein und dem S2-Segments des Myosins, weshalb auf eine mögliche regulatorische Funktion dieser Modifikation geschlossen wurde (Gruen et al. 1999; Kunst et al. 2000). Die durch Phosphorylierung des MyBP-C bedingte Lösung der Bindung zwischen S2-Segment des Myosins und dem C-Protein hat wahrscheinlich eine erhöhte Mobilität der Myosinköpfechen zur Folge. Dadurch könnte eine verbesserte Interaktion zwischen den Myosinköpfechen und Aktin resultieren (Weisberg und Winegrad 1996). Yang et al. (2001) konnten bei Versuchen an Langendorffherzen von transgenen Mäusen, welchen die Phosphorylierungsstelle des MyBP-C-Motivs fehlte, einen Zunahme der Kontraktionskraft feststellen. Auch bei Versuchen an gehäuteten Kardiomyozyten homozygoter Knockout-Mäuse, das heißt bei vollständigem Fehlen des C-Proteins zeigte sich eine Zunahme der maximalen Ca^{2+} -abhängigen Kontraktionskraft (Korte et al. 2003).

Eine Überexpression der stark trunkierten M7t-Mutante, der neben dem MyBP-C-Motiv auch die Myosin- und Titinbindungsregion der C8-C10-Domäne fehlt (Abb.1), hatte bei den Kontraktionsversuchen am EHT-Modell eine gesteigerte Kraftzunahme und maximale Kontraktionskraft sowohl Ca^{2+} -abhängig als auch bei Stimulation mit Isoprenalin bei unveränderter basaler Kontraktionskraft zur Folge. Bei der Untersuchung der Sensitivität gegenüber Calcium und ISO zeigte sich in beiden Fällen eine angedeutete Linksverschiebung der Konzentrationswirkungskurven.

Kulikovskaya et al. (2003) führten Kontraktionsexperimente an Triton-gehäuteten Rattenherztrabekeln nach Diffusion eines humanen cMyBP-C-Fragmentes durch. Das verwendete Fragment enthielt lediglich die C0- und die C1-Domäne des C-Proteins und ist somit der M7t-Mutante ähnlich. Es zeigte sich eine Zunahme der Ca^{2+} -Sensitivität sowie eine Verminderung der maximalen Ca^{2+} -abhängigen Kontraktionskraft. Die Autoren argumentieren, dass die exogenen Proteinfragmente durch Bindung an Aktin die Aktinbindungsstellen besetzen. Daher kann das endogene MyBP-C nicht mehr oder nur in

vermindertem Ausmaß an Aktin binden oder wird aus der Aktinbindung verdrängt. Dies hat möglicherweise eine Heterogenität der Aktinmonomere und dadurch eine Veränderung der Affinität von Aktin zum C-Protein zur Folge, woraus schließlich eine verminderte Kontraktionskraft resultieren könnte. Auch bei den Kontraktionsversuchen an EHTs zeigte sich nach Überexpression der M7t-Mutante eine im Vergleich zum Wildtyp tendenziell erkennbare Erhöhung der Calciumsensitivität. Im Gegensatz zu den oben genannten Befunden von Kulikovskaya et al. war aber im EHT-Modell sowohl nach Zugabe von Calcium als auch unter Stimulation mit Isoprenalin eine gesteigerte Kraftzunahme sowie eine größere maximale Kontraktionskraft im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle nachweisbar.

Bei der Interpretation der unterschiedlichen Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass die Untersuchungen an verschiedenen Modellsystemen durchgeführt wurden. Die oben genannten Versuche wurden an einem artifiziellen Modellsystem mit chemisch gehäuteten Herzmuskelzellen durchgeführt. Während in gehäuteten Zellen einige wichtige physiologische Prozesse wie beispielsweise die Phosphorylierung von regulatorischen Proteinen wie dem MyBP-C durch Proteinkinasen nicht oder nur in eingeschränktem Maße möglich sind, handelt es sich beim EHT-Modell um ein System lebender Kardiomyozyten, das bezüglich funktioneller und struktureller Eigenschaften den physiologischen Verhältnissen *in vivo* sehr nahe kommt (Eschenhagen et al 1997; Zimmermann et al. 2000). Auch erfolgte die Überexpression der C-Proteine in EHTs bereits 48 h vor Durchführung der Kontraktionsexperimente, wodurch eine lang andauernde Interaktionszeit zwischen exogenen Proteinen und sarkomerischen Strukturen der KM gewährleistet war und nicht erst unmittelbar vor Beginn der Kontraktionsversuche.

Es ist auch zu berücksichtigen, dass es bei den EHT-Versuchen aufgrund der Zugabe des Proteasominhibitors MG132, welche die Blockade der massiven proteasomalen Degradation des trunkierten Proteins zur Folge hat, zu einer ausgeprägten Überexpression der M7t-Mutante kommt. Bei Patienten mit HCM hingegen waren die entsprechenden C-Proteine in Myokardbiopsien bislang nicht nachweisbar (Rottbauer et al. 1997; Moolmann et al. 2000), was möglicherweise durch den raschen Abbau der mutierten Proteine via UPS zu erklären ist.

Bei den Kontraktionsexperimenten unter Überexpression der M6t-Mutante zeigten sich im Vergleich zum Wildtyp-MyBP-C im EHT-Modell keine signifikanten Veränderungen der

Kontraktionsparameter. Es war jedoch eine tendenziell bessere inotrope Antwort der Präparate auf Veränderung der extrazellulären Calciumkonzentration und auf Stimulation mit dem β -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin zu beobachten. Die Sensitivität der M6t-überexprimierenden EHTs auf betaadrenerge Stimulation war tendenziell leicht vermindert.

Möglicherweise kommt es bei einer Expression des humanen Wildtyp-MyBP-C in Rattenkardiomyozyten durch die Inkorporation in das Sarkomer zu einer Verdrängung des endogenen C-Proteins und daraus resultierend zu einer Störung der Stöchiometrie des Sarkomers. Dies könnte zu einer Regulationsstörung des Kontraktionsvorgangs führen, welche eine Verschlechterung der Kontraktionsparameter zur Folge hat. Es würde auch die im Vergleich tendenziell besseren Ergebnisse der Kontraktionsmessungen bei Überexpression des M6t-Proteins erklären. Da das mutierte Protein aufgrund der mutierten Myosin- und Titinbindungsstelle der C10-Domäne in geringerem Maße in die A-Bande des Sarkomers integriert wird als das Wildtypprotein (Sarikas et al. 2005), kommt es hier möglicherweise zu einer geringeren Beeinflussung des Kontraktionsablaufes. Das im Bereich der Z-Bande fehlintegrierende M7t-Protein würde demnach den Aufbau des dicken Filaments am wenigsten stören und folglich eine geringere Alteration der Muskelkontraktion bedingen. Auch die Störung des Kontraktionsvorganges aufgrund von speziesbedingten Unterschieden der Aminosäuresequenz zwischen Human- und Ratten-MyBP-C könnte eine mögliche Ursache der Hypokontraktilität des gut inkorporierenden Wildtypproteins im Vergleich zur fehlintegrierenden M7t-Mutante sein.

Aufgrund der nach Überexpression der MyBP-C-Mutanten, insbesondere des M7t im Vergleich zum Wildtyp-C-Protein beobachteten Hyperkontraktilität sprechen die funktionellen Untersuchungen am EHT-Modell eher gegen die Hypothese einer dominant-negativen (*poison polypeptide*) Wirkung der trunkierten MyBP-Cs.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Mutationen in FHC-verursachenden Genen eine Hypokontraktilität oder eine Hyperkontraktilität des Sarkomers zur Folge haben können (Redwood et al. 1999). Es ist schwer zu vereinen, wie diese verschiedenen Mechanismen schließlich zur Ausbildung eines gemeinsamen Phenotyps führen. Eine mögliche Erklärung geht davon aus, dass es bei allen sarkomerischen HCM-Mutationen zu einer ineffizienten ATP-Verwertung kommt (Ashrafian et al. 2003). Die Annahme, dass

der HCM ein „Energieverlust“ zugrunde liegt, wird durch das Auftreten eines HCM-ähnlichen Phänotyps bei einer Vielzahl von Mutationen in metabolischen Genen gestützt. Trotz zahlreicher Hypothesen bleiben die tatsächlichen Mechanismen der Pathogenese der FHC durch Mutationen des MyBP-C weiterhin unklar.

4.4 Einschränkungen und offene Fragen

Bei den Ergebnissen dieser Arbeit ist einschränkend zu bedenken, dass es bei Kontraktionsexperimenten mit EHTs modellbedingt und zeitabhängig zu relativ großen Schwankungen zwischen einzelnen Versuchsserien kommen kann. Bei den Untersuchungen des Effektes einer Überexpression des humanen C-Proteins bzw. seiner Mutanten, die über einen Zeitraum von einem Jahr durchgeführt wurden, zeigten sich die beobachteten Effekte unterschiedlich stark ausgeprägt. Jedoch waren die qualitativen Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen von EHTs zu jeder Zeit feststellbar, was für eine gute Reproduzierbarkeit spricht.

Bei der Beurteilung der erhobenen Daten ist zu beachten, dass die selektive Hemmung des Proteasom durch den verwendeten Proteasominhibitor MG132 nur durch Angaben in der Literatur angenommen und nicht durch Validierung in diesem Versuchsaufbau bewiesen wurde. Des Weiteren ist bekannt, dass die Behandlung von lebenden Zellen mit MG132 auch einen proapoptotischen Nebeneffekt zur Folge hat (Meiners et al. 2002). Da jedoch ohne Zugabe eines Proteasominhibitors durch die rasche Degradation der trunkierten MyBP-Cs die Untersuchung deren Effekte auf den kontraktilen Apparat nur eingeschränkt möglich ist, erfolge die Behandlung aller EHTs mit MG132.

Ferner können zytotoxische Einflüsse durch die adenovirale Infektion der Kardiomyozyten oder durch das zur Kontrolle der Transfektionseffizienz eingesetzte EGFP nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden (Davia et al. 1999; O'Donnell et al. 2001).

4.5 Bedeutung der Ergebnisse für die Erforschung und Therapie der familiären hypertrophen Kardiomyopathie

Die heute möglichen Maßnahmen zur Behandlung der hypertrophen Kardiomyopathie beschränken sich auf wenige Medikamente sowie auf einige weitergehende Interventionen wie Myektomie, Schrittmacherimplantation oder Ablation hypertrophierter Septumregionen bei Patienten, bei denen die medikamentöse Therapie keinen Erfolg zeigt (Übersicht bei Vosberg 1998; Gleichmann und Seggewiß 1998).

Obwohl verschiedene Gene und Mutationen als Ursache der HCM identifiziert wurden, sind die pathogenen Mechanismen der Krankheit noch weitestgehend unbekannt. Auch ist bislang unklar, ob und in wieweit Mutationen in FHC-Genen den Verlauf und die Prognose der Erkrankung in systemischer Weise prädeternieren. Daher ist es notwendig zur Abschätzung der Prognose, zur Therapieplanung und nicht zuletzt zur Entwicklung neuer Therapiestrategien wie beispielsweise der Gentherapie, die molekularen Mechanismen der Pathogenese der HCM besser zu verstehen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass das proteasomale Abbausystem (Ubiquitin-Proteasom-System) für eine vermehrte Degradation der trunkierten MyBP-C-Mutanten verantwortlich ist. Obwohl die Vermutung bislang spekulativ bleibt, zeigen die experimentellen Untersuchungen eine mögliche Beteiligung des UPS bei der Pathogenese der HCM durch Mutationen des cMyBP-C. Weitere Untersuchungen zu diesem Thema wurden bereits durchgeführt (Sarikas et al. 2005) bzw. stehen noch aus.

Die funktionellen Untersuchungen am EHT-Modell ordnen sich in eine Reihe von unterschiedlichen, teilweise widersprüchlichen Untersuchungen des Einflusses von Mutationen des kardialen C-Proteins auf die Kontraktilität ein. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind wohl zum einen auf die verschiedenen verwendeten Modellsysteme zurückzuführen, zum anderen sind sie wohl auch durch die Vielzahl der verschiedenen Mutationen des MyBP-C mitbedingt. Nicht zuletzt aufgrund des komplexen Aufbaus und der zahlreichen Interaktionen des C-Proteins mit anderen sarkomerischen Proteinen wird noch eine Vielzahl weiterer Experimente zur Klärung der Funktion des MyBP-C bzw. seiner Mutanten notwendig sein.

5 Zusammenfassung

Hintergrund und Ziele: Die familiäre hypertrophische Kardiomyopathie (HCM) ist eine dominant erbliche Erkrankung des Myokards. Mit einer Häufigkeit von 1:500 gehört sie zu den häufigsten dominant erblichen Gesundheitsrisiken des Menschen. Typisch für die HCM ist ein variables Spektrum von Verläufen, Schweregraden und Komplikationen. Die Erkrankung stellt die häufigste Ursache des plötzlichen Herztodes bei jüngeren Patienten und Athleten dar. Mutationen des herzspezifischen Myosin-Bindungsprotein-C (MyBP-C, C-Protein) sind mit einem Patientenanteil von ca. 40% eine der Hauptursachen der HCM. Mit den Mutationen im MyBP-C-Gen sind zwar mögliche Ursachen der hypertrophen Kardiomyopathie identifiziert worden, nicht aber die pathogenetischen Mechanismen. Ziel der Arbeit war es Mechanismen der Krankheitsentstehung bei der familiären hypertrophen Kardiomyopathie infolge Mutationen des Myosin-Bindungsprotein-C zu identifizieren. Exemplarisch wurden dazu zwei typische Mutationen des MyBP-C (M6t 3% bzw. M7t 80% Trunkierung), die beim Menschen zur Ausbildung einer HCM führen, untersucht.

Methoden: Unter Verwendung entsprechender cDNA wurden rekombinante, replikationsdefiziente Adenoviren hergestellt, die Wildtyp- oder mutiertes MyBP-C unter der Kontrolle eines CMV-Promotors exprimieren. Zur Unterscheidung vom endogenen MyBP-C wurde die cDNA N-terminal mit einem myc-Tag versehen. Die Untersuchungen wurden an neonatalen Rattenkardiomyozytenzellkulturen sowie an 3-dimensional rekonstituiertem Herzmuskelgewebe (*engineered heart tissue*, EHT) der Ratte durchgeführt. Die Herzmuskelzellen wurden adenoviral mit Wildtyp- oder mutierter MyBP-C cDNA transfiziert. Es erfolgte die Bestimmung der Transkript- und Proteinkonzentration des mutierten MyBP-C durch Northern- bzw. Western-Blot. Durch die Behandlung der Kardiomyozyten mit einem Proteasominhibitor wurde überprüft, ob das mutierte MyBP-C einem verstärkten Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System unterliegt. Die Assoziation der mutierten Proteine mit sarkomerischen Proteinen wurde mittels einer Sarkomerpräparation dargestellt. Am EHT-Modell wurden nach adenoviralem Gentransfer die Effekte auf die Kontraktilität (Konzentrations-Wirkungsbeziehungen für Ca^{2+} und den β -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin) und die Morphologie untersucht.

Ergebnisse: Bei der Untersuchung der mRNA-Konzentration zeigten sich keine Unterschiede der Transkript-Spiegel zwischen Wildtyp- und mutiertem MyBP-C.

Die Proteinkonzentration der trunkierten Proteine lag deutlich unter der des Wildtyp-C-Proteins. Die Zugabe des Proteasominhibitors MG132 führte zu einem Anstieg der Proteinspiegel auf Wildtyp-Niveau. Alle adenoviral überexprimierten Proteine assoziierten mit sarkomerischen Strukturen. Bei der Bestimmung der Kontraktionsparameter zeigten sich keine signifikanten Unterschieden zwischen Wildtyp- und M6t-MyBP-C exprimierenden EHTs. Die Überexpression der stärker trunkierten M7t-Mutante führte vergleichsweise zu erhöhter maximaler Kontraktionskraft sowohl unter Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration als auch unter Stimulation mit dem β -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin.

Schlussfolgerungen: Trunkierte MyBP-C-Mutanten unterliegen einer verstärkten Degradation durch das Ubiquitin-Proteasom-System. Möglicherweise ist dieser Mechanismus an der Pathogenese der hypertrophen Kardiomyopathie durch Mutationen des MyBP-C beteiligt. Die veränderten Kontraktionsparameter des M7t-MyBP-C im Vergleich zum Wildtyp ordnen sich in eine Reihe von Studien ein, die zeigen, dass Mutationen des C-Proteins sowohl eine Hypo- als auch eine Hyperkontraktilität zur Folge haben können. Die genauen Mechanismen dieser Veränderungen sind jedoch bislang unklar.

6 Literaturverzeichnis

- Ashrafian H, Redwood C, Blair E, Watkins H (2003) Hypertrophic cardiomyopathy: a paradigm for myocardial energy depletion. *Trends Genet* 19:263–268
- Bonne G, Carrier L, Bercovici J, Cruaud C, Richard P, Hainque B, Gautel M, Labeit S, James M, Beckmann J (1995) Cardiac myosin binding protein-C gene splice acceptor site mutation is associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 11:438-440
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Bulteau AL, Szweda LI, Friguet B (2002) Age-dependent declines in proteasome activity in the heart. *Arch Biochem Biophys* 397:298-304
- Carrier L, Hengstenberg C, Beckmann JS, Guicheney P, Dufour C, Bercovici J, Dausse E, Berebber-Bertrand I, Wisnewsky C, Pulvenis D (1993) Mapping of a novel gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 11. *Nat Genet* 4:311-313
- Carrier L, Bonne G, Bahrend E, Yu B, Richard P, Niel F, Hainque B, Cruaud C, Gary F, Labeit S, Bouhour JB, Dubourg O, Desnos M, Hagege AA, Trent RJ, Komajda M, Fiszman M, Schwartz K (1997) Organization and sequence of human cardiac myosin binding protein C gene (MYBPC3) and identification of mutations predicted to produce truncated proteins in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 80:427-434
- Carrier L, Bonne G, Schwartz K (1998) Cardiac myosin-binding protein C and hypertrophic cardiomyopathy. *Trends Cardiovasc Med* 8:151-157
- Charron P, Dubourg O, Desnos M, Bennaceur M, Carrier L, Camproux AC (1998) Clinical features and prognostic implications of familial hypertrophic cardiomyopathy related to cardiac myosin binding protein C gene. *Circulation* 97:2230-2236

- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159
- Codd MB, Sugrue DD, Gersh BJ, Melton III LJ (1989) Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study on Olmsted County, Minnesota, 1975-84. *Circulation* 80:564-572
- Davia K, Hajjar RJ, Terracciano CMN, Singh Kent N, Ranu HK, O'Gara P, Rosenzweig A, Harding SE (1999) Functional alterations in adult rat myocytes after overexpression of phospholamban with use of adenovirus. *Physiol Genomics* 1:41-50
- Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, Scholz H, Wattchow J, Weil J, Zimmermann W, Dohmen HH, Schafer H, Bishopric N, Wakatsuki T, Elson EL (1997) Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *FASEB J* 11:683-694
- Evans W (1949) Familial cardiomegaly. *Br Heart J* 11:68-82
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease leads fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132:6-13
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:7413-7417
- Flavigny J, Souchet M, Sébillon P, Berrebi-Bertrand I, Hainque B, Mallet A, Bril A, Schwartz K, Carrier L (1999) COOH-terminal truncated cardiac myosin-binding protein C mutants resulting from familial hypertrophic cardiomyopathy mutations exhibit altered expression and/or incorporation in fetal rat cardiomyocytes. *J Mol Biol* 294:443-456
- Gautel M, Zuffardi O, Freiburg A, Labeit S (1995) Phosphorylation switches specific for the cardiac isoform of myosin binding protein-C: a modulator of cardiac contraction? *EMBO J* 14:1952-1960

- Gilbert R, Kelly MG, Mikawa T, Fischman DA (1996) The carboxyl terminus of myosin binding protein C (MyBP-C, C-protein) specifies incorporation into the A-band of striated muscle. *J Cell Sci* 109:101-111
- Gilbert R, Cohen JA, Pardo S, Basu A, Fischman DA (1999) Identification of the A-band localization domain of myosin binding proteins C and H (MyBP-C, MyBP-H) in skeletal muscle. *J Cell Sci* 112:69-79
- Gleichmann U, Seggewiß H (1998) Klinik und Therapie der hypertrophen Kardiomyopathie. *Med Klin* 93:260-267
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59-74
- Gruen M, Gautel M (1999) Mutations in beta-myosin S2 that cause familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC) abolish the interaction with the regulatory domain of myosin-binding protein-C. *J Mol Biol* 286:933-949
- Gruen M, Prinz H, Gautel M (1999) cAPK-phosphorylation controls the interaction of the regulatory domain of cardiac myosin binding protein C with myosin-S2 in an on-off fashion. *FEBS Lett* 453:254-259
- Harsdorf R von, Dietz R (1998) Aspekte der somatischen Gentherapie in der Herz- und Kreislaufmedizin. *Handbuch der molekularen Medizin, Band 3 (Herz-Kreislaufkrankungen)*, Ganten D, Ruckepaul K (Hrsg), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2509-2514
- Hollmann RA, Goodwin JF, Renwick JW (1959) A family with obstructive cardiomyopathy. *Lancet* 449-456

-
- Korte FS, McDonald KS, Harris SP, Moss RL (2003) Loaded shortening, power output, and rate of force redevelopment are increased with knockout of cardiac myosin binding protein-C. *Circ Res* 93:752–758
- Kulikovskaya I, McClellan G, Flavigny J, Carrier L, Winegrad S (2003) Effect of MyBP-C binding to actin on contractility in heart muscle. *J Gen Physiol* 122:761-774
- Kunst G, Kress KR, Gruen M, Uttenweiler D, Gautel M, Fink RH (2000) Myosin binding protein C, a phosphorylation-dependent force regulator in muscle that controls the attachment of myosin heads by its interaction with myosin S2. *Circ Res* 86:51-58
- Li K, Welikson RE, Vikstrom KL, Leinwand LA (1997) Direct gene transfer into the mouse heart. *J Mol Cell Cardiol* 29:1499-1504
- Lim MS, Walsh MP (1986) Phosphorylation of skeletal and cardiac muscle C-proteins by the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Arch Biochem Cell Biol* 64:622–630
- Marian AJ, Roberts R (2001) The molecular genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 33:655-670
- Maron BJ, Roberts WC, McAllister HA, Rosing DR, Epstein SE (1980) Sudden death in young athletes. *Circulation* 62:218-229
- Maron BJ, Nichols PF, Pickle LW, Wesley YE, Mulvihill JJ (1984) Patterns of inheritance in hypertrophic cardiomyopathy: assessment by M-Mode and two-dimensional echocardiography. *Am J Cardiol* 53:1087-1094
- Maron BJ, Bonow RO, Cannon III RO, Leon MB, Epstein SE (1987) Hypertrophic cardiomyopathy. Interrelations of clinical manifestation, pathophysiology, and therapy, Part I. *New Engl J Med* 316:780-789

- Maron BJ, Bonow RO, Cannon III RO, Leon MB, Epstein SE (1987) Hypertrophic cardiomyopathy. Interrelations of clinical manifestation, pathophysiology, and therapy, Part II. *New Engl J Med* 316:844-852
- Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE (1995) Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. *Circulation* 92:785-789
- Meiners S, Laule M, Rother W, Guenther C, Prauka I, Muschick P, Baumann G, Kloetzel PM, Stangl K (2002) Ubiquitin-proteasome pathway as a new target for the prevention of restenosis. *Circulation* 105:483-489
- Moolman JA, Reith S, Uhl K, Bailey S, Gautel M, Jeschke B (2000) A newly created splice donor site in exon 25 of the MyBP-C gene is responsible for inherited hypertrophic cardiomyopathy with incomplete disease penetrance. *Circulation* 101:1396-1402
- Niimura H, Bachinski LL, Sangwatanaroj S, Watkins H, Chudley AE, McKenna W, Kristinsson A, Roberts R, Sole M, Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE (1998) Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 338:1248-1257
- O'Donnell JM, Sumbilla CM, Ma H, Farrance IKG, Cavagna M, Klein MG, Inesi G (2001) Tight control of exogenous SERCA expression is required to obtain acceleration of calcium transients with minimal cytotoxic effects in cardiac myocytes. *Circ Res* 88:415-421
- Offer G, Moos C, Starr R (1973) A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal myofibrils: extraction, purification and characterization. *J Mol Biol* 74:653-676
- Okada K, Wangpoengtrakul C, Osawa T, Toyokuni S, Tanaka K, Uchida K (1999) 4-Hydroxy-2-nonenal-mediated impairment of intracellular proteolysis during oxidative stress. Identification of proteasomes as target molecules. *J Biol Chem* 274:23787-23793

- Patel R, Nagueh SF, Tsybouleva N, Abdellatif M, Lutucuta S, Kopelen HA, Quinones MA, Zoghbi WA, Entman ML, Roberts R, Marian AJ (2001) Simvastatin induces regression of cardiac hypertrophy and fibrosis and improves cardiac function in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 104:317-324
- Redwood CS, Moolman-Smook JC, Watkins H (1999) Properties of mutant contractile proteins that cause hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 44:20–36
- Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, Benaiche A, Isnard R, Dubourg O, Burban M, Gueffet JP, Millaire A, Desnos M, Schwartz K, Hainque B, Komajda M (2003) Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* 107:2227–2232
- Richardson P, McKenna W, Baristow M (1996) Report of the 1995 World Health Organization / International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation* 93:841-842
- Rottbauer W, Gautel M, Zehelein J, Labeit S, Franz WM, Fischer C, Vollrath B, Mall G, Dietz R, Kubler W, Katus HA (1997) Novel splice donor site mutation in the cardiac myosin-binding protein-C gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. Characterization of cardiac transcript and protein. *J Clin Invest* 100:475-482
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning – a laboratory manual* (2. Auflage). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 408-410
- Sarikas A, Carrier L, Schenke C, Doll D, Flavigny J, Lindenberg KS, Eschenhagen T, Zolk O (2005) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by truncated cardiac myosin binding protein C mutants. *Cardiovasc Res* 66:33-44
- Schlender KK, Bean LJ (1990) Phosphorylation of chicken cardiac C-protein by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 266:2811–2817

- Schmidt U, del Monte F, Miyamoto MI, Matsui T, Gwathmey JK, Rosenzweig A, Hajjar RJ (2000) Restoration of diastolic function in senescent rat hearts through adenoviral gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Circulation* 101:790-796
- Shah AS, Lilly RE, Kypson AP, Tai O, Hata JA, Pippen A, Silvestry SC, Lefkowitz RJ, Glower DD, Koch WJ (2000) Intracoronary adenovirus-mediated delivery and overexpression of the β 2-adrenergic receptor in the heart. *Circulation* 101:408-414
- Squire JM, Luther PK, Knupp C (2003) Structural evidence for the interaction of C-protein (MyBP-C) with actin and sequence identification of a possible actin-binding domain. *J Mol Biol* 331:713-724
- Thierfelder L, Watkins H, MacRae C (1994) α -Tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell* 77:701-712
- Vosberg HP (1998) Die genetischen Ursachen der hypertrophischen Kardiomyopathie. *Med Klin* 93:252-259
- Watkins H, Thiersfelder L, Hwang DS, McKenna W, Seidman JG, Seidman C (1992) Sporadic hypertrophic cardiomyopathy due to de novo myosin mutations. *J Clin Invest* 90:1666-1671
- Watkins H, Conner D, Thierfelder L, Jarcho JA, MacRae C, McKenna WJ, Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE (1995) Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 11:434-437
- Webster KA, Discher DJ, Bishopric NH (1993) Induction and nuclear accumulation of fos and jun proto-oncogenes in hypoxic cardiac myocytes. *J Biol Chem* 268:16852-16858
- Weisberg A, Winegrad S (1996) Alteration of myosin cross bridges by phosphorylation of myosin-binding protein C in cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8999-9003

- Yang Q, Sanbe A, Osinska H, Hewett TE, Klevitsky R, Robbins J (1998) A mouse model of myosin binding protein C human familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 102:1292-1300
- Yang Q, Sanbe A, Osinska H, Hewett TE, Klevitsky R, Robbins J (1999) In vivo modeling of myosin binding protein C familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 85:841-847
- Yang Q, Hewett TE, Klevitsky R, Sanbe A, Wang X, Robbins J (2001) PKA-dependent phosphorylation of cardiac myosin binding protein C in transgenic mice. *Cardiovasc Res* 51:80-88
- Zimmermann WH, Fink C, Kralisch D, Remmers U, Weil J, Eschenhagen T (2000) Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. *Biotechnol Bioeng* 68:106-114
- Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P, Didié M, Münzel F, Heubach JF, Kostin S, Neuhuber WL, Eschenhagen T (2002) Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res* 90:223-230

7 Abkürzungsverzeichnis

Für SI-Einheiten wurden die international gültigen Abkürzungen verwendet.

α [³² P]-dCTP	Desoxycytidin-5'-[α - ³² P]-triphosphat
β -MHC	Schwere Myosinkette, β -Isoform
μ Ci	Mikro-Curie
2-D	Zweidimensional
3-D	Dreidimensional
³² P	radioaktives Isotop des Phosphor
Abb.	Abbildung
Ad.EGFP	EGFP kodierendes Adenovirus
Ad.M6t	M6t-MyBP-C kodierendes Adenovirus
Ad.M7t	M7t- MyBP-C kodierendes Adenovirus
Ad.WT	Wildtyp-MyBP-C kodierendes Adenovirus
BrdU	5'-Bromo-2'-desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	Zyklisches Adenosin-3'-5'-Monophosphat
CBFHH	calcium- und bicarbonatfreier Hanks Puffer mit HEPES
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
CMV	Cytomegalovirus
cMyBP-C	kardiale Isoform des Myosin-Bindungsprotein-C
C-Protein	Myosin-Bindungsprotein-C
CsCl	Caesiumchlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

EBSS	Earle's based salt solution
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EHT	engineered heart tissue, rekonstituiertes Herzgewebe
FKS	fetales Kälberserum
fn	Fibronektin
g (bei der Zentrifugation)	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
HCM	<i>hypertrophic cardiomyopathy</i> ; hypertrophe (=hypertrophische) Kardiomyopathie
HEK-Zellen	<i>Human Embryonic Kidney</i> – Zellen
HEPES	(2-Hydroxyethyl)piperazin-N-(2-ethansulfonsäure)
IgG	Immunglobulin G
ISO	Isoprenalin
KM	Kardiomyozyt
KWK	Konzentrations-Wirkungs-Kurve
MG	Molekulargewicht
MG132	Carbobenzoxyl-Leucinyll-Leucinyll-Leucinal
MLC-2v	ventrikuläre Myosin-Leichtkette Typ 2
mN	milli-Newton
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
MyBP-C	Myosin-Bindungsprotein-C
n	Anzahl der Proben
NKM	Nicht-Kardiomyozyt

NNRKM	neonatale Rattenkardiomyozyten
ns.	nicht signifikant
OD	optische Dichte
P/S	Penicillin und Streptomycin
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PKA	Protein Kinase A
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SS-DNA	Lachssperma- Desoxyribonukleinsäure
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	TBS mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TWEEN	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	Ultraviolett
vs.	versus
VS	<i>Virus Storage Buffer</i>
WT	Wildtyp
∅	Durchmesser
Δ	Veränderung

8 Verzeichnis der Veröffentlichungen

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde bereits wie folgt publiziert:

Sarikas A, Carrier L, Schenke C, Doll D, Flavigny J, Lindenberg KS, Eschenhagen T, Zolk O (2005) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by truncated cardiac myosin binding protein C mutants. *Cardiovasc Res* 66:33-44

Zolk O, Schenke C, Sarikas A (2006) The ubiquitin-proteasome system: Focus on the heart. *Cardiovasc Res* 70:410-21

9 Anhang

9.1 Substanzen

Soweit nicht bereits im Text angegeben sind für die Erstellung dieser Arbeit die nachfolgend aufgeführten Substanzen verwendet worden. Alle Chemikalien wurden mit dem höchsten im Handel erhältlichen Reinheitsgrad bezogen.

- (±)-Isoprenalin-HCl, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
- [2-Hydroxyethyl]piperazin-N-[2-ethansulfonsäure] (HEPES), Applichem, Darmstadt, Deutschland
- 10 x Dulbeccos Minimal Essential Medium (DMEM) Pulver, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- 2,3-Butandion Monoxim (BDM), Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
- ³²P-dCTP (3000 µCi/mmol), Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
- 3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), Fluka, Steinheim, Deutschland
- 5'-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU), Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
- Acrylamid 4K Lösung 30%, Applichem, Darmstadt, Deutschland

-
- Agarose (peqGold Universal), peqLab, Erlangen, Deutschland
 - Ammoniumpersulfat (APS), Bio-Rad, München, Deutschland
 - Aprotinin, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
 - Aqua ad iniectabilia, Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
 - beta-Mercaptoethanol, Merck, Darmstadt, Deutschland
 - Bradford-Reagenz, Bio-Rad, München, Deutschland
 - Bromphenolblau, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
 - Caesiumchlorid (CsCl), Merck, Darmstadt, Deutschland
 - Calciumchlorid (CaCl₂), Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
 - Carbacholhydrochlorid, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
 - Carbogengas (95% O₂, 5% CO₂), Linde AG, Höllriegelskreuth, Deutschland
 - Chloroform, Merck, Darmstadt, Deutschland
 - Diethylpyrocarbonat (DEPC), Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
 - Dimethylsulfoxid (DMSO), Merck, Darmstadt, Deutschland
 - DL-Dithiothreitol (DTT), Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
 - DNA-Längenstandard, Roche, Mannheim, Deutschland
 - DNase II Typ V, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
 - Dulbeccos Minimal Essential Medium (DMEM), Biochrom, Berlin, Deutschland
 - Dulbeccos Minimal Essential Medium (DMEM), Biochrom, Berlin, Deutschland
 - Earle's based salt solution (EBSS), Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
 - Essigsäure (C₂H₄O₂), Roth, Karlsruhe, Deutschland
 - Ethanol (C₂H₆O), Roth, Karlsruhe, Deutschland
 - Ethanol vergällt, Roth, Karlsruhe, Deutschland
 - Ethidiumbromid, Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz
 - Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Merck, Darmstadt, Deutschland
 - Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (Na₂EDTA; Titriplex[®] III), Merck,

Darmstadt, Deutschland

- fetales Kälberserum (FKS), Biochrom, Berlin, Deutschland
- fetales Kälberserum (FKS), Biochrom, Berlin, Deutschland
- Ficoll, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
- flüssiges Silikon, Dow Corning, Wiesbaden, Deutschland
- Formaldehyd-Lösung 37%, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Formamid, Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
- Glucose-Monohydrat, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Glycerol, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Glycin, Applichem, Darmstadt, Deutschland
- Glycogen, Roche, Mannheim, Deutschland
- Hydrogenchlorid (HCl), Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Isoamylalkohol, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Isopropanol, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Kaliumchlorid (KCl), Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4), Merck, Darmstadt, Deutschland
- L-(+)-Ascorbinsäure, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Lachssperma-DNA (SS-DNA), Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
- L-Glutamin, Biochrom, Berlin, Deutschland
- Lipofectamine 2000, Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
- Magermilchpulver, Töpfer, Dietmannsried, Deutschland
- Magnesiumchlorid (MgCl_2), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Magnesiumsulfat (MgSO_4), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Methanol (CH_4O), Applichem, Darmstadt, Deutschland
- Minimal Essential Medium (MEM), Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland
- Molekulargewichtsstandard Roti-Mark, Roth, Karlsruhe, Deutschland

-
- Mowiol 4-88, Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
 - N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (Temed), Merck, Darmstadt, Deutschland
 - Natriumacetat, Merck, Darmstadt, Deutschland
 - Natriumchlorid (NaCl), Roth, Karlsruhe, Deutschland
 - Natriumcitratdihydrat, Merck, Darmstadt, Deutschland
 - Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4), Merck, Darmstadt, Deutschland
 - Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3), Roth, Karlsruhe, Deutschland
 - Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4), Merck, Darmstadt, Deutschland
 - Natriumhydroxid (NaOH), Applichem, Darmstadt, Deutschland
 - N-Cbz-Leu-Leu-Leu-Al (MG132), Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
 - OptiMEM, Gibco BRL Life Technologies, Ebersberg, Deutschland
 - Penicillin G / Streptomycin, Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland
 - Penicillin G / Streptomycin, Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland
 - Pferdeserum, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
 - Phenol, Roth, Karlsruhe, Deutschland
 - Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
 - Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20), Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
 - Polyvinylpyrrolidon, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
 - Ponceau S, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
 - Proteinase K, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
 - Reaktionspuffer No.1, New England Biolabs, Frankfurt/Main, Deutschland
 - Restriktionsendonuclease Pac I, New England Biolabs, Frankfurt/Main, Deutschland
 - Rinderserumalbumin (BSA), Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
 - Sodium-dodecyl-sulfat (SDS), Merck, Darmstadt, Deutschland
 - Trichloressigsäure (TCA), Roth, Karlsruhe, Deutschland
 - Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Applichem, Darmstadt, Deutschland

- Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrogenchlorid (TrisHCl), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Triton-X 100, Fluka, Steinheim, Deutschland
- Trizol[®], Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
- Trypsin (certified crude 1:250), Difco, Detroit, USA

9.2 Hilfsmittel und Geräte

- Abstandhalter, Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Pharmakologie, Uni Erlangen, Deutschland
- Dialysekassetten Slide-A-Lyser MWCO 7 kDa, Pierce, Rockford, IL, USA
- Dialyseschläuche, Serva, Heidelberg, Deutschland
- Elektrophoresekammern/blotkammern (Mini Trans-Blot Cell), Bio-Rad, München, Deutschland
- Elektrophorese-Spannungsgeräte (Power Pac 300), Bio-Rad, München, Deutschland
- Filme (Hyperfilm ECL), Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
- Filmentwicklungsmaschine (Hyperprocessor), Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
- Glasschalen, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- GS Gene Linker, Bio Rad, München, Deutschland
- Hybridisierungsöfen, Appligene, Heidelberg, Deutschland
- Hybridisierungsröhren, Appligene, Heidelberg, Deutschland
- Kolbenhubpipetten, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Konfokalmikroskop (Axiovert 100), Zeiss, Jena, Deutschland
- Neubauer-Zählkammer, Hartenstein, Würzburg, Deutschland
- Nitrocellulosemembran (Protran[®]; 0,45 µm Porengröße), Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland
- Nylonmembran (Hybond N), Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
- Organbäder, Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Pharmakologie, UKE Hamburg, Deutschland
- Phosphorimagerplatten (GS 525 Molecular Imager System[®]), Bio Rad, München, Deutschland
- Photometer (Smart Spec 3000), Bio-Rad, München, Deutschland
- Pipetten, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

-
- Pipettierhilfen (Easypet), Eppendorf, Hamburg, Deutschland
 - Quarzglasküvetten, Hellma, Mühlheim, Deutschland
 - Reaktionsgefäße, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
 - Reinigungssäule, Stratagen, La Jolla, USA
 - Rollmischer (Assistent RM 5), Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim /Rhön, Deutschland
 - Silikondocht, Roth, Karlsruhe, Deutschland
 - Sterilfilter (0,2 µm), Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
 - Teflonscheiben, Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Pharmakologie, Uni Erlangen, Deutschland
 - Teflonzylinder, Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Pharmakologie, Uni Erlangen, Deutschland
 - Thermoblöcke (Thermomixer compact), Eppendorf, Hamburg, Deutschland
 - USF Reinstwassersystem, USF Deutschland, Ransbach-Baumbach, Deutschland
 - Vortexer (Vortex-Genie 2), Scientific Industries, Bohemia, USA
 - Wasserbäder (C20 CS), Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland
 - Zellkulturschalen, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
 - Zellkulturschränke (IG 150), Jouan, Unterhaching, Deutschland
 - Zellschaber, Sarstedt, Newton, NC, USA
 - Zellsieb Maschengröße 250 µm, Zefa Laborcenter, München, Deutschland
 - Zentrifugenröhrchen, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

9.3 Ergebnistabellen

Zu **Abb. 9:** Proteinexpression in neonatalen Rattenkardiomyozyten

	Ad.WT			Ad.M6t			Ad.M7t		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
MyBP-C	573,18	36,59	5	345,61	30,39	5	23,67	4,45	5
EGFP	1081,91	31,73	5	1032,24	67,83	5	747,56	33,48	5
MyBP-C/ EGFP	52,95	2,80	5	34,25	3,95	5	3,12	0,50	5

Zu **Abb.12:** Proteinexpression ohne/mit Zugabe von MG132

	Ad.WT -			Ad.WT +			Ad.M6t -		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
MyBP-C	550,86	47,65	3	923,94	112,82	3	316,57	37,37	3
EGFP	1054,14	48,90	3	1305,89	75,57	3	1010,57	112,41	3
MYBP-C/ EGFP	52,26	3,68	3	70,35	5,00	3	32,79	6,98	3
	Ad.M6t +			Ad.M7t -			Ad.M7t +		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
MyBP-C	773,43	87,10	3	21,36	7,04	3	519,67	25,86	3
EGFP	1179,51	45,08	3	736,04	29,80	3	891,30	57,15	3
MYBP-C/ EGFP	65,53	6,44	3	2,86	0,85	3	58,91	5,27	3

Zu Abb. 15: basale Kontraktionskraft in mN

Ad.WT			Ad.M6t			Ad.M7t		
MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0,07	0,01	15	0,06	0,01	16	0,07	0,02	10

Zu Abb. 16A: Kontraktionskraft unter Calcium in mN

	Ad.WT			Ad.M6t			Ad.M7t		
Calcium (mmol/l)	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0,2	0,07	0,01	15	0,06	0,01	16	0,07	0,02	10
0,4	0,11	0,02	15	0,10	0,02	16	0,16	0,02	10
0,8	0,15	0,02	15	0,15	0,02	16	0,25	0,04	10
1,2	0,17	0,02	15	0,19	0,03	16	0,30	0,04	10
1,6	0,19	0,02	15	0,21	0,03	16	0,31	0,05	10
2	0,19	0,02	15	0,23	0,03	16	0,33	0,05	10
2,4	0,20	0,02	15	0,25	0,03	16	0,33	0,05	10
2,8	0,20	0,02	15	0,26	0,03	16	0,34	0,05	10

Zu Abb. 16B: Änderung der Kontraktionskraft unter Calcium in mN

Calcium (mmol/l)	Ad.WT			Ad.M6t			Ad.M7t		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0,2	0,00	0,00	15	0,00	0,00	16	0,00	0,00	10
0,4	0,04	0,01	15	0,04	0,01	16	0,09	0,02	10
0,8	0,08	0,01	15	0,10	0,02	16	0,19	0,04	10
1,2	0,10	0,01	15	0,14	0,03	16	0,23	0,05	10
1,6	0,11	0,01	15	0,16	0,03	16	0,25	0,05	10
2	0,12	0,01	15	0,17	0,03	16	0,26	0,05	10
2,4	0,13	0,01	15	0,19	0,03	16	0,26	0,05	10
2,8	0,13	0,01	15	0,20	0,03	16	0,27	0,05	10

Zu Abb. 17: Änderung der Kontraktionskraft unter Calcium in Prozent des Maximums

Calcium (mmol/l)	Ad.WT			Ad.M6t			Ad.M7t		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0,2	0,00	0,00	15	0,00	0,00	16	0,00	0,00	10
0,4	33,33	6,00	15	25,81	4,94	16	35,60	5,14	10
0,8	60,47	5,28	15	50,31	6,81	16	70,50	5,46	10
1,2	76,27	3,69	15	66,25	5,66	16	85,30	3,89	10
1,6	84,40	3,38	15	76,13	4,80	16	89,00	2,98	10
2	91,93	2,24	15	80,94	5,09	16	93,20	2,47	10
2,4	95,93	1,27	15	92,63	2,62	16	93,70	2,79	10
2,8	97,53	2,47	15	99,75	0,25	16	98,80	1,20	10

Zu Abb. 18A: Kontraktionskraft unter Isoprenalin in mN

ISO (mmol/l)	Ad.WT			Ad.M6t			Ad.M7t		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0,00E+00	0,05	0,01	15	0,05	0,01	16	0,03	0,01	10
1,00E-10	0,06	0,01	15	0,06	0,01	16	0,04	0,01	10
3,00E-10	0,07	0,01	15	0,07	0,01	16	0,07	0,01	10
1,00E-09	0,08	0,02	15	0,09	0,01	16	0,11	0,02	10
3,00E-09	0,10	0,02	15	0,11	0,02	16	0,15	0,03	10
1,00E-08	0,11	0,02	15	0,12	0,02	16	0,17	0,03	10
3,00E-08	0,11	0,02	15	0,13	0,02	16	0,20	0,03	10
1,00E-07	0,12	0,02	15	0,14	0,02	16	0,20	0,03	10
3,00E-07	0,12	0,02	15	0,14	0,02	16	0,21	0,03	10
1,00E-06	0,13	0,02	15	0,15	0,02	16	0,21	0,03	10

Zu Abb. 18B: Änderung der Kontraktionskraft unter Isoprenalin in mN

ISO (mmol/l)	Ad.WT			Ad.M6t			Ad.M7t		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0,00E+00	0,00	0,00	15	0,00	0,00	16	0,00	0,00	10
1,00E-10	0,01	0,00	15	0,01	0,00	16	0,01	0,00	10
3,00E-10	0,02	0,01	15	0,02	0,00	16	0,04	0,01	10
1,00E-09	0,03	0,01	15	0,04	0,01	16	0,08	0,02	10
3,00E-09	0,04	0,01	15	0,06	0,01	16	0,12	0,03	10
1,00E-08	0,06	0,01	15	0,07	0,02	16	0,14	0,03	10
3,00E-08	0,06	0,01	15	0,08	0,02	16	0,16	0,03	10
1,00E-07	0,07	0,01	15	0,09	0,02	16	0,17	0,03	10
3,00E-07	0,07	0,01	15	0,09	0,02	16	0,18	0,03	10
1,00E-06	0,07	0,01	15	0,10	0,02	16	0,18	0,03	10

Zu Abb. 19: Änderung der Kontraktionskraft unter Isoprenalin in Prozent des Maximums

ISO (mmol/l)	Ad.WT			Ad.M6t			Ad.M7t		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0,00E+00	0,00	0,00	15	0,00	0,00	16	0,00	0,00	10
1,00E-10	11,60	3,59	15	7,75	2,64	16	5,10	1,83	10
3,00E-10	23,33	5,27	15	22,00	3,90	16	20,00	4,67	10
1,00E-09	37,40	6,44	15	34,81	4,09	16	41,40	6,24	10
3,00E-09	55,07	6,43	15	54,56	5,10	16	62,80	5,67	10
1,00E-08	73,47	6,17	15	69,31	5,28	16	76,20	5,58	10
3,00E-08	81,47	4,17	15	80,38	4,52	16	91,00	2,40	10
1,00E-07	91,13	3,42	15	85,94	4,07	16	94,20	2,61	10
3,00E-07	92,20	3,33	15	92,69	3,15	16	98,20	1,28	10
1,00E-06	97,80	2,20	15	100,00	0,00	16	100,00	0,00	10

Zu Abb. 22: Proteinexpression in EHTs

	Ad.WT			Ad.M6t			Ad.M7t		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
MyBP-C	60,46	5,97	3	40,83	5,96	3	45,64	6,93	3
EGFP	37,67	5,10	3	25,74	2,81	3	30,49	1,55	3
MyBP-C/ EGFP	1,66	0,28	3	1,59	0,16	3	1,49	0,19	3

10 Danksagung

Herrn Professor Dr. Thomas Eschenhagen gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas dieser Arbeit. Mein Dank gilt auch seiner stets hilfsbereiten und unverzüglichen Unterstützung bei der Durchführung der Experimente sowie der Erstellung der Dissertation.

Besonders herzlich möchte ich Herrn Dr. Oliver Zolk für die vorbildliche wissenschaftliche Betreuung während meiner Promotionsarbeit danken. Durch sein großes persönliches Engagement, die freundschaftliche Betreuung, die hervorragende Anleitung zum selbstständigen wissenschaftlichen Arbeiten sowie seine ständige Bereitschaft zur Diskussion war es mir möglich, die Arbeit zielgerichtet und in einem zeitlich vorhersehbaren Rahmen durchführen zu können.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Erlangen-Nürnberg, die mich immer äußerst hilfsbereit, geduldig und kompetent bei meiner Arbeit unterstützt haben. Mein Dank gilt vor allem Herrn Ingo Schubert und Herrn Sven Engman für die stets freundliche und fachkundige Hilfe bei allen labortechnischen Fragen sowie Frau Beate Endress für die hervorragende Präparation der Kardiomyozyten.

Die Experimente wurden mit finanzieller Unterstützung der Fritz Thyssen Stiftung und der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

11 LebenslaufPersönliche Daten:

Name:	Carolus Schenke
Geboren:	12. Oktober 1977 in Erlangen
Familienstand:	verheiratet, Ehefrau Daniela Schenke
Kinder:	Lea Schenke
Eltern:	Ursula und Dr. Klaus Schenke
Geschwister:	Mia, Lilli und Felix Schenke

Schulbildung:

1984 – 1988	Grundschule in Diespeck
1988 – 1997	Friedrich-Alexander-Gymnasium, Neustadt/Aisch
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

1997 – 2004	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Alexander Universität Erlangen/Nürnberg
2000	Ärztliche Vorprüfung
2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr:

erster Abschnitt	Kinderheilkunde und Jugendmedizin – Universitätsklinik Erlangen
zweiter Abschnitt	Innere Medizin – Kantonales Spital Flawil / Schweiz
dritter Abschnitt	Chirurgie – Klinikum Fürth

Beruflicher Werdegang:

seit April 2005	Assistenzarzt an der Kinder- und Jugendklinik des Universitätsklinikums Erlangen-Nürnberg
-----------------	--

12 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Carolus Schenke