

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Universität Hamburg-Eppendorf  
Direktor: Prof. Dr. med. T. Eschenhagen

Expression von ErbB-Rezeptortyrosinkinasen und Neuregulinen  
in der menschlichen Herzinsuffizienz

Dissertation

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

Bernd Ebner  
geboren in Waldshut  
Hamburg 2007

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 22.11.2007

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Thomas Eschenhagen

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. Heimo Ehmke

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: PD Dr. Jan Kähler

Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	ErbB-Rezeptorfamilie	1
1.1.1	ErbB2 als Onkogen beim Menschen	2
1.1.2	ErbB2 als Ziel einer antikörperbasierten Therapie	2
1.2	Bedeutung der ErbB/Neuregulin-Kaskade für kardiale Entwicklung und Erkrankungen	4
1.2.1	ErbB-Rezeptoren und ihre Liganden in der kardialen Embryogenese	4
1.2.2	Hypertrophie-Induktion von Herzmuskelzellen in Zellkultur	5
1.2.3	ErbB-Rezeptoren bei der Herzinsuffizienz im erwachsenen Tier	6
1.2.4	Neuregulin/ErbB-Signalkaskade und Anthrazyklin-induzierte Schäden	6
1.2.5	ErbB2 in der mitochondrial getriggerten Apoptose	7
1.2.6	Oxidativer Stress führt zu Neuregulinfreisetzung	7
1.2.7	Einfluss der Neureguline auf Kraft und ihre $\beta$ -adrenerge Stimulation	8
1.3	Molekular- und Zellbiologie der ErbB-Rezeptorfamilie	8
1.3.1	Molekularbiologie und Biochemie	8
1.3.2	EGF-Rezeptor (ErbB1-Rezeptor)	9
1.3.3	ErbB2-Rezeptor	10
1.3.4	ErbB3-Rezeptor	11
1.3.5	ErbB4-Rezeptor	11
1.3.6	Herstatin	11
1.4	Neureguline	12
1.4.1	Neuregulin-1	13
1.4.2	Spleißvarianten der Neureguline	13
1.4.3	Freisetzung von Neuregulinen aus den Vorläufermolekülen	15
1.5	Neureguline 2, 3 und 4	15
2	Arbeitshypothesen und Fragestellungen	16
3	Abkürzungsverzeichnis	17
4	Material und Methoden	19

4.1	Verwendetes Gewebe	19
4.2	RNA-Isolation	20
4.3	RT-PCR	21
4.4	PCR	21
4.5	Verwendete Sonden und <i>Primer</i>	22
4.6	Gelelektrophorese	22
4.7	DNA-Isolation aus Agarosegelen	23
4.8	Ligation	23
4.9	Transformation von E.coli	23
4.9.1	Elektroporation	23
4.9.2	Hitzetransformation	24
4.9.3	DNA-Präparation	24
4.10	Sequenzierung	25
4.10.1	Aufreinigung des Sequenzieransatzes	26
4.11	Quantitative Echtzeit PCR	26
4.11.1	Theorie der quantitativen Echtzeit PCR:	26
4.11.2	Durchführung der quantitativen Echtzeit PCR:	27
4.11.3	Optimierung	28
4.11.4	Linearitätsnachweis	28
4.12	Auswertung	29
4.13	Statistik	30
4.14	Lösungen	31
4.15	Substanzen und Geräte	31
5	Ergebnisse	33
5.1	EGF-Rezeptor	33
5.1.1	EGF-Rezeptor Fragmentlängenberechnung	34
5.2	ErbB2-Rezeptor	36
5.3	Herstatin	40

5.4	ErbB3-Rezeptor	43
5.5	ErbB4-Rezeptor	47
5.6	Neuregulin-1- $\alpha$	50
5.7	Neuregulin-1- $\beta$	53
6	Diskussion	56
6.1	Expression von ErbB-Rezeptoren und Neuregulinen im Myokard des Erwachsenen	56
6.2	Regulation von ErbB-Rezeptoren und Neuregulinen in der Herzinsuffizienz	57
6.3	Pathophysiologie	60
6.4	Klinische Bedeutung und Ausblick	61
7	Zusammenfassung	63
8	Danksagung	64
9	Lebenslauf	65
10	Eidesstattliche Versicherung:	66
11	Literaturverzeichnis	67

# 1 Einleitung

## 1.1 ErbB-Rezeptorfamilie

Wachstum, Differenzierungsprozesse und Apoptose von Zellen werden von Rezeptoren gesteuert. Diese Prozesse spielen auch im menschlichen Herzen sowohl in der Physiologie wie auch in der Pathophysiologie eine zentrale Rolle. Neben Ionenkanälen und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind Tyrosinkinasen wesentliche regulatorische Proteine, die an diesen Prozessen beteiligt sind. Zu den membranständigen Tyrosinkinasen gehören unter anderem die Mitglieder der ErbB-Familie, die - neben dem EGF-Rezeptor - ErbB2, ErbB3 und ErbB4 umfassen. Alle Mitglieder dieser Familie sind charakterisiert durch eine extrazelluläre Domäne mit zwei typischen zysteinreichen Abschnitten, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität.

Der Namensteil erbB ist ein Akronym für „avian erythroblastosis virus B oncogene“, da dieser Rezeptor erstmals in Vogelretroviren entdeckt wurde. Diese Bezeichnung wird in dieser Arbeit beibehalten. In der Literatur finden sich für erbB2 auch die alternativen Bezeichnungen neu oder HER2. Der Name HER2 steht für „humaner EGF-Rezeptor 2“, der nahe legt, dass EGF ein Ligand an ErbB2 sei, was jedoch nicht der Fall ist. Der Name neu leitet sich vom neu-Onkogen von Rattenneuroglioblastomen ab. In einem Rattentumormodell führt die Behandlung mit Ethylnitrosoharnstoff zu einer Punktmutation in der Transmembrandomäne des Rezeptors. Durch diese Punktmutation kommt es zur Daueraktivierung des Rezeptors und der Entwicklung von Neuroblastomen (Bargmann et al. 1986; Schechter et al. 1985). Es deuteten sowohl die Tatsache, daß Erythroblastoseviren das erbB-Onkogen enthalten, als auch die Aktivierung von erbB2 im Neuroblastom-Modell der Ratte auf eine mögliche Rolle bei anderen Tumoren hin. Diese Annahme konnte für einige Tumoren des Menschen bestätigt werden, so dass erbB2 heute zu den wesentlichen proto-Onkogenen des Menschen gerechnet wird.

Für die Schreibweise der ErbB-Rezeptorfamilie und ihrer Liganden der Neureguline (Nrg) gibt es im deutschsprachigen Raum noch keine einheitlichen Vorgaben. In dieser Arbeit wurde ErbB oder Nrg, wenn es sich auf das Protein bezieht oder am Satzanfang steht, groß geschrieben. Bezieht sich erbB oder nrg auf das Gen oder sein Genprodukt die RNA, so wurde es klein geschrieben.

### 1.1.1 ErbB2 als Onkogen beim Menschen

Etwa ein Viertel aller Mammakarzinome überexprimieren ErbB2, was zumeist auf einer Amplifikation des Gens beruht. Eine Überexpression von ErbB2 wird auch gehäuft in Ovarialkarzinomen gefunden. Die Prognose der Patientinnen mit einem Mammakarzinom wird neben der Anzahl der befallenen Lymphknoten, dem Grading und Hormon-Rezeptorstatus auch von der vermehrten Expression von ErbB2 bestimmt (Cooke et al. 2001; Slamon et al. 1987).

### 1.1.2 ErbB2 als Ziel einer antikörperbasierten Therapie

Da eine Überexpression von ErbB-Rezeptoren die Prognose von Mammakarzinomen verschlechtert, wurden molekular orientierte Therapien von ErbB-positiven Mammakarzinomen entwickelt. Am weitesten fortgeschritten ist die Therapie mit einem gegen ErbB2 gerichteten monoklonalen, humanisierten Antikörper (Hudziak et al. 1989; Sarup et al. 1991). Der Antikörper (Trastuzumab, Handelsname Herceptin®) ist seit wenigen Jahren für die Therapie des Mammakarzinoms zugelassen. Die Überexpression bzw. Amplifikation von ErbB2 muss vor Beginn einer Trastuzumab-Behandlung im Tumorgewebe der Patientin immunhistochemisch oder molekularbiologisch durch Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung nachgewiesen worden sein. Die Kombination von Trastuzumab mit Chemotherapie bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom führte zu einer erhöhten Ansprechrate der Tumoren sowie einer Verlängerung des progressionsfreien Intervalls bzw. einer Verlängerung der Remissionsdauer und einer Verlängerung des medianen Überlebens bei einer medianen Nachbeobachtungsdauer von 35 Monaten (Slamon et al. 2001).

Trastuzumab kann als Monotherapeutikum zur Behandlung von Patientinnen angewendet werden, die bereits eine oder mehrere Chemotherapien gegen ihre metastasierte Erkrankung erhalten haben. Zugelassen ist ebenfalls die Kombination mit Paclitaxel zur Behandlung von Patienten, die noch keine Chemotherapie erhalten haben. Umstritten ist die Rolle einer Therapie mit Herceptin in der adjuvanten Situation (Joensuu et al. 2006; Piccart-Gebhart et al. 2005; Romond et al. 2005).

Es werden verschiedene mögliche Wirkmechanismen einer Trastuzumab-Therapie diskutiert. Zum einen unmittelbare Effekte auf die Signaltransduktion, Effekte auf die subzelluläre Lokalisation der ErbB2-Moleküle oder immunologisch vermittelte Effekte durch antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (*Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity ADCC*). Natürliche Killerzellen könnten in letzterem Fall



die durch Trastuzumab markierte Zelle erkennen und eine Apoptose der Zielzellen auslösen. Die unmittelbaren Effekte auf die Signaltransduktion könnten auf einer Hemmung der Rezeptordimerisierung oder einer Herabsetzung der Ligandenbindung an den Rezeptor beruhen. Bei einem großen Teil der gegen den ErbB2-Rezeptor gerichteten Antikörper kommt es allerdings sogar zu einer kurzfristigen Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase. Die Signalkaskade wird jedoch im Zeitverlauf durch vermehrte Internalisierung der Rezeptoren gehemmt (Yuste et al. 2005).

Um das immunogene Potential des Antikörpers zu verringern, wurde der Mausantikörper „humanisiert“. Hierzu wurden die antigenerkennenden Regionen des ursprünglich aus der Maus stammenden Antikörpers in ein humanes Immunglobulin G1 (IgG1) eingefügt (Carter et al. 1992).

Unter der Anwendung von Trastuzumab als Infusionstherapie kam es zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) wie Schüttelfrost, Hypotonie, *Flush*-Symptomatik und Anaphylaxie. Diese Nebenwirkungen können durch eine Immunreaktion des Körpers auf das Fremdprotein erklärt werden. Während diese Reaktionen auf die hochdosierte Gabe eines Eiweißstoffs erwartet werden konnten, trat eine weitere unerwünschte Arzneimittelwirkung auf, mit der im Vorfeld nicht gerechnet worden war: Bei den Patientinnen mit einer Herceptintherapie kam es zu einem überzufällig häufigen Auftreten einer Herzinsuffizienz. In Tabelle 1-1 sind Häufigkeit und Schweregrad der kardialen Funktionsstörungen in Abhängigkeit von der Therapie dargestellt.

	Herceptin <sup>1</sup> allein (n=213)	Herceptin & Paclitaxel <sup>2</sup> (n=91)	Paclitaxel allein <sup>2</sup> (n=95)
Kardiale Dysfunktion	15 (7%)	10 (11%)	1 (1%)
Herzinsuffizienz Klasse III-IV	11 (5%)	4 (4%)	1 (1%)

Tabelle 1-1: Häufigkeit kardialer Nebenwirkungen aus einer offenen Phase II Studie<sup>1</sup> (Baselga 2000), (94% der Patientinnen erhielten zuvor Anthracycline) und einer randomisierten Phase III Studie<sup>2</sup>, die Herceptin in Kombination mit Chemotherapie gegenüber Chemotherapie alleine verglich (Slamon et al. 2001). (91% der Herceptin + Paclitaxel Gruppe erhielt zuvor eine Anthracyclintherapie, 97% der Paclitaxel-Monotherapie Gruppe erhielten zuvor eine Anthracyclintherapie)

Die Häufigkeit kardialer Dysfunktionen war bei Patienten mit einer Herceptin-Therapie (Monotherapie oder Kombination mit Paclitaxel) höher als bei alleiniger Gabe von Paclitaxel ( $p=0,02$ ). Die Häufigkeit von Herzinsuffizienzzeichen der Klasse III-IV war bei der Kombinationstherapie gegenüber der Monotherapie 4-5-fach erhöht.

Tabelle 1-2 stellt die kardialen Nebenwirkungen einer Dreierkombination von Herceptin, Anthracyclinen und Cyclophosphamid einer Zweierkombination aus Anthracyclinen und Cyclophosphamid gegenüber. In der Dreierkombination mit Herceptin zeigte sich ein hochsignifikant häufigeres Auftreten einer Herzinsuffizienz (Slamon et al. 2001).

	Herceptin + Anthracyclin + Cyclophosphamid n=143	Anthracyclin + Cyclophosphamid n=135	p-Wert
Kardiale Dysfunktion	40 (28%)	9 (7%)	<0,001
Herzinsuffizienz Klasse III-IV	27 (19%)	4 (3%)	<0,001

Tabelle 1-2: Dargestellt ist die Häufigkeit kardialer Nebenwirkungen aus einer randomisierten Phase III Studie, die Herceptin in Kombination mit Chemotherapie gegenüber Chemotherapie alleine verglich (Slamon et al. 2001).

Diese Daten legen nahe, dass der ErbB2-Rezeptor im Myokard des erwachsenen Menschen exprimiert wird, und dass eine Modulation des ErbB2-Signalwegs eine Schädigung des Myokards und/oder eine Sensibilisierung für kardiotoxische Noxen bewirken kann. Zu Beginn dieser Arbeit war das Vorhandensein von Rezeptoren der ErbB-Klasse oder ihrer Liganden (der Neureguline) im humanen Myokard noch nicht nachgewiesen.

## 1.2 Bedeutung der ErbB/Neuregulin-Kaskade für kardiale Entwicklung und Erkrankungen

### 1.2.1 ErbB-Rezeptoren und ihre Liganden in der kardialen Embryogenese

Hinweise für eine Relevanz der Neuregulin/ErbB-Kaskade in der kardialen Signaltransduktion erhielt man bereits 1995 durch tierexperimentelle Studien. In *Knock-out* Versuchen an Mäusen zeigte sich, dass das Fehlen der ErbB-Rezeptor-Signalkaskade bereits intrauterin zum Tode führt. Als Ursache wurde ein Ausbleiben der Trabekularisierung der Ventrikel oder andere kardiale Fehlbildungen

beobachtet. Dies konnte für *nrg1*<sup>-/-</sup> Mäuse (Meyer et al. 1995) und im selben Jahr auch für *erbB2*<sup>-/-</sup> (Lee et al. 1995) und *erbB4*<sup>-/-</sup>-Mäuse (Gassmann et al. 1995) nachgewiesen werden.

In allen drei Fällen kam es zum Absterben der Embryonen am Tag E 10.5. Heterozygote Tiere waren phänotypisch normal und fertil, wohingegen das Vorliegen eines homozygoten *Knock-outs* für Neuregulin-1, ErbB2-Rezeptor und ErbB4-Rezeptor den gleichen kardialen Phänotyp erzeugten. Ein kardialer *Rescue* des *erbB2*-*Knock-out* Phänotyps durch MHC-Promotor-gesteuerte Expression von ErbB2 führte zu einer Austragbarkeit der Schwangerschaft. Allerdings verstarben die Mäuse in der Postpartalperiode an den schweren Fehlentwicklungen der Muskulatur und des Nervensystems (Morris et al. 1999).

In Versuchen mit homozygoten Nullmutationen für den ErbB3-Rezeptor zeigten sich Veränderungen in Derivaten des Endokardkissens. Vor allem die Herzklappen waren von den Veränderungen betroffen, was zum Tod am Tag E 13.5 vermutlich aufgrund unzureichender Blutzirkulation führte (Erickson et al. 1997).

Aus diesen Experimenten folgt, dass die Neuregulin/ErbB Kaskade bei Mäusen für die embryonale Entwicklung des Herzens zwingend notwendig ist. Trotz der ausgeprägten Homologie der Rezeptoren besteht offensichtlich keine funktionelle Redundanz: die Deletion jedes Rezeptorgens führt zum intrauterinen Tod der Versuchstiere.

Nullmutationen des heparinbindenden EGF-ähnlichen Wachstumsfaktors (HB-EGF) führen zu einer schweren Herzinsuffizienz mit stark dilatierten Ventrikeln. HB-EGF bindet und aktiviert den EGF- und den ErbB4-Rezeptor (Iwamoto et al. 2003). Da der EGF-Rezeptor mit ErbB2 und ErbB4 heterodimerisieren kann, kommt es bei der HB-EGF-null Maus zu einer signifikant geringeren Phosphorylierung von ErbB2 und ErbB4.

### 1.2.2 Hypertrophie-Induktion von Herzmuskelzellen in Zellkultur

Die ErbB/Neuregulin-Kaskade aktiviert mehrere Signalwege in Herzmuskelzellen neugeborener Ratten. Behandlung von Kardiomyozyten neugeborener Ratten mit einer löslichen Nrg-1 Isoform (*glial growth factor 2*) führt zu vermehrter Expression von ANF, sarkomerischem F-Aktin und zu einer vermehrten Proteinsynthese (Zhao et al. 1998). Nrg-1 aktiviert dabei die p42/p44 MAPKinase, die ribosomale 70kD S6-Kinase und die ribosomale 90kD S6-Kinase (Baliga et al. 1999).

### 1.2.3 ErbB-Rezeptoren bei der Herzinsuffizienz im erwachsenen Tier

Ob die Neureguline und ihre Rezeptoren auch im Herz erwachsener Tiere vorhanden sind und eine Rolle spielen, war lange Zeit nicht bekannt.

Die Rolle der ErbB-Rezeptoren für die Herzinsuffizienz in erwachsenen Ratten wurde zuerst von Rohrbach et al. (1999) untersucht. Künstliche Verengung der Aorta 3-4 Wochen alter Tiere durch *aortic banding* führt nach 22 Wochen zu klinischen Zeichen einer Herzinsuffizienz. Die erbB2- und erbB4-mRNA und Proteinexpression wurde nach 6 Wochen (im Kompensationsstadium der Herzinsuffizienz) und nach 22 Wochen (im Insuffizienzstadium) gemessen. Die mRNA und Proteine der Rezeptoren waren im Myokard nach 22 Wochen um 50% reduziert (Rohrbach et al. 1999).

Versuche an Mäusen, mit einem myokardspezifischen, konditionellen *Knock-out* des erbB2 Gens, weisen ebenfalls auf eine wichtige Rolle des ErbB2-Rezeptors in adulten Tieren hin. Mit zunehmendem Lebensalter führte die MLC2v-Promotor-vermittelte Expression des Rekombinationsenzym CRE zu einer Deletion von Abschnitten des erbB2-Gens. Bereits nach 1 - 6 Wochen war in etwa 50% der Kardiomyozyten kein funktionsfähiges erbB2-Gen mehr vorhanden. Zwei Monate postpartal kam es zu Zeichen einer Herzinsuffizienz mit Entwicklung einer Hypertrophie und dilatativen Kardiomyopathie. Die Tiere mit konditionellen *Knock-out* zeigten eine Übersterblichkeit (Ozcelik et al. 2002).

### 1.2.4 Neuregulin/ErbB-Signalkaskade und Anthrazyklin-induzierte Schäden

An isolierten neonatalen Rattenherzzellen konnte die Hemmung einer Daunorubicin-induzierten Apoptose über den Nrg1 $\beta$ /ErbB4 Signalweg nachgewiesen werden. Die Behandlung mit Nrg1 $\beta$  führte zu einer PI3K-vermittelten Aktivierung von Akt/Proteinkinase B. In der Kontrollgruppe ohne Nrg1 $\beta$  kam es zu verstärkter Apoptose, die durch eine Aktivierung von Caspase 3 und TUNEL-Färbung nachgewiesen wurde (Fukazawa et al. 2003).

In-vitro Experimente an isolierten Kardiomyozyten aus dem Herzen erwachsener Ratten ergaben eine dosisabhängige Schädigung der Myofibrillenstruktur durch Doxorubicin. Eine simultane Behandlung mit Nrg1 $\beta$  führte zu einer verringerten Anzahl von Herzmuskelzellen, die myofibrilläre Schäden zeigten. Es wurde hierbei eine Aktivierung von Erk 1/2 und Akt beobachtet. Ein gegen ErbB2 gerichteter Antikörper in Verbindung mit Doxorubicin steigerte die Anzahl an Zellen mit myofibrillären Veränderungen. Nrg1 $\beta$  und anti-ErbB2 allein hatten keinen Effekt auf

die Myofibrillenstruktur der Herzmuskelzellen. In diesen Untersuchungen kam es zu keiner nennenswerten Induktion von Apoptose in der TUNEL-Färbung (Sawyer et al. 2002).

Diese Ergebnisse weisen auf eine Rolle von Nrg1 $\beta$  und ErbB2 bei der Reaktion auf exogene Noxen hin. Sie deuten auch auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Kardiomyopathien unter Trastuzumab und begleitender Anthracyclingabe.

#### 1.2.5 ErbB2 in der mitochondrial getriggerten Apoptose

Apoptotische Regulatorproteine wie bcl (nach seiner Entdeckung in B-Zell-Lymphomen benannt) steuern die mitochondriale Apoptose. Bcl-xS oder BAX sind proapoptotische Regulatorproteine, wohingegen Bcl-xL antiapoptotische Signale vermittelt. Die Hemmung der erbB2-Kaskade in Zellkultur von Rattenkardiomyozyten durch einen spezifischen Antikörper führt zu einer vermehrten Expression von Bcl-xS und einer verminderten Expression von Bcl-xL. Es kam weiterhin zu einer zeitabhängigen mitochondrialen Translokation und Oligomerisierung von BAX „Bcl-associated protein“, was mit einer Freisetzung von Cytochrom c und einer Aktivierung von Caspasen assoziiert war. Diese Veränderungen führen neben einer Apoptose zu einer mitochondrialen Dysfunktion, einem Abfall des Membranpotentials und einem verminderten ATP-Spiegel. Durch Zufuhr von Bcl-xL konnten diese Veränderungen verhindert werden (Grazette et al. 2004).

#### 1.2.6 Oxidativer Stress führt zu Neuregulinfreisetzung

Es gibt Hinweise, dass aus dem Herzen erwachsener Ratten gewonnene Zellen auf oxidativen Stress mit einer erhöhten Neuregulinfreisetzung und einer Aktivierung der Nrg1 $\beta$ /ErbB4 Signalkaskade reagieren. Eine Hemmung dieses Signalwegs durch einen Antikörper gegen Nrg1 $\beta$  führte unter oxidativem Stress mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einer vermehrten Apoptose in Kultur. Eine verminderte Aktivierung des Nrg1 $\beta$ /ErbB4 vermittelten PI3K/Akt Signalwegs wurde dabei als physiologischer Transduktionsweg angenommen. In isolierten perfundierten Mausherzen konnte nach Ischämie und nachfolgender Reperfusion eine vermehrte Freisetzung von Nrg1 $\beta$  ins Eluat und eine vermehrte ErbB4-Phosphorylierung unter Ischämiebedingungen gemessen werden (Kuramochi et al. 2004). Hieraus kann eine Rolle dieser Signaltransduktionskaskade in der Reaktion auf oxidativen Stress abgeleitet werden.

### 1.2.7 Einfluss der Neureguline auf Kraft und ihre $\beta$ -adrenerge Stimulation

Kraftmessungen an Papillarmuskeln von Kaninchen zeigten nach Gabe von Nrg1 $\alpha$  und Nrg1 $\beta$  eine verminderte kontraktile Reaktion auf Stimulation durch Isoprenalin. In diesen Messungen am Papillarmuskel führte bereits die alleinige Gabe von Neuregulin-1 zu einer verminderten Kontraktilität. Nrg1 $\beta$  führte über eine Aktivierung der Serin/Threoninkinase Akt zu einer verstärkten NO-Produktion durch Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (Lemmens et al. 2004).

Versuche an Mäusen, die eine heterozygote Deletion des Neuregulin-1-Gens hatten (nrg1 +/-), zeigten eine verminderte parasymphomimetische Gegenregulation auf  $\beta$ -adrenerge Stimuli (Okoshi et al. 2004).

Während zahlreiche physiologische und pathophysiologische Funktionen der ErbB-RTK sich erst in den letzten Jahren abzuzeichnen beginnen, liegen schon seit vielen Jahren detaillierte Untersuchungen zu Biochemie und Molekularbiologie sowohl der Rezeptoren als auch der Liganden vor.

## 1.3 Molekular- und Zellbiologie der ErbB-Rezeptorfamilie

### 1.3.1 Molekularbiologie und Biochemie

Die Rezeptoren der ErbB-Familie sind Tyrosinkinasen, die intrazellulär die Funktion von Proteinen durch Phosphorylierung modulieren. Durch Ligandenbindung kommt es zu einer Konformationsänderung, welche mit einer Dimerisierung (Schlessinger et al. 1992; Yarden et al. 1987) und der Aktivierung der Phosphotyrosinkinasedomäne einhergeht. Diese Aktivierung führt zu Autophosphorylierung und zur Phosphorylierung der intrazellulären Effektoren.

Alle Mitglieder der ErbB-Rezeptor Familie können sich gegenseitig transphosphorylieren (Carraway, III et al. 1994a; Falls et al. 1993; Quian et al. 1992). Da ErbB2 keine Liganden bindet und ErbB3 eine inaktive Kinasedomäne besitzt, können ligandeninduzierte Signale nur durch ErbB2/ErbB3 Heterodimere (Carraway, III et al. 1994a; Sliwkowski et al. 1994), ErbB3/ErbB4 Heterodimere (Tzahar et al. 1994), ErbB2/ErbB4 Heterodimere und ErbB4/ErbB4 Homodimere entstehen. ErbB2/ErbB2 Homodimere (Plowman et al. 1993b) oder ErbB3/ErbB3 Homodimere sind nicht fähig, ligandeninduzierte Signale zu übertragen (Beerli et al. 1995; Horan et al. 1995; Riese et al. 1995). Eine weitere Spezifizierung wird durch die Affinität unterschiedlicher Liganden an die verschiedenen Rezeptordimere

erreicht (Pinkas-Kramarski et al. 1998). In Abbildung 1-1 sind die Bindungsaffinitäten für Nrg1 $\beta$  dargestellt.

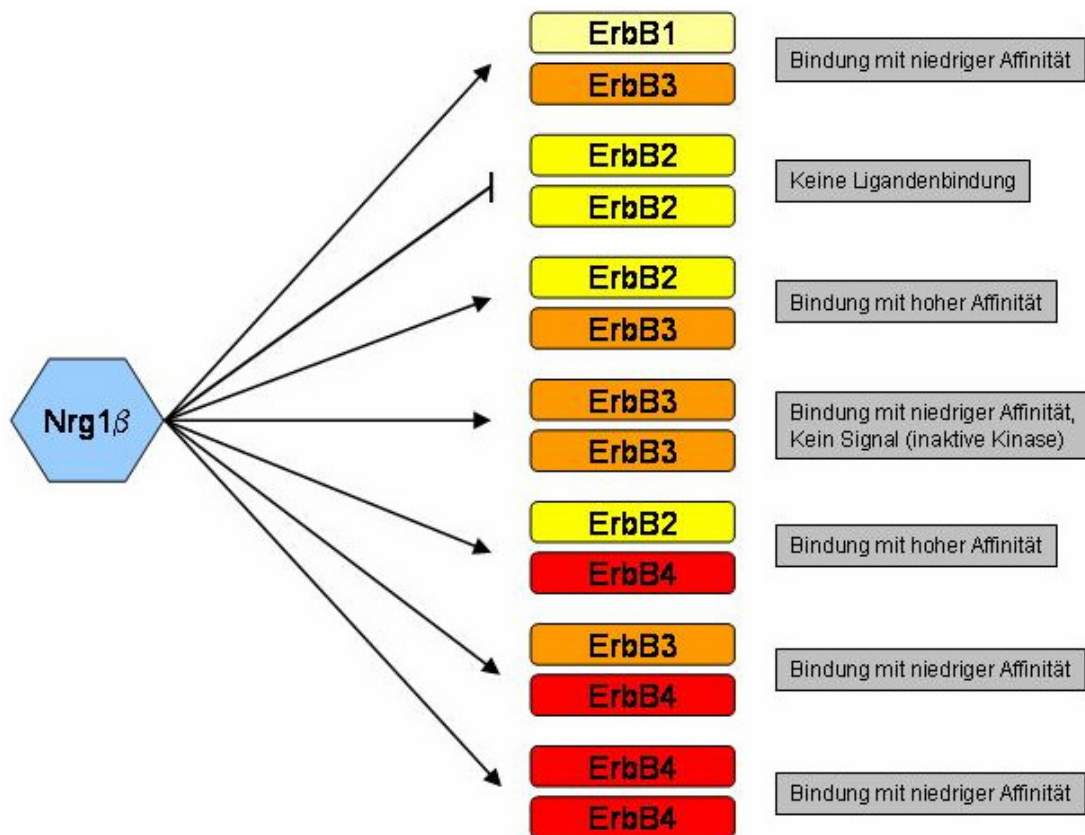


Abbildung 1-1: Bindungsaffinitäten und Signalaktivierung der Neuregulin-1- $\beta$  Isoformen. Im Vergleich dazu kann Nrg1 $\alpha$  nicht an das EGF-R/ErbB3-Dimer binden und bindet an ErbB2/ErbB4 nur mit niedriger Affinität (Pinkas-Kramarski et al. 1998)

### 1.3.2 EGF-Rezeptor (ErbB1-Rezeptor)

Das Gen für den EGF-Rezeptor liegt auf Chromosom 7p12.3-p12.1. Es umfasst 26 Exons und die mRNA hat eine Länge von 5512 bp. Das Protein besteht aus 1210 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 130 kDa. Es sind bis heute zehn Liganden für diesen Rezeptor bekannt. Die bekanntesten sind EGF, heparinbindender EGF (HB-EGF) und TGF $\beta$  (Riese et al. 1996b). Der EGF-Rezeptor bildet sowohl aktive Homodimere als auch Heterodimere mit anderen ErbB-Rezeptoren. Das Signalnetzwerk in der Neuregulin-ErbB-Kaskade enthält durch die Vielzahl an Liganden und die Möglichkeit zur Heterodimerisierung der Rezeptoren viele Verstärkungs- und Diversifikationsmöglichkeiten. PLC $\gamma$ , Cbl, Grb2, Shc und Shp1 binden direkt an den zytoplasmatischen Anteil des EGF-Rezeptors (Galisteo et al. 1995; Lowenstein et al. 1992; Pelicci et al. 1992; Tenev et al. 1997).

Diese Proteine interagieren über eine SH2-Domäne (engl.: *src homology 2*) oder eine phosphotyrosinbindende Domäne mit den carboxyterminalen Tyrosinresten des EGF-Rezeptors.

Bindung von EGF an den EGF-Rezeptor führt zur Umwandlung des membrangebundenen RAS (engl. *Rat sarcoma*) in seine aktive, GTP-gebundene Form. In diesem Zustand aktiviert RAS MAP-Kinasen (engl.: *mitogen-activated protein kinase*), sowie vermutlich auch PI3K und weitere Effektoren. Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) bindet über eine SH2-Domäne an die zytoplasmatische Domäne des EGF-Rezeptors. Dadurch wird die Phosphorylierung durch die Tyrosinkinase-Untereinheit ermöglicht (Anderson et al. 1990). Das am besten untersuchte PI3K-Substrat ist AKT. Diese zelluläre Ser/Thr-Kinase ist eine zentrale Proteinkinase in Proliferations-aktivierenden und Apoptose-inhibierenden Signalwegen (Wang et al. 2000).

Phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) wird durch Phosphorylierung von EGF-Rezeptor-Phosphotyrosinkinasen aktiviert. PLC- $\gamma$  bildet aus Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PIP<sub>2</sub>) Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG). IP<sub>3</sub> ist ein intrazellulärer Botenstoff, der zur Freisetzung im endoplasmatischen Retikulum (ER) gespeicherter Kalziumionen führt, wodurch kalziumabhängige Enzyme und Prozesse aktiviert werden. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC) (Wang et al. 1998). Durch die im Rahmen des EGF-Rezeptor-Signalings aktivierte ras/MAP-Kinasen-Signalkaskade sowie die PI3K-Signalkaskade kommt es zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die durch Wechselwirkungen mit DNA-Elementen in der Promotorregion von Genen deren Transkription auslösen (Chin et al. 1997). Die EGF-Rezeptor-Aktivierung fördert zusammenfassend Vorgänge der Transkription und der Translation, wodurch es zu Proliferation, Differenzierung und Wachstum kommen kann.

### 1.3.3 ErbB2-Rezeptor

Auf Chromosom 17q21.1 liegt das Gen für *erbB2*. Es enthält 27 Exons, die eine mRNA von 4530 bp Länge kodieren. Das Protein ist aus 1255 Aminosäuren zusammengesetzt und hat ein scheinbares Molekulargewicht von 185 kDa. Es sind bislang keine Liganden bekannt. Versuche an Zellen, die ausschließlich ErbB2 exprimieren, zeigten keine Aktivierung von ErbB2-Rezeptor-Homodimeren durch Neureguline oder EGF. Aktive Heterodimere entstehen mit EGF-R-, ErbB3- und ErbB4-Rezeptor (Carraway, III et al. 1994a; Carraway, III et al. 1994b; Plowman et al. 1993a; Sliwkowski et al. 1994). Die intrazellulären Signalwege werden durch



Phosphoprotein- und Protein-bindende Proteine weitergeleitet. Adapterproteine wie Grb2, Shc und Chk, die die Weiterleitung der Signaltransduktion vermitteln, binden an die Tyrosinreste des ErbB2-Rezeptors. Ralt (engl.: receptor associated late transducer), Erbin und Pick1 binden unabhängig vom Phosphorylierungszustand von ErbB2 an diesen Rezeptor (Jaulin-Bastard et al. 2001).

#### 1.3.4 ErbB3-Rezeptor

Der Genort für diesen Rezeptor liegt auf Chromosom 12q13. Die 28 Exons des ErbB3-Gens kodieren eine 4975 bp lange mRNA. Das p160 Rezeptorprotein besteht aus 1342 Aminosäuren und bindet seine Liganden - die Neureguline - mit hoher Affinität ( $K_D$  von ca. 1 nM). Der intrazelluläre C-terminale Anteil von ErbB3 besteht aus einer inaktiven Tyrosinkinasedomäne (Sliwkowski et al. 1994). Die Aminosäuresequenz dieses C-terminalen Abschnitts unterscheidet sich beträchtlich von den C-Termini von ErbB2 und ErbB4. Die intrazelluläre Domäne von ErbB3 enthält Tyrosinreste, die im Vergleich zu den anderen ErbB-Rezeptortyrosinkinasen nicht konserviert sind. Sie dienen vermutlich als Bindungsstellen für Signalproteine, die spezifisch mit ErbB3 interagieren (Carraway, III et al. 1994a). Der zytoplasmatische Anteil bindet Adapterproteinen wie Shc und Grb7. Die regulatorische Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-kinase (p85) kann mit mehreren intrazellulären Abschnitten interagieren (Olayioye2001).

#### 1.3.5 ErbB4-Rezeptor

Neureguline binden an diesen Rezeptor mit hoher Affinität und sind in der Lage, ihn zu aktivieren. In der Zellkultur konnte eine Aktivierung von ErbB4 durch Betacellulin nachgewiesen werden (Beerli et al. 1995; Riese et al. 1996a). Das erbB4-Gen befindet sich auf Chromosom 2q33.3-q34. Acht Exons kodieren für eine mRNA von 5484 bp Länge. Der ErbB4-Rezeptor bildet funktionsfähige Homo- und Heterodimere. An intrazelluläre Phosphorylierungsstellen binden die regulatorische Einheit der Phosphatidylinositol 3-kinase p85 und Shc. Das PSD-95 (engl.: *postsynaptic density protein*) und PICK1 binden unabhängig vom Phosphorylierungszustand an ErbB4.

#### 1.3.6 Herstatin

Herstatin ist ein Protein, das als physiologischer Antagonist am ErbB2-Rezeptor wirkt. Herstatin ist ein sezerniertes trunkiertes Spleißprodukt des erbB2-Gens. Es wird durch acht Exons kodiert. Die mRNA enthält im Gegensatz zur erbB2-mRNA Sequenzen des Intron 8. Die 1316 bp lange mRNA wird zu einem 68 kD Protein aus

419 Aminosäuren translatiert. Die 340 N-terminalen Aminosäuren sind mit dem ErbB2-Rezeptor identisch, die C-terminalen 79 Aminosäuren sind spezifisch für Herstatin.

Herstatin bindet mit hoher Affinität (KD 14 nM) an die extrazelluläre Domäne von ErbB2. Durch diese Bindung werden Rezeptordimere aufgelöst und die Tyrosinphosphorylierung der intrazellulären Domäne gehemmt. Ebenso konnte ein hemmender Effekt auf das Wachstum von transformierten Zellen nachgewiesen werden (Azios et al. 2001; Doherty et al. 1999). Bisher konnte dieses Protein in verschiedenen Organen darunter Leber und Nierengewebe nachgewiesen werden. Der Nachweis in Herzmuskelgewebe war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht geführt.

Auch von den anderen Mitgliedern der ErbB-Familie sind sezernierte trunkeerte Spleißvarianten bekannt. So kommt auch ErbB3 in einer sezernierten Variante vor (sErbB3). Die sezernierte Form bindet Neuregulin mit hoher Affinität und blockiert die Signalübertragung von ErbB2, ErbB3 und ErbB4 mit einer IC<sub>50</sub> von 0.5 nM (Lee et al. 2001).

#### 1.4 Neureguline

Die Neureguline sind transmembranäre und extrazelluläre Proteine mit einer großen strukturellen Vielfalt. Diese beruht auf vier Genen und ihren Spleißvarianten.

nrg1: (Peles et al. 1992)

nrg2: (Carraway, III et al. 1997)

nrg3: (Zhang et al. 1997)

nrg4: (Harari et al. 1999)

Alle Neureguline enthalten als gemeinsames Motiv, eine dem epidermalen Wachstumsfaktor EGF (epidermal growth factor) ähnliche Domäne. Es wurde gezeigt, dass diese Domäne für die Aktivierung der ErbB-Rezeptorfamilie notwendig und hinreichend ist (Holmes et al. 1992).

Während der letzten Jahre wurden viele Funktionen der Neuregulin-1-ErbB Kaskade, insbesondere in der embryonalen Entwicklung, aber auch bei postnatalen Prozessen beschrieben. Die Darstellung hier ist auf die für kardiale Erkrankungen wesentlichen Beobachtungen beschränkt.

### 1.4.1 Neuregulin-1

Das Neuregulin-1-Gen besitzt multiple alternative Spleißstellen (Marchionni et al. 1993; Wen et al. 1992). Theoretisch wären durch Kombination der beschriebenen alternativen Exone über 80 verschiedene Neuregulin-1 Transkripte möglich. Wie viele davon tatsächlich als Protein beim Menschen vorkommen, ist derzeit nicht sicher bekannt. Neuregulin-1 Isoformen binden an ErbB3 und ErbB4, nicht jedoch an ErbB2 (Alroy et al. 1997). Aufgrund seiner vielfältigen Rollen in unterschiedlichen biologischen Zusammenhängen wurden Neuregulin-1 Isoformen gleichzeitig von verschiedenen Gruppen in verschiedenen Zusammenhängen beschrieben. Daraus erklärt sich die Namensvielfalt für ein einziges Gen und seine Produkte. Bekannte Vertreter der Neuregulin-1-Familie sind in Tabelle 1-3 gelistet.

Name	Expression und Funktion	Referenz
ARIA = <i>Acetylcholine-Receptor-Inducing-Activity</i>	Nervenzellen (z.B. Motoneurone) Reifung der Skelettmuskulatur, Induktion der motorischen Endplattenstruktur	(Fischbach et al. 1997)
SMDF = <i>Sensory and Motory Neuron Derived Factor</i>	Wachstumsfaktor in sensiblen und motorischen Neuronen	(Ho et al. 1995)
GGF = <i>glial groth factor</i> : es gibt lösliche Isoformen( GGF I, II, III) und eine membrangebundene = Neurite mitogen	Mitogen für Astrozyten und Schwann-Zellen und kann Apoptose in Nervenzellen verhindern	(Morrissey et al. 1995; Salzer et al. 1980)
NDF = <i>Neu Differentiation Factor</i> , Heregulin	Mitogene, differenzierungs- induzierende und transformierende Bioaktivität auf Zellen, die den ErbB2-Rezeptor tragen	(Peles et al. 1992)
Neureguline (von neu und heregulin)	Die Proteine wurden als Produkt eines Gens erkannt und unter diesem Namen zusammengefasst	(Marchionni et al. 1993)

Tabelle 1-3: Wichtige Vertreter der Neuregulin-1-Familie und ihre Funktionen

### 1.4.2 Spleißvarianten der Neureguline

Die vielfältigen Neuregulin-Varianten kommen durch ausgeprägtes alternatives Spleißen und Verwendung alternativer Promotoren zustande. Eine Übersicht gibt Abbildung 1-2. Das Neuregulin-Gen beinhaltet 4 *Splicing hot spots* (SHS) und eine Spleißstelle in der EGF-Domäne (Lemke 1996).

N-terminal erklärt sich die Variabilität aus unterschiedlicher Verwendung des SHS1 bzw. alternativer Promotor-Verwendung im SHS2 (SMDF s. Abb 1-2). Der N-Terminus des Typ-I (Heregulin, NDF, ARIA) enthält eine Immunglobulin- (Ig-) ähnliche Domäne, der des Typs-II (GGF) eine Kringle-Domäne, Signalpeptide und dieselbe Ig-ähnliche Domäne wie Typ-I. Die Neureguline der Typen-I und -II können im Anschluß an die gemeinsame Ig-ähnliche Domäne eine Glykosylierungssequenz beinhalten. SMDF wird vorwiegend im Nervengewebe gefunden. Er enthält den Typ-III N-Terminus, einen cysteinreichen Abschnitt, der als Transmembrandomäne diskutiert wird (Schroering et al. 1998). Außerdem könnten durch diese N-terminale Membranverankerung solche Isoformen, die die juxtamembranen Spleißvarianten 3 oder 5 besitzen, membrangebunden auftreten.

Allen Neuregulin-1-Produkten gemeinsam ist eine hochkonservierte EGF-ähnliche Domäne. Die EGF-ähnliche Domäne enthält sechs Cystein-Reste, die durch die Ausbildung von drei Disulfid-Brücken zu einer Proteinstruktur mit drei Schleifen führen (Carraway, III et al. 1995). Nach dem fünften Cystein-Rest der EGF-ähnlichen-Domäne folgt eine alternative Spleißstelle. Durch diese werden  $\alpha$ - (47 Aminosäuren)- und  $\beta$ - (44 Aminosäuren)-Isoformen definiert.

Die juxtamembranäre Region stellt den SHS3 dar. Sie schließt sich direkt an die EGF-ähnliche Domäne an. Für diese Region sind fünf verschiedene Spleißvarianten beschrieben (1 bis 5). Die darauf folgende Transmembrandomäne ist bei allen beschriebenen Formen identisch.

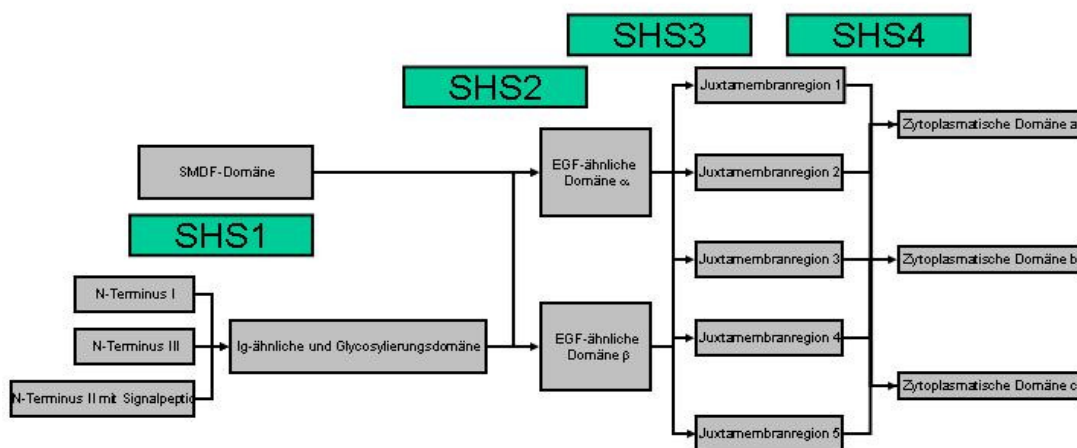


Abbildung 1-2: Darstellung der Spleißvarianten des Neuregulin-1-Gens. Vertikale Linien stellen Spleißregionen (*Splicing hot spots*, SHS) dar. Zwischen der Juxtamembranregion und den zytoplasmatischen Domänen liegt eine Transmembrandomäne, die aus Platzgründen nicht dargestellt wurde. (Modifiziert nach Holmes et al. 1992, Wen et al. 1992; Falls et al. 1993; Marchioni et al. 1993; Wen et al. 1994; Burgess et al. 1995 und Ho et al. 1995)

Für die intrazellulären Abschnitte wurden drei Varianten beschrieben, die durch den vierten SHS erzeugt werden (Liu et al. 1998a; Liu et al. 1998b). Welche Isoformen im humanen Herzen exprimiert werden, war zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht bekannt.

#### 1.4.3 Freisetzung von Neuregulinen aus den Vorläufermolekülen

Neureguline kommen in löslicher und membrangebundener Form vor. Die löslichen Formen vermitteln parakrine Signale, wohingegen die membrangebundenen Formen juxtakrin unmittelbar an der Zelloberfläche wirken. Die meisten Neureguline besitzen eine Transmembrandomäne und werden an der Zelloberfläche durch Proteolyse in den extrazellulären Raum abgegeben. Dieser Prozess kann beispielsweise durch Phorbol ester-induzierte Aktivierung der Proteinkinase C getriggert werden (Burgess et al. 1995).

Die Abgabe der löslichen Neuregulinformen wird durch den intrazellulären Anteil gesteuert. Vor der Abspaltung kommt es zu einer Dimerisierung der zytoplasmatischen Domänen (Liu et al. 1998b).

#### 1.5 Neureguline 2, 3 und 4

Das Neuregulin 2 Gen liegt auf Chromosom 5 (5q23-q33) und besteht aus 12 Exons. Neuregulin 2 kommt in 6 alternativen Spleißvarianten vor, die zum Teil löslich und zum Teil membrangebunden sind (Carraway, III et al. 1997).

Neuregulin 3 wird von einem Gen kodiert, das auf Chromosom 10q22-q23 liegt. Neuregulin 2 und 3 sind Liganden von ErbB3 und ErbB4.

Neuregulin 4 aktiviert aus der ErbB-Rezeptorfamilie ausschließlich ErbB4. Seine Expression wurde in adulten Pankreaszellen und Skelettmuskelzellen nachgewiesen (Harari et al. 1999).

## 2 Arbeitshypothesen und Fragestellungen

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression der ErbB-Rezeptoren und ihrer Liganden – der Neureguline – im adulten Herzen nachzuweisen und eine Regulation der Genprodukte auf mRNA-Ebene in herzinsuffizienten Herzen zu untersuchen.

Daten aus *Knock-out*-Versuchen der einzelnen ErbB-Rezeptoren an Mäuseembryonen zeigen die Notwendigkeit der Neuregulin/ErbB-Signalkaskade für eine normale embryologische Entwicklung des Myokards bzw. der Klappenanlage. Der homozygote *Knock-out* jedes einzelnen Rezeptorgens (EGF-R (erbB1), erbB2, erbB3 und erbB4) sowie der Neureguline führt zum intrauterinen Tod der Embryonen.

Im adulten Tier weist die Ausbildung einer Herzinsuffizienz bei Mäusen mit konditionellem myokardspezifischem erbB2 knock-out auf eine wichtige Rolle in der kardialen Signaltransduktion auch beim erwachsenen Organismus hin. Eine dauerhafte Drucküberlastung durch Aortenligatur führt beim erwachsenen Tier zu einer verminderten Expression der ErbB-Rezeptoren. In Zellkultur-Versuchen, bei denen Kardiomyozyten neugeborener Ratten mit Neuregulin-1 (Nrg1) stimuliert wurden, führten zu einer Anpassung der Zellen durch Hypertrophie und zu einem vermehrten Zellüberleben unter oxidativem Stress.

Beim Menschen zeigte sich unter der Behandlung mit einer Kombination von kardiotoxischen Chemotherapeutika und Trastuzumab – einem monoklonalen Antikörper gegen den ErbB2-Rezeptor - eine signifikante Zunahme von Herzinsuffizienzzeichen.

Aufgrund dieser Vorbefunde stellten sich für uns folgende Fragen:

1. Werden Neureguline und ErbB-Rezeptoren im menschlichen Herzen exprimiert?
2. Verändert sich die Expression der untersuchten Genprodukte in der menschlichen Herzinsuffizienz?

### 3 Abkürzungsverzeichnis

% :	Prozent
°C :	Grad Celsius
A.a.i. :	Aqua ad injectabilia
Abb. :	Abbildung
ADP :	Adenosin-5'-diphosphat
AK :	Antikörper
ANF :	atrialer natriuretischer Faktor = <i>atrial natriuretic peptide</i> (ANP)
ATP :	Adenosin-5'-triphosphat
cDNA :	Copy DNA
C <sub>T</sub> -Wert: :	Cycle Threshold-Wert
DCM :	Dilatative Kardiomyopathie
DNA :	Desoxyribonukleinsäure
dNTP :	Desoxynukleosidtriphosphat
EGF :	„epithelial growth factor“
EGF-R:	EGF-Rezeptor (ErbB1)
EthBr :	Ethidiumbromid
h :	Stunde
IC 50 :	Konzentration der halbmaximalen Aktivierung/Hemmung
ICM :	Ischämische Kardiomyopathie
i.v. :	intravenös
kDa :	Kilodalton
KG :	Körpergewicht
l, ml, µl :	Liter, Milliliter, Mikroliter
LV :	linksventrikulär, linker Ventrikel
mA :	Milliampere
max. :	maximal
MgCl <sub>2</sub> :	Magnesiumchlorid
min :	Minute
mol, mmol, µmol :	Mol, Millimol, Mikromol
n :	Anzahl
Nrg :	Neuregulin
NaCl :	Natriumchlorid
NF :	nicht insuffizientes Herz (non-failing)
ng :	Nanogramm
P :	Phosphor
p :	Überschreitungswahrscheinlichkeit

pH:	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pmol:	Pikomol
RNA :	Ribonukleinsäure
RV:	rechtsventrikulär, rechter Ventrikel
sDNA:	small DNA
SDS :	Abk. für engl. sodium dodecyl sulfate
s :	Sekunde
Tab.:	Tabelle
Tris:	Trishydroxymethylaminomethan
vs.:	gegenüber



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Verwendetes Gewebe

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde Myokardgewebe des Menschen verwendet, das der freien Wand des linken Ventrikels entstammt. Als Kontrolle für normale mRNA-Gewebespiegel diente Myokard nicht herzinsuffizienter Spender (NF). Diese Herzen konnten aus technischen Gründen nicht transplantiert werden. Gewebeproben von insuffizientem linksventrikulärem Myokard stammten von Patienten mit transplantationspflichtiger ischämischer (ICM) oder dilatativer Kardiomyopathie (DCM). Die Probenkodierung ist in Tabelle 4-1 dargestellt.

Zur RNA-Herstellung verwendete Proben		
Probennummer	Diagnose	Datum der Entnahme
1	NF	08.01.1999
2	NF	07.11.1998
3	NF	23.02.1994
4	NF	01.07.1999
5	NF	10.02.1989
6	NF	03.04.1992
7	NF	20.07.1994
8	NF	20.07.1996
9	ICM	19.12.2001
10	ICM	28.08.2001
11	ICM	16.08.1993
12	ICM	20.04.1993
13	ICM	10.04.1991
14	ICM	13.12.1994
15	ICM	31.10.1989
16	ICM	05.10.1992
17	DCM	09.02.1996
18	DCM	12.04.1994
19	DCM	14.12.1994
20	DCM	13.04.1994
21	DCM	09.03.1991
22	DCM	25.01.1992
23	DCM	30.07.1990
24	DCM	09.01.1991

Tabelle 4-1: Verwendete Gewebeproben mit Entnahmedatum. Alle Proben stammen vom linken Ventrikel humaner Herzen (ICM= „ischemic cardiomyopathy“; DCM= „dilative cardiomyopathy“). Die nicht insuffizienten Herzen (NF= „Non-Failing“ stammen von Organen, die aus technischen Gründen nicht transplantiert werden konnten.

## 4.2 RNA-Isolation

RNA wurde Hilfe von Trizol<sup>®</sup> (GIBCO BRL Life Technologies, Eggenstein) nach dem Herstellerprotokoll isoliert. Durch TRIZOL – eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisothiozyanat – wurden die Zellen zunächst lysiert. Die starken chaotropen Eigenschaften des Lysereagens verhindern einen Abbau der RNA durch ubiquitär vorkommende RNAsen. Die Abtrennung der Proteine und der DNA von der Gesamt-RNA erfolgt nach Zugabe von Chloroform. Dies führt zur Entmischung des Reagens und die nachfolgende Zentrifugation trennt eine RNA-haltige wässrige obere Phase von einer phenolischen DNA-haltigen, und einer proteinhaltigen Interphase ab. Nachfolgend wurde die RNA aus dem wässrigen Überstand durch Zugabe von Alkohol ausgefällt. Die so gewonnene RNA war weitgehend frei von Proteinen und DNA.

Das Herzgewebe wurde zunächst mit flüssigem Stickstoff gekühlt und in einem tiefgekühlten Mörser zerkleinert. Zu jeweils 100 mg des pulverisierten Gewebes wurden 1000 µl Trizol<sup>®</sup> gegeben. Nach Auftauen wurde mit einem Potter S zweimal 45 s homogenisiert. Danach wurde das Lysat 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden pro Milliliter Trizol<sup>®</sup> 0,2 ml Chloroform hinzugefügt, kräftig gemischt und der Ansatz 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben 20 min lang bei 4 °C und 12000 g zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5417 R). Es bilden sich drei Phasen. Eine obere wässrige Phase (RNA-haltig), eine Zwischenphase und eine untere lipophile phenolische Phase. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von Isopropanol 0,5 ml/ml Trizol) ausgefällt. Nach Mischen wurden die Proben 10 min inkubiert. Durch 15-minütige Zentrifugation (12000 g, 4 °C) wurde die RNA pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und zu dem Pellet wurde 1 ml 80% Ethanol pro Milliliter Trizol gegeben und 15 s geschüttelt, um Reste der Lysisreagentien aus der RNA zu entfernen. Die RNA wurde erneut durch Zentrifugation pelletiert (5 min, 7500 g, 4 °C). Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das Pellet an der Raumluft getrocknet. Anschließend wurde die RNA in 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und Konzentration und Reinheitsgrad photometrisch in einer 1:50 Verdünnung bestimmt. Die Messungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Als Umrechnungsfaktor wurde eine Konzentration von 40 µg/ml bei einer OD<sub>260nm</sub> von 1 nm verwendet. Der Quotient OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> diente zur Reinheitskontrolle der RNA und betrug im Rahmen der durchgeführten Experimente ≥ 1,6 bis 2,0. Nach der Messung wurde die RNA durch Zugabe von RNase-freiem Wasser auf 1 µg/µl eingestellt und aliquotiert. Die RNA-Lösung wurde bei –20 °C gelagert.

### 4.3 RT-PCR

Bei der RT-PCR wird die mRNA aus den Zellen durch eine virale Reverse Transkriptase aus dem *Moloney Mouse Leukemia Virus* in cDNA umgeschrieben. Zur Initiierung der Reversen Transkription benötigt die Transkriptase doppelsträngige Nukleinsäurebereiche. In dieser Arbeit wurden *Random Hexamer Primer* verwendet, die aus einer Mischung von Oligonukleotiden mit einer Länge von 6 Basen bestehen, wobei alle statistisch möglichen Basenabfolgen als Oligonukleotide in dieser Mischung enthalten sind.

Für jede RT-Reaktion wurden 2 µl RNA und 0,75 µl *Random Hexamer Primer* (pol(N)6 1,6 mg/ml) in ein Eppendorfgefäß gegeben. Dieses Gemisch wurde 5 min bei 70 °C denaturiert und dann auf Eis gestellt. Nachfolgend wurden 5 µl 5-fach *First Strand Buffer*, 5 µl dNTP-Gemisch (10 mM), 2 µl 0,1 M Dithiotreitol und 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase zugegeben. Diese Lösung wurde mit 9,25 µl A.a.i. versetzt und 2 s gemischt. Die Reverse-Transkriptase-Reaktion lief 60 min bei 37 °C in einem Thermoblock ab. Danach wurde die cDNA 2 min bei 94 °C denaturiert und dann auf Eis gestellt. Der Ansatz wurde auf 50 µl mit A.a.i. aufgefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 4.4 PCR

Bei der PCR werden Abschnitte der DNA exponentiell vervielfältigt.

Für jeden PCR-Ansatz wurde das in Tabelle 4-2 beschriebene Mischungsverhältnis beibehalten. Der Echtzeit-PCR-Ansatz wird im Kapitel 4.11 beschrieben.

Substanz	Menge in µl
10*Puffer	2
MgCl <sub>2</sub>	2,4
dNTP (10mM)	1,6
<i>Primer-mix</i> (10µM)	1,5
Aai	10,3
Ampli Taq Gold	0,2
cDNA	2
Gesamtansatz	20

Tabelle 4-2: Standard PCR-Ansatz

#### 4.5 Verwendete Sonden und *Primer*

<i>Primename</i>	<i>Primer</i>	<i>Annealing-Temperatur</i> [ °C]	Zyklen	PCR-Produktlänge in bp
nrg1-hFa/b	TGTGCGGAGAAGGAGAAA	50		
nrg1-hRa	CTTTCATGGGCACATTCTCA	50	40	142
nrg1-hRb	GCTGGCCATTACGTAGTTTTG	50	40	141
Herstatin-F	GCCCCAAGCACTCTGACT	55	35	423
Herstatin-R	GGGCCAGGGGTAGAGAGTAG			
erbB2-F	AACACAGCGGTGTGAGAAGT	55	35	438
erbB2-R	TGGGTGTTATGGTGGATGA			
erbB3-F	TCAATGTCTTCCGGACAGTA	55	35	219
erbB3-R	TTATATAGATACGCCCAGCACT			
erbB4-F	TTACATGGTCATGGTCAAATGT	55	35	202
erbB4-R	CATATCTTCCAAATCCTCTTCATC			
GAPDH-F	AACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA	55	35	108
GAPDH-R	CAGTCTTCTGAGTGGCAGTGATG			
EGF-RF	GTGATCCAAGCTGTCCCAAT	55	35	302
EGF-RR	GGTGGCACCAAAGCTGTATT			

Tabelle 4-3: Tabellarische Auflistung der verwendeten Sonden und *Primer*

#### 4.6 Gelelektrophorese

Für ein 2%iges Gel wurden 2 g *small*-DNA Agarose pro 100 ml 1 xTAE-Puffer in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht. Nach Erkalten auf etwa 60 °C wurden unter Rühren 3 µl Ethidiumbromid (10 µg/µl) pro 100 ml hinzugefügt. Die Lösung wurde gerührt bis sich das Ethidiumbromid gut verteilt hatte und dann in die Gelkammer gegossen. Der Kamm wurde auf einer Seite des Gels eingesetzt und nach dem Erkalten vorsichtig entfernt. Das Gel wurde mit den *Slots* zur negativen Elektrode in 1 xTAE-Puffer in eine Kammer gelegt in der ein elektrisches Feld angelegt wird.

Zur Auftrennung von DNA wurden horizontale 2-2,5%-ige TAE-Agarosegele verwendet. Die Proben und 1 µg DNA-Größenmarker, (100 bp-Marker) wurden mit 1/5 Volumen Ladebuffer versetzt und für 30 min bis 2 h bei 70 –130 V aufgetrennt. Durch das interkalierende Ethidiumbromid konnte die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem Geldokumentationssystem (Fa. BioRad) mit angeschlossenem Computer dokumentiert werden.

#### 4.7 DNA-Isolation aus Agarosegelen

Durch ein chaotropes Agens wird bei der DNA-Isolation aus Agarosegelstücken die Agarose aufgelöst und die Bindung der DNA an eine Glasmatrix erleichtert. In einem nächsten Schritt werden Proteine und Salze durch einen Waschpuffer entfernt. Die Elution der DNA von der Säule erfolgte durch einen Puffer mit niedrigem Ionengehalt oder Wasser.

Die Banden mit der dem Amplifikat entsprechenden Länge wurden unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten und mittels eines *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham)* gereinigt. Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden zusammen mit *Capture buffer* in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß bei 60 °C 10 min lang erwärmt und geschüttelt, um die Agarose vollständig aufzulösen. Das Gemisch wurde in eine GFX-Säule überführt und diese 30 s auf einer Eppendorf Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen und 200 µl Waschpuffer auf die Säule gegeben. Nach 30 s Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wurde der Waschpuffer verworfen. Die Säule wurde in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit 50 µl A.a.i überschichtet. Nach einer Minute Inkubation wurde 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die so erhaltene DNA-Lösung wurde bei 5 °C aufbewahrt.

#### 4.8 Ligation

Zu 16 µl DNA-Lösung in A.a.i wurden 2 µl T4-Ligase 10-fach Puffer, 1 µl TA-Cloning-Vektor PCR 2.1 und 1 µl Ligase-Enzym (1 U/µl) gegeben und gemischt. Dieser Ansatz reagierte bei 14 °C über Nacht bei 4 °C oder 2 h bei Raumtemperatur.

#### 4.9 Transformation von E.coli

##### 4.9.1 Elektroporation

Zu je 20 µl Probe wurde in eine sterile Elektroporationsküvette je 40 µl E. coli Lösung (DH10B oder DH5α) gegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die Elektroporation geschieht durch einen kurzen Spannungsimpuls von 1,8 kV in einer Zeit von ca. 5 ms. Nach der Elektroporation wurde zu der Suspension 140 µl SOC-Medium gegeben. Dieses Gemisch wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Die gesamte Probe wurde auf Ampicillinagarplatten bis zum Eintrocknen der Suspension ausgestrichen. Die Ampicillinagarplatten wurden vorher mit 40 µl X-GAL und 10 µl

IPTG behandelt. Die beiden Lösungen wurden gleichmäßig auf der Agarplatte verteilt und trockneten 30 min bei 37 °C im Inkubator. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C wurden die weißen Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze abgenommen und für die DNA-Präparation weiterverwendet.

#### 4.9.2 Hitzetransformation

Es wurde das dual promotor TA -Cloning kit verwendet. Es enthält kompetente Inv $\alpha$ F' Bakterien, welche durch Zugabe des pCR II Vektor, der das gewünschte Genfragment enthält, transformiert werden. Die Inv $\alpha$ F' Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Das Ligationsprodukt wurde in einer Eppendorf Tischzentrifuge wenige Sekunden anzentrifugiert. Es wurden 2  $\mu$ l oder 6  $\mu$ l des Ligationsansatzes zu den Bakterien pipettiert und der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden dann 45 s auf 42 °C erhitzt. Es wurden 250  $\mu$ l 20 °C warmen SOC-Mediums zugegeben. Das Gemisch inkubierte auf einem Thermoblock mit 37 °C bei 300 U/min 1 h lang.

Zur Selektion der transformierten Zellen trägt der eingesetzte pCR.2.1 Plasmidvektor neben einem Gen für Ampicillinresistenz, ein lacZ-Gen für das Enzym  $\beta$ -Galactosidase, welches bei Klonierung eines PCR-Produkts inaktiviert wird. Daher ist eine Blau/Weiß-Selektion nach Plattenkultur der Zellen auf 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal) enthaltendem Agar möglich. Die Kolonien, die keine Rekombinanten enthalten, sind blau gefärbt. Die Agarplatten wurden entweder mit 50  $\mu$ l oder 200  $\mu$ l Bakteriensuspension bestrichen und bei 37 °C im Inkubator über Nacht wachsen gelassen. Die weißen Kolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte abgenommen und Ampicillinselektionsmedien damit beimpft.

#### 4.9.3 DNA-Präparation

Die DNA Präparation wurde mit dem Plasmid Kit mini (Quiagen) entsprechend der Herstelleranweisung durchgeführt. Die Bakterien mit dem gewünschten Plasmid wurden bei ca. 5000g abzentrifugiert und anschließend in einem Puffer resuspendiert, der die Zellen alkalisch mit SDS lysierte. Zur Degradation störender RNA enthielt die Lösung zusätzlich eine RNase. Nach Neutralisation der Lösung wurde die DNA an eine stationäre Phase gebunden, gewaschen und wieder eluiert. Das Eluat enthielt die DNA. 1,5 ml einer Übernachtskultur E. coli in geeignetem Medium wurden aliquotiert und 5 min bei 1300 rpm in der Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde restlos entfernt und das Bakterienpellet in 250  $\mu$ l Puffer P1 resuspendiert. Danach wurde 250  $\mu$ l Puffer P2 hinzugegeben, durch mehrmaliges Schwenken vermischt und 5 min inkubiert. Nach Hinzugabe von Puffer N3 wurde abermals durch mehrmaliges Schwenken gemischt. Sodann wurde 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert, und der

Überstand in eine Quiaprepsäule überführt. Es wurde daraufhin 30 bis 60 s zentrifugiert und das Zentrifugat verworfen. In die Säule wurden 50 µl A.a.i. pipettiert und nochmals 30 bis 60 s zentrifugiert. Das Eluat enthielt die präparierte Plasmid-DNA. Es wurde photometrisch die Konzentration bei 260 nm sowie die Reinheit durch Errechnung des Verhältnisses von OD 260/OD 280nm bestimmt.

#### 4.10 Sequenzierung

Es wurde eine modifizierte Kettenabbruchmethode nach Sanger mit Didesoxy-Nukleotiden- angewandt. Als Kit wurde der *Big Dye TM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix* (Sequenziermix) verwendet. Dieser Sequenziermix enthält neben einer thermostabilen Polymerase und Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) auch unterschiedlich fluoreszenz-markierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) in geeignetem Puffer. In einer *Primer*-Extensionsreaktion wird ein mittels Fluorophor (Fluoreszenz-Farbstoff) markiertes ddNTP eingebaut, wodurch die Polymerase keine weiteren Nukleotide anhängen kann und die Reaktion abbricht. Die DNA-Fragmente wurden mittels Kapillar-Elektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Die 3'-terminalen markierten Desoxymonophosphate werden durch Laserstrahlung angeregt und detektiert.

Das Mischen der Proben, die Amplifikation und die Aufreinigung des Reaktionsansatzes wurden selbst durchgeführt. Es wurde jeweils eine Vorwärts und eine Rückwärtsreaktion d.h. je ein Ansatz nur mit *Forward-Primern* und einer nur mit *Reverse-Primern* nach dem in Tabelle 4-4 dargestellten Schema angesetzt. Die Zeiten und die Temperaturen für die Amplifikation waren für jedes Gen identisch.

	Menge in µl
500 ng DNA	x
5 pmol <i>Primer</i> (fwd bzw. rev.)	1
Sequenziermix	4
A.a.i	15-x
Total	20
Temperatur	Zeit
95 °C	30 s
50 °C	15 s
60 °C	1 min
25 Zyklen	

Tabelle 4-4: Versuchsansatz zur Sequenzierung

#### 4.10.1 Aufreinigung des Sequenzieransatzes

Zum Ansatz wurden 2 µl Natriumacetat/250 nM EDTA-Puffer, 60 µl 100% Ethanol und 1 µl Glykogen (10 mg/ml) pipettiert. Dieser Ansatz wurde mit dem Vortexgerät gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 14000 U/min bildete sich am Boden ein Pellet. Das Ethanol wurde abgesaugt und das Pellet mit 200 µl 70%igem Ethanol überschichtet. Nach sorgfältigem Absaugen des Ethanols wurde das Pellet bei 37 °C getrocknet. Der aufgereinigte Ansatz wurde zur Sequenzierung ins Institut für Biochemie der Universität Erlangen gegeben, um auf einem automatischen Fluoreszenz-Sequenzierer (Fa. Applied Biosystems) elektrophoretisch getrennt und analysiert zu werden.

#### 4.11 Quantitative Echtzeit PCR

##### 4.11.1 Theorie der quantitativen Echtzeit PCR:

Für die quantitative PCR wurde ein *SYBR-Green-I-Reporter System* verwendet. *SYBR-Green I* ist ein fluoreszierender Farbstoff, der an die schmale Furche doppelsträngiger DNA bindet und unter UV-Anregung in gebundenem Zustand Licht emittiert. Die Fluoreszenz in Abwesenheit von doppelsträngiger DNA ist um mehr als den Faktor 1000 geringer. An einsträngige Ribonukleinsäuren wird *SYBR-Green-I* praktisch nicht gebunden. Das *SYBR-Green-I-Reporter System* funktioniert mit jedem *Primer*paar, da die Menge an emittiertem Licht direkt proportional zu der Menge gebildeter DNA-Doppelstränge ist. Es müssen, im Gegensatz zur TaqMan-PCR, keine genspezifischen Sonden hergestellt werden. Es muss jedoch gewährleistet sein, dass bei der Amplifikation keine Nebenprodukte entstehen, denn diese würden zur Gesamtfluoreszenz beitragen. Die Bildung von Dimeren aus überschüssigen *Primern* muss minimiert werden. Die Lichtemission wird am Ende des Amplifikationsschritts bei 72 °C gemessen, da bei dieser Temperatur die *Primer* einzelsträngig vorliegen und daher eine Fluoreszenz, die durch *Primer*dimere verursacht wird, nicht mit der Messung interferiert.

Bei der Messung der Lichtemission können vier Phasen unterschieden werden. In der ersten Phase kommt es zu einem linearen Anstieg der DNA-Kopien. Die Fluoreszenzwerte liegen jedoch im unteren Messbereich, in dem auch die Hintergrundfluoreszenz der verwendeten Reagentien beobachtet wird. In der zweiten Phase verdoppeln sich die Messwerte mit jedem Amplifikationszyklus und liegen oberhalb der Hintergrundfluoreszenz. In der dritten Phase kommt es zu einer



Kurvenabflachung und in der vierten Phase zur Bildung eines Plateaus. In der dritten Phase reduziert sich die Bildung von DNA bis sie in der vierten Phase auf Null zurückgeht, da Reagenzien aufgebraucht werden und die enzymatische Aktivität der Polymerasen erschöpft ist.

Die Quantifizierung in der Echtzeit-PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem Threshold Cycle (CT-Wert). Der CT-Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Die Quantifizierung der DNA-Menge beruht nicht auf absoluten Mengen des letztendlich entstehenden PCR-Produkts, sondern auf der Kinetik der PCR-Reaktion. Dafür nimmt man als Richtlinie den CT-Wert, da zu diesem Zeitpunkt die Amplifikation exponentiell ist und in dieser Phase der PCR-Reaktion keine limitierenden Faktoren, wie *Primer*- oder Nucleotidmangel oder nachlassende Enzymaktivität vorliegen. Je früher der CT-Wert erreicht wird desto größer war die eingesetzte Menge an cDNA des zu untersuchenden Genprodukts. Um sicherzustellen, dass in unterschiedlichen Proben die gleiche Menge RNA untersucht wurde, wurde als Kontrolle die GAPDH-Expression untersucht. GAPDH unterliegt im Herzen keiner Regulation und stellt somit ein *housekeeping* Gen dar. Die Expression der zu untersuchenden Gene wurde auf die GAPDH-Messwerte normalisiert (s.u.).

#### 4.11.2 Durchführung der quantitativen Echtzeit PCR:

Zur Messung der Proben wurde das *Quantitect-SYBR-Green-I PCR-Kit* (Fa. Qiagen, Hilden) verwendet. Die Untersuchungen wurden an einem *ABI Prism 7700 Sequence Detector* durchgeführt. Für alle quantitativen PCR-Ansätze wurde der in der Tabelle 4-5 aufgeführte Ansatz verwendet.

	Reaktionsansatz
12,5 µl	<i>2x Quantitect-SYBR-Green-I-PCR-Master-Mix</i>
2 µl	cDNA 1µg/µl
2 µl	<i>Primemix</i> 0,625 nM
8,5 µl	RNAse freies Wasser
25 µl	Summe pro Ansatz

Tabelle 4-5: Ansatz der quantitativen PCR

Die quantitative-PCR wurde mit den in Tabelle 4-6 und 4-7 aufgeführten Zeiten und Temperaturen durchgeführt. Die Detektion geschah in jedem Zyklus bei 72 °C. Für die Gene *nrg1α*, *nrg1β* und GAPDH wurde folgende Reaktions-Sequenz angewandt:

Aktivierung /Denaturierung	94 °C	15:00	Einmal
Denaturierung	94 °C	00:15	40 Zyklen
Annealing:	55 °C	00:30	
Extension	72 °C	01:00	

Tabelle 4-6: Sequenz für die Quantitative PCR für nrg1 $\alpha$ , nrg1 $\beta$  und GAPDH.

Für EGF-R, ErbB2-R, ErbB3-R, ErbB4-R und Herstatin wurde aufgrund höherer Schmelzpunkte der *Primer* nachfolgende PCR-Bedingungen angewandt:

Aktivierung /Denaturierung	94 °C	15:00	Einmal
Denaturierung	94 °C	00:15	40 Zyklen
Annealing	60 °C	00:30	
Extension	72 °C	01:00	

Tabelle 4-7: Quantitative PCR-Sequenz für EGF-R, ErbB2-R, ErbB3-R, ErbB4-R und Herstatin. Es wurden 40 Zyklen gemessen.

#### 4.11.3 Optimierung

Um die Konzentration der sich bildenden *Primer*dimere möglichst gering zu halten, wurden die PCR-Reaktionen mit verschiedenen *Primer*konzentrationen wiederholt. Ziel war es, bei deutlichem Nachweis des PCR-Produkts keine *Primer*wolken im Agarosegel zu sehen. Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte in einem 2,5%igen Agarosegel aufgetrennt. Dies diente zur Verifizierung der Produktlänge und der Detektion eventuell gebildeter *Primer*dimere oder unspezifischer Nebenprodukte.

#### 4.11.4 Linearitätsnachweis

Zum Nachweis der Linearität der Taqman-PCR wurde jedes Genprodukt in Verdünnungsreihen einer DNA-Lösung gemessen. Die Konzentration wurde bei jeder Dilution geviertelt in den Schritten 1, 1:4, 1:16. Bei jeder Reaktion wurde eine Leerprobe mitgeführt, die statt cDNA A.a.i. enthält. In jedem Zyklus einer PCR wird bei optimalen Bedingungen die Menge an Amplifikat verdoppelt. Dies entspricht bei einer quantitativen RT-PCR einer Erhöhung des C<sub>T</sub>-Werts um 1. Es wäre von einer Verdünnungsstufe zur nächsten eine Erhöhung des C<sub>T</sub>-Werts um 2 Einheiten zu erwarten. Dies wurde in der Abbildung Nr. 4-1 exemplarisch für erbB4 dargestellt.

#### Linearitätsnachweis erbB4

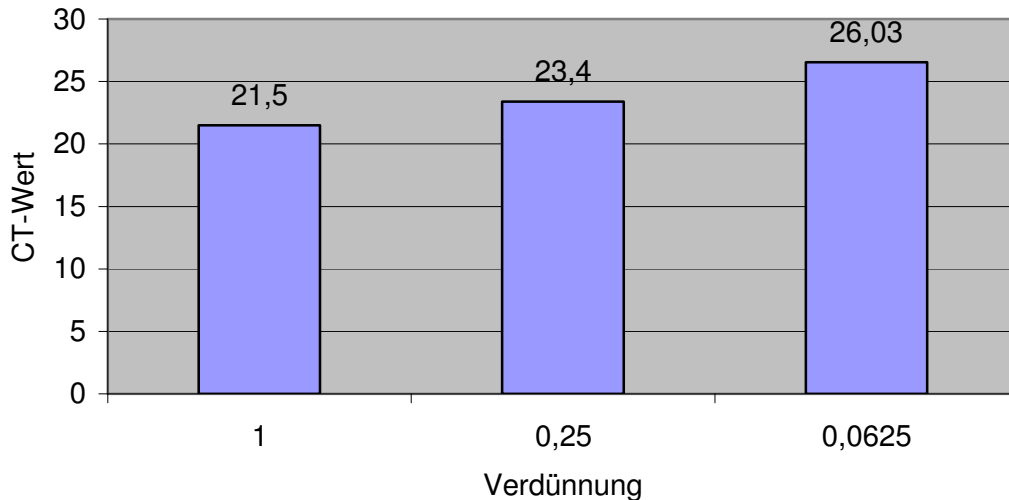


Abbildung 4-1: Linearitätsnachweis der Taqman-Analyse mit 3 Verdünnungen 1 (Säule 1), 1:4 (Säule 2) und 1:16 (Säule 3). Der gemessene  $C_T$ -Wert steigt erwartungsgemäß bei jedem Verdünnungsschritt um etwa zwei an.

#### 4.12 Auswertung

Für jedes Gen wurden acht NF Proben, acht DCM Proben, acht ICM Proben und eine Leerprobe gemessen. Jede Probe wurde doppelt bestimmt und der Mittelwert der  $C_T$ -Werte errechnet. Um Verfälschungen durch unterschiedliche cDNA -Konzentrationen zu vermeiden, wurde in jeder Probe auch der  $C_T$ -Wert von GAPDH bestimmt. GAPDH unterliegt in der Regel in Herzmuskelzellen keiner Regulation. Es wurde ein  $\Delta C_T$ -Wert gebildet aus der Differenz des Mittelwerts der  $C_T$ -Werte der entsprechenden Probe und dem Mittelwert der  $C_T$ -Werte der GAPDH-Messung. Aus den  $\Delta C_T$ -Werten der NF-Proben wurden der Mittelwert der  $\Delta C_T$ -Werte und die Standardabweichung dieses Mittelwerts berechnet. Von jedem  $\Delta C_T$ -Wert wurde der Mittelwert der  $\Delta C_T$ -Werte der NF-Proben subtrahiert. Man erhält einen  $\Delta\Delta C_T$ -Wert. Von diesem  $\Delta\Delta C_T$ -Wert wurden der Mittelwert und dessen Standardabweichung gebildet. Um die relative Expression zu erhalten wurde mit dem  $\Delta\Delta C_T$ -Wert der Exponent zur Zahl zwei gebildet.

Aus den Werten der DCM, ICM und NF Proben wurde der Median und das Konfidenzintervall berechnet. Die so erhaltenen relativen Expressionen wurden mit nicht-parametrischen Testverfahren auf signifikante Gruppenunterschiede untersucht. Im Ergebnisteil wurden die 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile graphisch dargestellt.

#### 4.13 Statistik

Die graphische Auswertung erfolgte mit dem Programm „*Graph Pad Prism*“ (*Graph Pad Software, San Diego, USA*). Zur statistischen Analyse wurden nicht-parametrische Testverfahren für ungepaarte Vergleiche angewendet. Ein p-Wert  $\leq 0,05$  wurde als signifikant angenommen. Die Untergruppenvergleiche erfolgten in Analogie zur Bonferroni-Korrektur nach Absenkung des p-Werts für die statistische Signifikanz durch die Formel  $0,05/m$ , wobei m die Anzahl der Vergleiche war.

#### 4.14 Lösungen

1xTAE: (Tris/Acetat/EDTA): 40mM Tris-Base, 2 mM EDTA, pH 8,0 mit NaAc eingestellt

X-Gal: 40 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-D-Galaktopyranosid in DMSO gelöst

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

#### 4.15 Substanzen und Geräte

Produkt	Firma
32 pH Meter	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
ABI Prism 7700 Sequence Detector	Applied Biosystems, Foster City, USA
ABI Prism 7900 Sequence Detector	Applied Biosystems, Foster City, USA
Ampli Taq Gold	Packard BioScience, Dreieich, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
deionisiertes Formamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma Chemie, Deisenhofen, Deutschland
dNTP	PEQLAB, Erlangen, Deutschland
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Krankenhausapotheke Universität Erlangen, Deutschland
Ethidiumbromid	Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd, säurefrei 37%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Gel Doc 2000	Bio-Rad LaboratoriesMünchen, Deutschland
Gene Amp PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA.
GFX-Kit	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Glyzerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Incu-Shake	MMM Medcenter, Gräfeling, Deutschland

Isopropanol	Carl Roth.GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Micropulser	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
M-MLV-RT	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
PCR 10-fach Puffer	PerkinElmer, Packard BioScience, Dreieich, Deutschland
Plasmid Kit Mini	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Potter S	B. Braun Biotech, Greifenberg, Deutschland
Robocycler Gradient 96	Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland
RT- 5-fach Puffer	PerkinElmer/Packard BioScience, Dreieich, Deutschland
sDNA Agarose	Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf, Deutschland
Spektrometer 1000	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
T4 Polynukleotid Kinase-Puffer	Promega Corporation, Madison, USA
T4-DNA-Kinase	Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Deutschland
TA-Cloning Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trishydroxymethylaminmethan (Tris)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trizol	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ultrazentrifuge L7-65	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Universal Agarose	PEQLAB, Erlangen, Deutschland
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Zentrifuge J2-21	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland

Tabelle 4-8

## 5 Ergebnisse

### 5.1 EGF-Rezeptor

#### Nachweis und Quantifizierung der EGF-R-mRNA

Die *Primer* zur Amplifikation der EGF-R-cDNA binden an die Positionen 569-588 (Fw) und 851-870 (Rev) der mRNA (NM\_005228.2). Zwischen den *Primern* liegen auf dem EGF-Rezeptor-Gen zwei Introns mit einer Länge von 1347 Basen und 1184 Basen. Bei korrekter - von der cDNA ausgehender - Amplifikation ist demnach ein Produkt von 302 bp zu erwarten. Bei Amplifikation genomischer DNA wäre ein PCR-Produkt von mehr als 2500 bp zu erwarten. Die Lage der verwendeten *Primer* in Beziehung zur genomischen DNA und der mRNA ist in Abbildung 5-1 dargestellt.

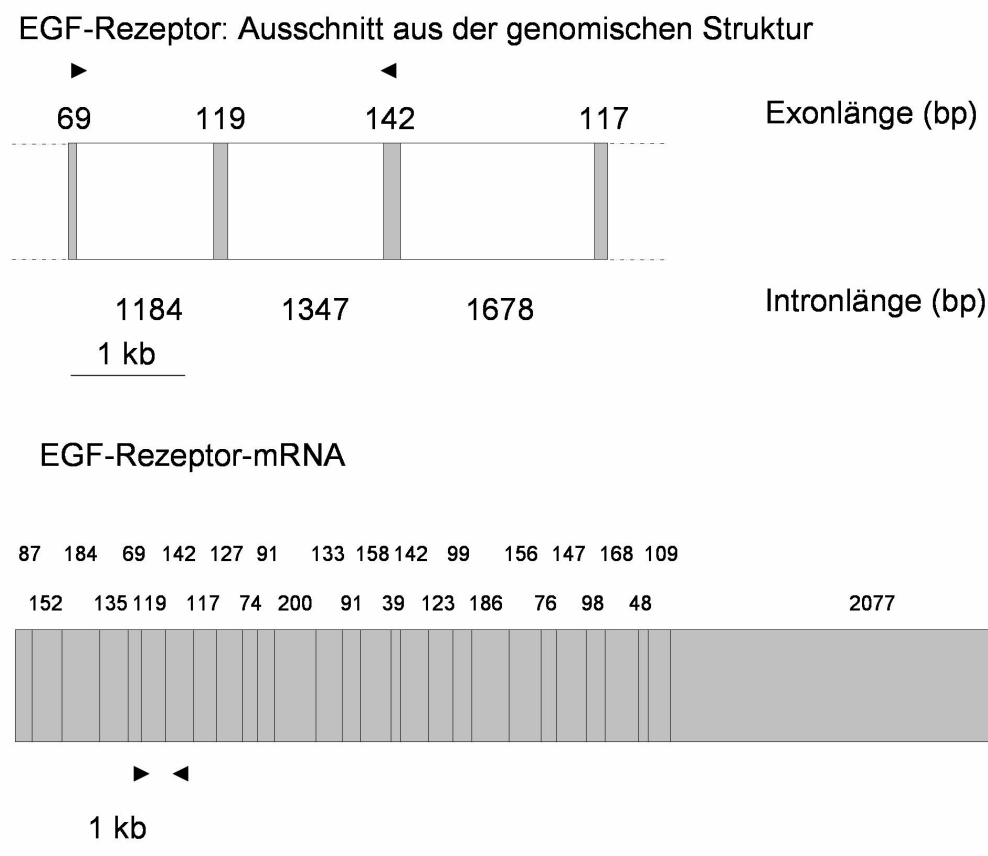


Abbildung 5-1: Darstellung eines Ausschnitts der Exon-Intronstruktur des EGF-Rezeptor-Gens und der Struktur der mRNA des EGF-Rezeptor. Die Länge der Exons bzw. Introns sind angegeben. Introns sind weiß, Exons grau unterlegt. Die Positionen der zur Amplifikation verwendeten *Primer* sind durch Dreiecke symbolisiert.

Die von der cDNA ausgehende PCR ergab ein Produkt der erwarteten Größe (Abb.5-2). Nebenprodukte, aus der Amplifikation genomischer DNA oder unspezifische PCR-Produkte wurden nicht beobachtet.

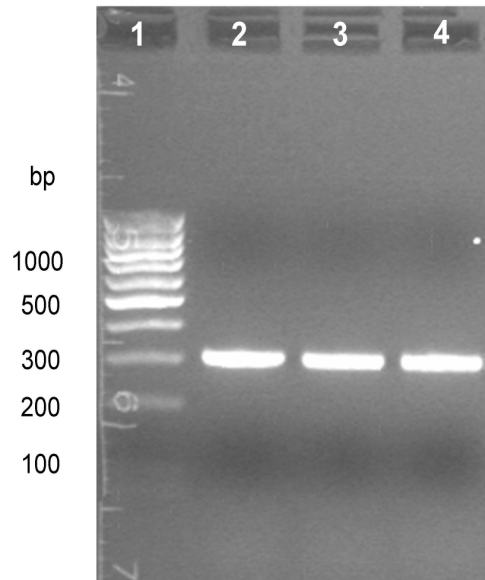


Abbildung 5-2: Gelelektrophorese des EGF-R-RT-PCR-Produkts. Spur 1: 100bp DNA-Standard. Spur 2: Dilatative Kardiomyopathie; Spur 3: Ischämische Kardiomyopathie; Spur 4: nicht insuffizientes Myokard In allen Myokardproben konnte ein RT-PCR Signal der erwarteten Größe (302 bp) gefunden werden. Genomische oder unspezifische PCR-Produkte wurden nicht amplifiziert.

### 5.1.1 EGF-Rezeptor Fragmentlängenberechnung

Die experimentell bestimmte PCR Fragmentgröße von 306 bp stimmt mit der erwarteten Fragmentgröße überein. Durch Bestimmung der elektrophoretischen Laufweite der Banden des DNA-Größenstandards wurde eine Standardkurve mittels exponentieller Regression erstellt (Abb. 5-3). Die Größe des Produkts wurde anhand der gewonnenen Funktion berechnet. Die errechnete Größe des Produktes stimmte mit einer Abweichung von unter 2% mit der tatsächlichen Länge überein.



### EGF-Rezeptor PCR-Produkt:

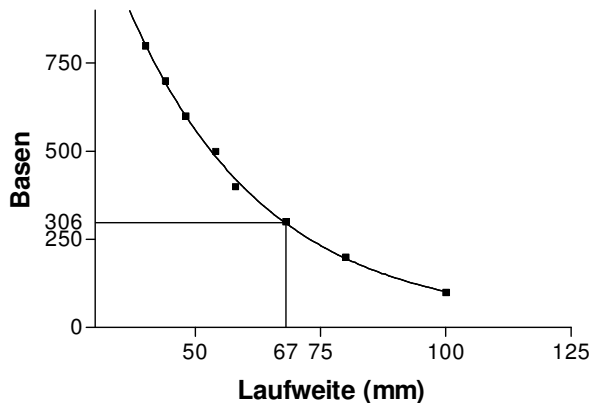


Abbildung 5-3: Bestimmung der Standardkurve anhand des DNA-Größenstandards.

Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR 2.1 Vektor kloniert und sequenziert. Der Abgleich mit der Referenzsequenz (NM\_005228.2) ist in Abbildung 5-4 dargestellt und ergab eine vollständige Übereinstimmung des Amplifikats mit der erwarteten Sequenz.

```

Ref 1172 gtgtgtaacggaataggtattggtgaatttaagactcactctccataaatgctacgaat
      |||
Pro. 97  gtgtgtaacggaataggtattggtgaatttaagactcactctccataaatgctacgaat

Ref 1232 attaaacacttcaaaaaactgcacctccatcagtggcgatctccacatcctgccggtggca
      |||
Pro. 157 attaaacacttcaaaaaactgcacctccatcagtggcgatctccacatcctgccggtggca

Ref 1292 tttaggggtgactccttcacacatactcctcctctggatccacaggaactggatattctg
      |||
Pro. 217 tttaggggtgactccttcacacatactcctcctctggatccacaggaactggatattctg

Ref 1352 aaaaccgtaaaggaaatcacagg 1374
      |||
Pro. 277 aaaaccgtaaaggaaatcacagg 299
  
```

Abbildung 5-1 Sequenzabgleich des klonierten EGF-R-RT-PCR-Produkts (Pro) mit der Referenz-Sequenz der humanen EGF-R-mRNA (NM\_005228.2). Das klonierte Produkt zeigte eine vollständige Übereinstimmung mit der erwarteten Sequenz.

Die quantitative *Real-Time* PCR mit *SYBR-Green* ergab für die EGF-Rezeptor-mRNA einen medianen  $C_T$ -Wert von 25,7. Für GAPDH wurde ein medianer  $C_T$ -Wert von 19,5 bestimmt. Die EGF-R-mRNA-Konzentration war in insuffizienten und nicht insuffizienten Herzen nicht unterschiedlich. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-5 dargestellt.

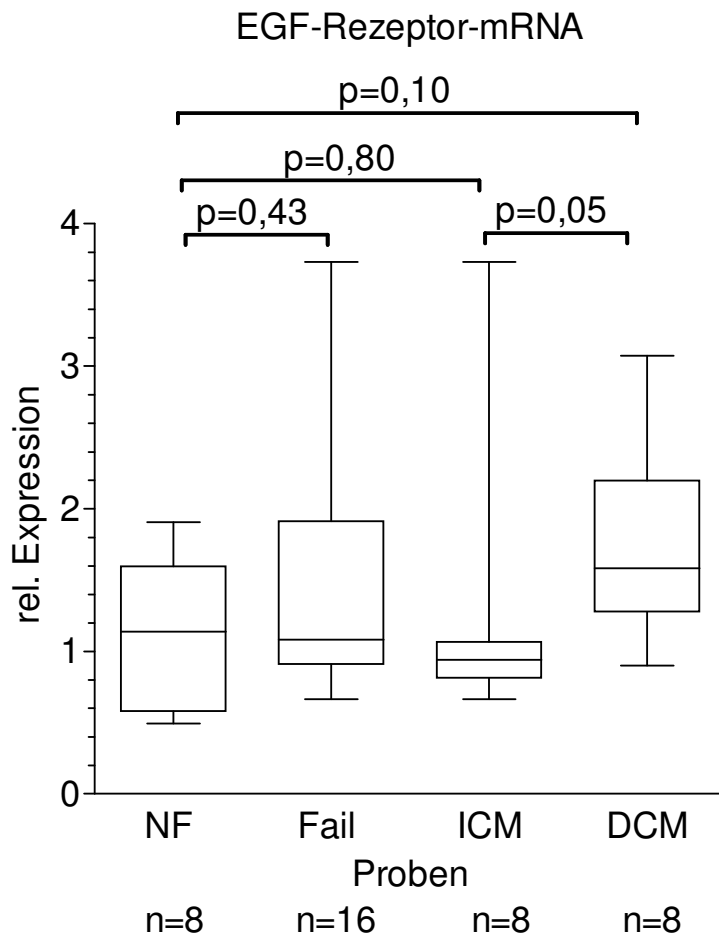


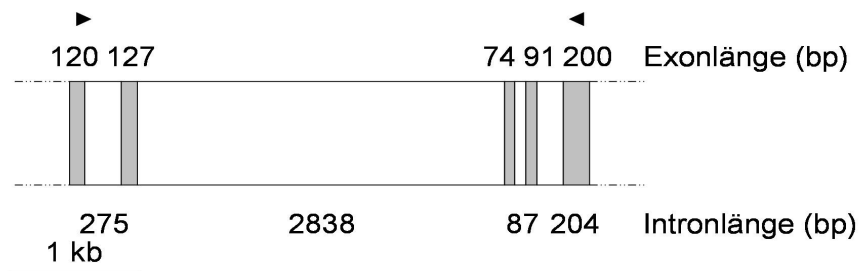
Abbildung 5-2: Grafische Darstellung der anhand der  $\Delta\Delta C_T$ -Werte ermittelten und auf die mittlere Expression in Normalgewebe normalisierte EGF-Rezeptor-mRNA-Expression. Dargestellt sind die 10., 25., 50. (Median), 75., und 90. Perzentile. Es zeigt sich kein statistisch relevanter Unterschied der Expression zwischen nicht insuffizienten und insuffizienten Herzen.

## 5.2 ErbB2-Rezeptor

### Nachweis und Quantifizierung der erbB2-mRNA

Die *Primer* zur Amplifikation der erbB2-cDNA binden an die Positionen 981-1000 (Fw) und 1400-1418 (Rev) der mRNA (Referenz: NM\_004448.1). Bei korrekter - von der cDNA ausgehender - Amplifikation ist demnach ein Produkt von 438 bp zu erwarten. Zwischen den *Primern* liegen im erbB2-Gen vier Introns mit einer Länge von 275 Basen, 2818 Basen, 87 Basen und 204 Basen. Bei Amplifikation genomischer DNA wäre daher ein PCR-Produkt von mehr als 3800 bp zu erwarten. Die Lage der verwendeten *Primer* in Beziehung zur genomischen DNA und der mRNA ist in Abbildung 5-6 dargestellt.

erbB2: Ausschnitt aus der genomischen Struktur



erbB2-mRNA

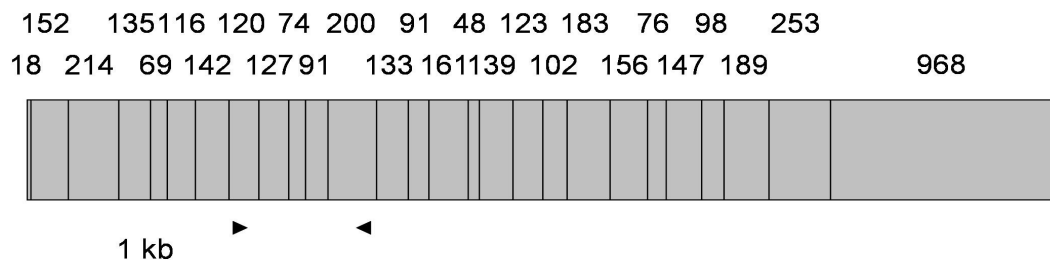


Abbildung 5-3: Darstellung eines Ausschnitts der Exon-Intronstruktur des erbB2-Gens und der Struktur der mRNA von erbB2. Die Länge der Exons bzw. Introns sind angegeben. Introns sind weiß, Exons grau unterlegt. Die Positionen der zur Amplifikation verwendeten *Primer* sind durch Dreiecke symbolisiert.

Die von der cDNA ausgehende PCR ergab ein Produkt der erwarteten Größe (Abb.5-7). Nebenprodukte, wie sie aus der Amplifikation genomischer DNA entstanden sein könnten, wurden nicht beobachtet. Unspezifische andere PCR-Produkte wurden ebenfalls nicht beobachtet.

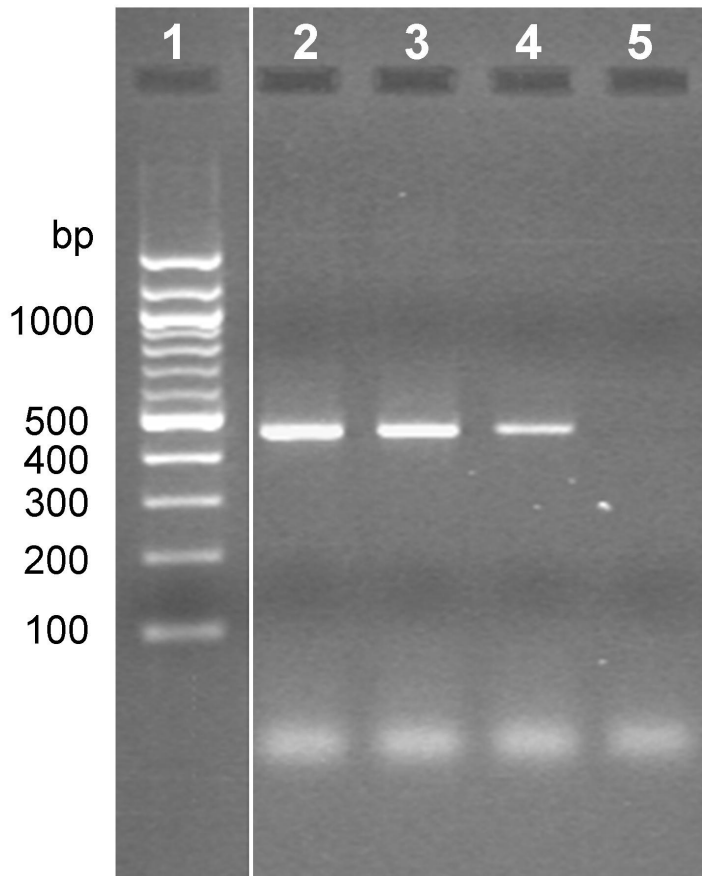


Abbildung 5-4: Gelelektrophorese der Produkte der erbB2-RT-PCR. Spur 1: 100 bp DNA-Standard. Spur 2: Dilatative Kardiomyopathie; Spur 3: Ischämische Kardiomyopathie; Spur 4: nicht insuffizientes Myokard. In allen Myokardproben konnte ein RT-PCR-Signal der erwarteten Größe (438 bp) gefunden werden. Genomische oder unspezifische PCR-Produkte wurden nicht amplifiziert.

Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR 2.1 Vektor kloniert und sequenziert. Der Abgleich mit der Referenzsequenz (NM\_004448.1) ergab eine vollständige Übereinstimmung des Amplifikats mit der erwarteten Sequenz.

```

Ref 1131 aacacagcgggtgtgagaagtgcagcaagccctgtgcccgagtgtgctatggctctgggcat
        |
Pro. 533 aacacagcgggtgtgagaagtgcagcaagccctgtgcccgagtgtgctatggctctgggcat

Ref 1191 ggagcacttgcgagaggtgagggcagttaccagtgccaatatccaggagtttgctggctg
        |
Pro. 473 ggagcacttgcgagaggtgagggcagttaccagtgccaatatccaggagtttgctggctg

Ref 1251 caagaagatctttgggagcctggcatttctgccggagagctttgatggggaccagcctc
        |
Pro. 413 caagaagatctttgggagcctggcatttctgccggagagctttgatggggaccagcctc

Ref 1311 caaactgccccgctccagccagagcagctccaagtgtttgagactctggaagagatcac
        |
Pro. 353 caaactgccccgctccagccagagcagctccaagtgtttgagactctggaagagatcac
  
```

```

Ref 1371 aggttacctatacatctcagcatggccggacagcctgcctgacctcagcgtcttccagaa
         |||
Pro. 293 aggttacctatacatctcagcatggccggacagcctgcctgacctcagcgtcttccagaa

Ref 1431 cctgcaagtaatccgoggacgaattctgcacaatggcgcctactcgctgaccctgcaagg
         |||
Pro. 233 cctgcaagtaatccgoggacgaattctgcacaatggcgcctactcgctgaccctgcaagg

Ref 1491 gctgggcatcagctggctggggctgcgctcactgagggactgggcagtggactggccct
         |||
Pro. 173 gctgggcatcagctggctggggctgcgctcactgagggactgggcagtggactggccct

Ref 1551 catccaccataacaccca 1568
         |||
Pro. 113 catccaccataacaccca 96

```

Abbildung 5-5 Sequenzabgleich des klonierten erbB2-RT-PCR-Produkts (Pro) mit der Referenz-Sequenz der humanen erbB2-mRNA (NM\_004448.1). Das klonierte Produkt zeigte eine vollständige Übereinstimmung mit der erwarteten Sequenz

Die quantitative *Real-Time* PCR mit *SYBR-Green* zeigte für erbB2 einen medianen  $C_T$ -Wert von 27,1. Für GAPDH wurde ein medianer  $C_T$ -Wert von 19,5 bestimmt. Die erbB2-mRNA-Konzentration unterschied sich deutlich zwischen den Untersuchungsgruppen: Die qRT-PCR aus insuffizientem Myokard zeigte eine signifikant niedrigere relative Expression als im nicht insuffizienten Myokard. Zwischen der erbB2-RNA-Expression in DCM und ICM-Proben zeigte sich kein Unterschied. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-9 dargestellt.

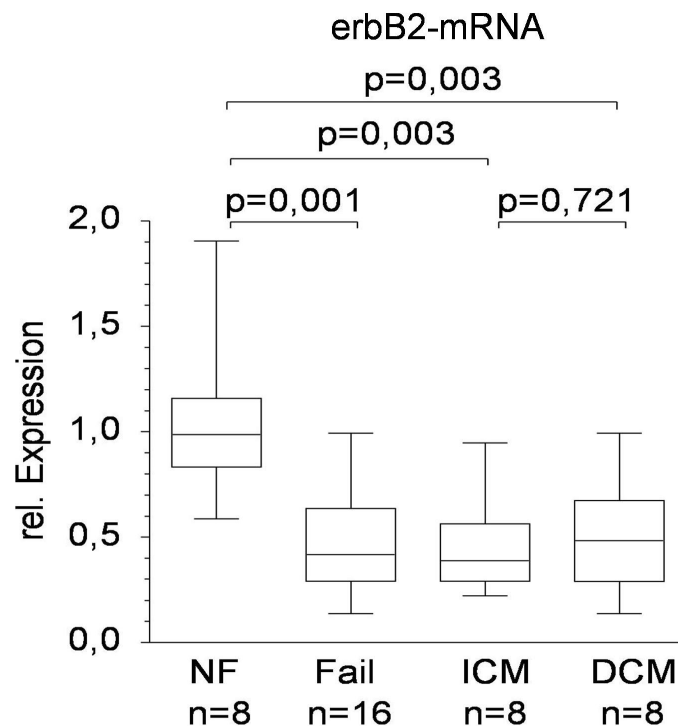


Abbildung 5-6: Darstellung der anhand der  $\Delta\Delta C_T$ -Werte ermittelten und auf die mittlere Expression in Normalgewebe normalisierte erbB2-mRNA-Expression. Dargestellt sind die 10., 25., 50. (Median), 75., und 90. Perzentile. In DCM und ICM-Proben zeigt sich eine deutliche Abnahme der Expression, die unabhängig von der Ätiologie der Herzinsuffizienz ist.

### 5.3 Herstatin

#### Nachweis und Quantifizierung der Herstatin-mRNA

Die *Primer* zur Amplifikation der Herstatin cDNA binden an die Positionen 737-754(Fw) und 1140-1159 (Rev) der mRNA (AF177761.2). Zwischen den *Primern* liegen auf dem erbB2-Gen zwei Introns mit einer Länge von 139 und 1447 Basen. Bei korrekter - von der cDNA ausgehender - Amplifikation ist demnach ein Produkt von 423 bp zu erwarten. Bei Amplifikation genomischer DNA wäre ein PCR-Produkt von mehr als 2000 bp zu erwarten. Die Lage der verwendeten *Primer* in Beziehung zur genomischen DNA und der mRNA ist in Abbildung 5-10 dargestellt.

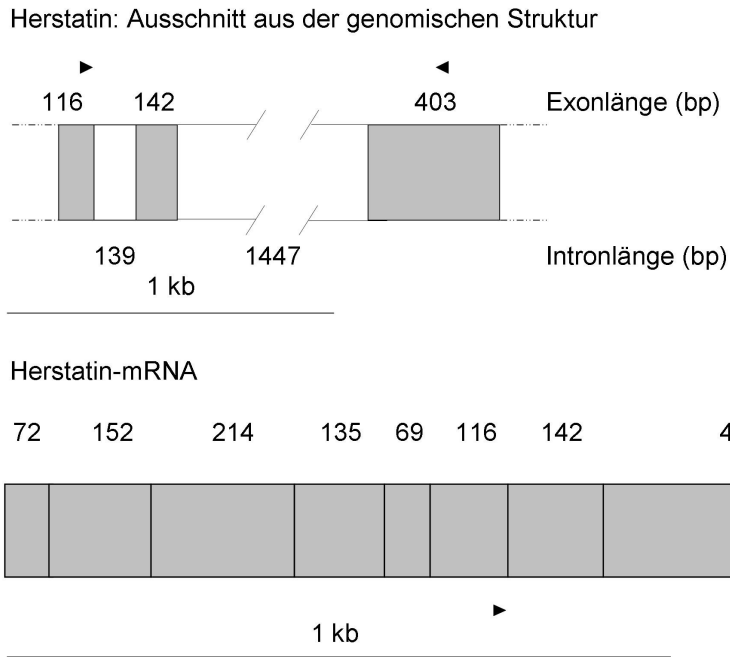


Abbildung 5-7: Darstellung eines Ausschnitts der Exon-Intronstruktur des Herstatin-Gens und der Struktur der mRNA von Herstatin. Die Länge der Exons bzw. Introns sind angegeben. Introns sind weiß, Exons grau unterlegt. Die Positionen der zur Amplifikation verwendeten *Primer* sind durch Dreiecke symbolisiert.

Die von der cDNA ausgehende PCR ergab ein Produkt der erwarteten Größe (Abb.5-11). Nebenprodukte, wie sie aus der Amplifikation der genomischen DNA entstanden sein könnten, wurden nicht beobachtet. Unspezifische andere PCR-Produkte wurden ebenfalls nicht beobachtet.

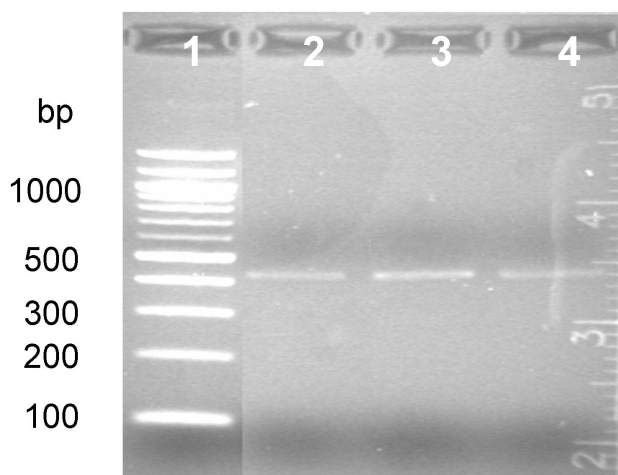


Abbildung 5-8: Gelelektrophorese der Produkte der Herstatin-RT-PCR. Spur 1: 100 bp DNA-Standard. Spur 2: Dilatative Kardiomyopathie; Spur 3: Ischämische Kardiomyopathie; Spur 4: nicht insuffizientes Myokard. In allen Myokardproben konnte ein RT-PCR-Signal der erwarteten Größe (423 bp) gefunden werden. Genomische DNA oder unspezifische PCR-Produkte wurden nicht amplifiziert.

Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR 2.1 Vektor kloniert und sequenziert. Der Abgleich mit der Referenzsequenz (AF177761.2) ergab eine Übereinstimmung des Amplifikats mit der erwarteten Sequenz von über 99% (Abb-5-12).

```

Ref 781 cacttcaaccacagtggcatctgtgagctgcaactgccagccctggtcacctacaacaca
      |
Pro. 510 cacttcaaccacagtggcatctgtgagctgcaactgccagccctggtcacctacaacaca

Ref 841 gacacgtttgagtccatgccaatccgagggccggtatacattcggcgccagctgtgtc
      |
Pro. 450 gacacgtttgagtccatgccaatccgagggccggtatacattcggcgccagctgtgtc

Ref 901 actgcctgtccctacaactacctttctacggacgtgggatcctgcaccctcgtctgcccc
      |
Pro. 390 actgcctgtccctacaactacctttctacggacgtgggatcctgcaccctcgtctgcccc

Ref 961 ctgcacaaccaagaggtgacagcagaggatggaacacagcgggtgtgagaagtgcagcaag
      |
Pro. 330 ctgcacaaccaagaggtgacagcagaggatggaacacagcgggtgtgagaagtgcagcaag

Ref 1021 ccctgtgcccgaggtaccactcactgcccccgaggccagctgcagttcctgtccctctg
      |
Pro. 270 ccctgtgcccgaggtaccactcactgcccccgaggccagctgcagttcctgtccctctg

Ref 1081 cgcatgcagcctggcccagcccaccctgtcctatccttcctcagaccctcttgggaccta
      |
Pro. 210 cgcatgcagcctggcccagcccaccctgtcctatccttcctcagaccctcttgggaccta

Ref 1141 gtctctgccttctactctctaccctggccc 1171
      |
Pro. 150 gtctctgccttctactctctaccctggccc 120

```

Abbildung 5-9 Sequenzabgleich des klonierten Herstatin-RT-PCR-Produkts (Pro) mit der Referenz-Sequenz der humanen Herstatin-mRNA (AF177761.2). Das klonierte Produkt zeigte eine über 99%ige Übereinstimmung mit der erwarteten Sequenz

Die quantitative *Real-Time* PCR mit *SYBR-Green* zeigte für Herstatin einen medianen  $C_T$ -Wert von 35,4. Für GAPDH wurde ein medianer  $C_T$ -Wert von 19,5 bestimmt. Die Herstatin mRNA Konzentration waren in insuffizienten und nicht insuffizienten Herzen nicht unterschiedlich. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-13 dargestellt.



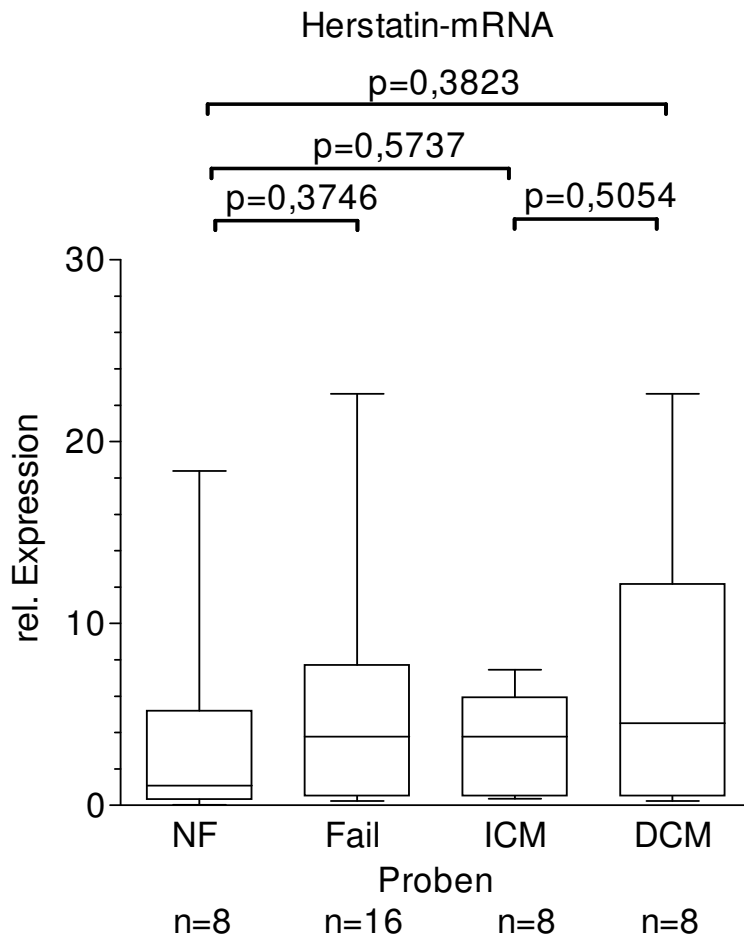


Abbildung 5-10: Grafische Darstellung der anhand der  $\Delta\Delta C_T$ -Werte ermittelten und auf die mittlere Expression in Normalgewebe normalisierte Herstatin-mRNA-Expression. Dargestellt sind die 10., 25., 50. (Median), 75., und 90. Perzentile. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in den untersuchten Gruppen. Allerdings zeigt sich ein nominal erhöhter Median der Herstatin-Expression im Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz.

#### 5.4 ErbB3-Rezeptor

##### Nachweis und Quantifizierung der erbB3-mRNA

Die *Primer* zur Amplifikation der ErbB3 cDNA binden an die Positionen 1151-1170 (Fw) und 1348-1369 (Rev) der mRNA (NM\_001982.1). Bei korrekter - von der cDNA ausgehender - Amplifikation ist demnach ein Produkt von 218 bp zu erwarten. Zwischen den *Primern* liegen auf dem erbB3-Gen zwei Introns mit einer Länge von 161 Basen und 263 Basen. Bei Amplifikation genomischer DNA wäre daher ein PCR-Produkt von 642 bp zu erwarten. Die Lage der verwendeten *Primer* in Beziehung zur genomischen DNA und der mRNA ist in Abbildung 5-14 dargestellt.

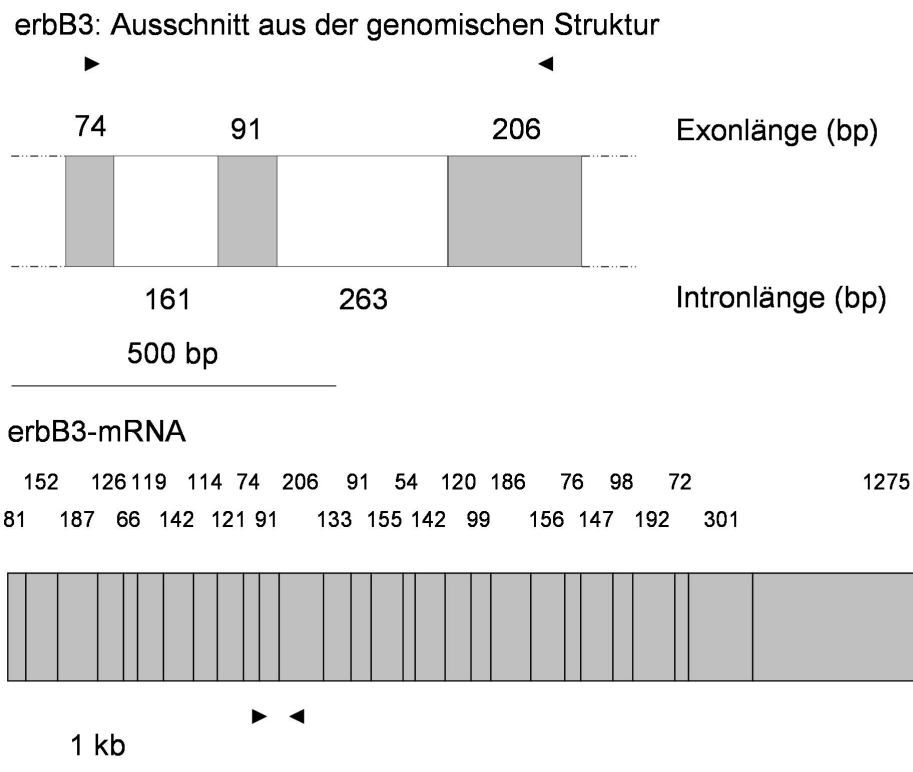


Abbildung 5-11 Darstellung eines Ausschnitts der Exon-Intronstruktur des erbB2 Gens und der Struktur der mRNA von erbB3. Die Länge der Exons bzw. Introns sind angegeben. Introns sind weiß, Exons grau unterlegt. Die Positionen der zur Amplifikation verwendeten *Primer* sind durch Dreiecke symbolisiert.

Die von der cDNA ausgehende PCR ergab ein Produkt der erwarteten Größe (Abb.5-15). Nebenprodukte, wie sie aus der Amplifikation der genomischen DNA entstanden sein könnten, wurden nicht beobachtet. Unspezifische andere PCR-Produkte wurden ebenfalls nicht beobachtet.

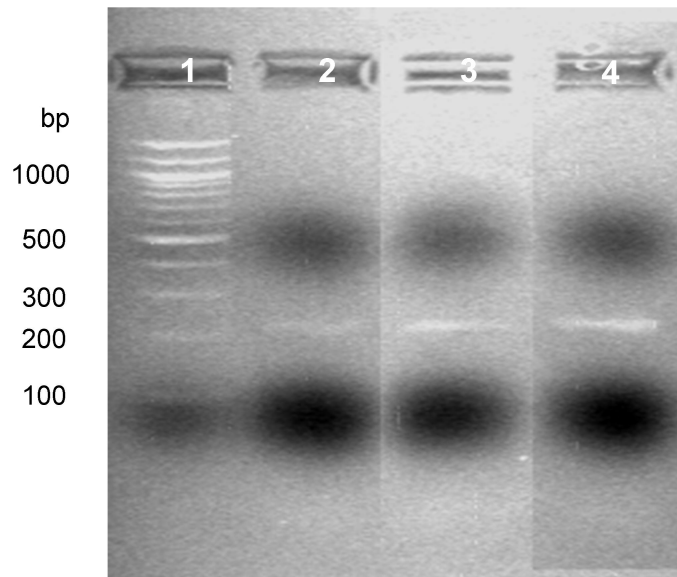


Abbildung 5-12 Gelelektrophorese der Produkte der erbB3-RT-PCR. Spur 1: 100 bp DNA-Standard. Spur 2: Dilatative Kardiomyopathie; Spur 3: Ischämische Kardiomyopathie; Spur 4: nicht insuffizientes Myokard. In allen Myokardproben konnte ein RT-PCR-Signal der erwarteten Größe (218 bp) gefunden werden. Genomische oder unspezifische PCR-Produkte wurden nicht amplifiziert.

Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR 2.1 Vektor kloniert und sequenziert. Der Abgleich mit der Referenzsequenz (NM\_001982.1) ergab eine vollständige Übereinstimmung des Amplifikats mit der erwarteten Sequenz.

```

Ref 1349 tcaatgtcttccggacagtacgggagatcacaggttacctgaacatccagtcctggccgc
          |||
Pro. 96 tcaatgtcttccggacagtacgggagatcacaggttacctgaacatccagtcctggccgc

Ref 1409 cccacatgcacaacttcagtgttttttccaatttgacaaccattggaggcagaagcctct
          |||
Pro. 156 cccacatgcacaacttcagtgttttttccaatttgacaaccattggaggcagaagcctct

Ref 1469 acaaccggggcttctcattgttgatcatgaagaacttgaatgtcacatctctgggcttcc
          |||
Pro. 216 acaaccggggcttctcattgttgatcatgaagaacttgaatgtcacatctctgggcttcc

Ref 1529 gatccctgaaggaaattagtgctgg 1553
          |||
Pro. 276 gatccctgaaggaaattagtgctgg 300

```

Abbildung 5-13 Sequenzabgleich des klonierten erbB3-RT-PCR-Produkts (Pro) mit der Referenz-Sequenz der humanen erbB3-mRNA (NM\_001982.1). Das klonierte Produkt zeigte eine vollständige Übereinstimmung mit der erwarteten Sequenz

Die quantitative *Real-Time* PCR mit *SYBR-Green* zeigte für *erbB3* einen medianen  $C_T$ -Wert von 33,0. Für *GAPDH* wurde ein medianer  $C_T$ -Wert von 19,5 bestimmt. Die *erbB3*-mRNA-Konzentration unterschied sich deutlich zwischen den Untersuchungsgruppen (Abb. 5-17): Sie war im insuffizienten Myokard signifikant niedriger als im Normalmyokard. Die *erbB3*-RNA-Expression in ICM-Proben war signifikant geringer als die *erbB3*-mRNA-Expression in den DCM Proben. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Normalmyokard und DCM-Proben gezeigt werden. Ein Vergleich der nicht insuffizienten Herzen mit den ICM-Proben zeigt eine hochsignifikant geringere Expression in ischämischen Kardiomyopathien.

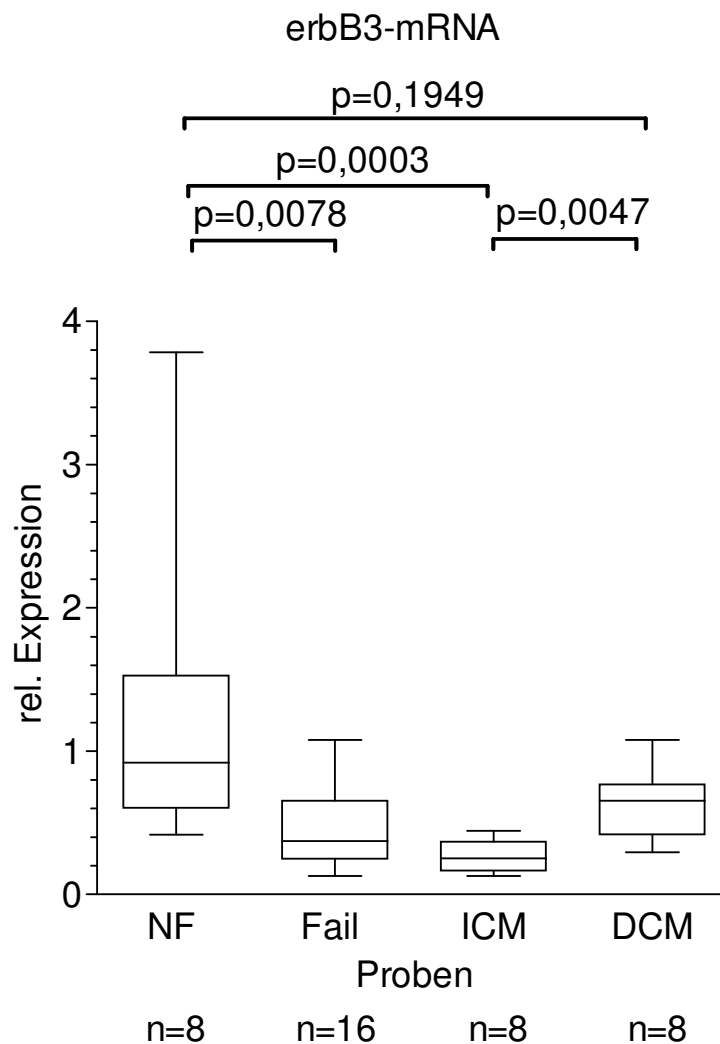


Abbildung 5-14 Grafische Darstellung der anhand der  $\Delta\Delta C_T$ -Werte ermittelten und auf die mittlere Expression in Normalgewebe normalisierte *erbB3*-mRNA-Expression Dargestellt sind die 10., 25., 50. (Median), 75., und 90. Perzentile. In Failing und ICM-Proben zeigt sich eine deutliche Abnahme der Expression.

## 5.5 ErbB4-Rezeptor

### Nachweis und Quantifizierung der erbB4-mRNA

Die *Primer* zur Amplifikation der erbB4-cDNA binden an die Positionen 981-1000 (Fw) und 1400-1418 (Rev) der mRNA (Referenz: NM\_005235.1). Bei korrekter - von der cDNA ausgehender - Amplifikation ist demnach ein Produkt von 202 bp zu erwarten. Zwischen den *Primern* liegen im erbB4-Gen zwei Introns mit einer Länge von 2051 Basen und 1396 Basen. Bei Amplifikation genomischer DNA wäre daher ein PCR-Produkt von mehr als 3500 bp zu erwarten. Die Lage der verwendeten *Primer* in Beziehung zur genomischen DNA und der mRNA ist in Abbildung 5-18 dargestellt.

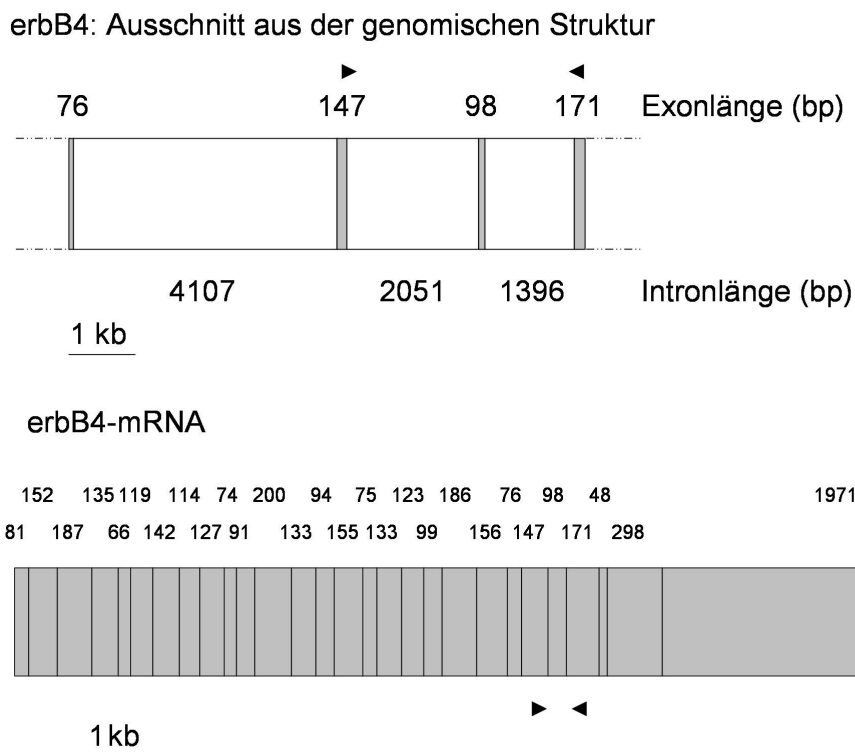


Abbildung 5-15: Darstellung eines Ausschnitts der Exon-Intronstruktur des erbB4-Gens und der Struktur der mRNA von erbB4. Die Länge der Exons bzw. Introns sind angegeben. Introns sind weiß, Exons grau unterlegt. Die Positionen der zur Amplifikation verwendeten *Primer* sind durch Dreiecke symbolisiert.

Die von der cDNA ausgehende PCR ergab ein Produkt der erwarteten Größe (Abb.5-19). Nebenprodukte, wie sie aus der Amplifikation der genomischen DNA entstanden sein könnten, wurden nicht beobachtet. Unspezifische andere PCR-Produkte wurden ebenfalls nicht beobachtet.

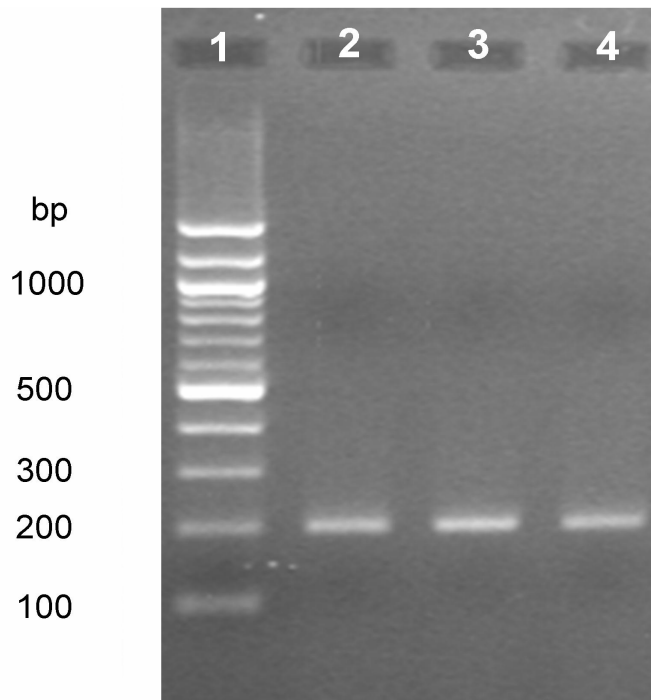


Abbildung 5-16: Gelelektrophorese der Produkte der erbB4-RT-PCR. Spur 1: 100 bp DNA-Standard. Spur 2: Dilatative Kardiomyopathie; Spur 3: Ischämische Kardiomyopathie; Spur 4: nicht insuffizientes Myokard. In allen Myokardproben konnte ein RT-PCR-Signal der erwarteten Größe (202 bp) gefunden werden. Genomische oder unspezifische PCR-Produkte wurden nicht amplifiziert.

Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR 2.1 Vektor kloniert und sequenziert. Der Abgleich mit der Referenzsequenz (NM\_005235.1) ergab eine vollständige Übereinstimmung des Amplifikats mit der erwarteten Sequenz.

```

Ref 2879  tttacatggtcatggtcaaagtgttgatgattgatgctgacagtagacctaatttaagg
          |
Pro. 299  tttacatggtcatggtcaaagtgttgatgattgatgctgacagtagacctaatttaagg

Ref 2939  aactggctgctgagttttcaaggatggctcgagaccctcaaagatacctagttattcagg
          |
Pro. 239  aactggctgctgagttttcaaggatggctcgagaccctcaaagatacctagttattcagg

Ref 2999  gtgatgatcgtatgaagcttcccagtcctcaaatgacagcaagttctttcagaatctcttgg
          |
Pro. 179  gtgatgatcgtatgaagcttcccagtcctcaaatgacagcaagttctttcagaatctcttgg

Ref 3059  atgaagaggatttgggaagatatga 3082
          |
Pro. 119  atgaagaggatttgggaagatatga 96

```

Abbildung 5-17 Sequenzabgleich des klonierten erbB4-RT-PCR-Produkts (Pro) mit der Referenz-Sequenz der humanen erbB4-mRNA (NM\_005235.1). Das klonierte Produkt zeigte eine vollständige Übereinstimmung mit der erwarteten Sequenz

Die quantitative *Real-Time* PCR mit *SYBR-Green* zeigte für *erbB4* einen medianen  $C_T$ -Wert von 28,1. Für GAPDH wurde ein medianer  $C_T$ -Wert von 19,5 bestimmt. Die *erbB4*-mRNA-Konzentration unterschied sich deutlich zwischen den Untersuchungsgruppen (Abb. 5-21): Sie war im insuffizienten Myokard deutlich niedriger als im Normalmyokard. Zwischen der *erbB4*-RNA-Expression in DCM und ICM-Proben fand sich kein Unterschied. Die relative Expression in den DCM-Proben war nicht signifikant geringer als in den nicht insuffizienten Herzen, wengleich der Median auf der gleichen Höhe wie der Median der ICM-Proben zu liegen kommt.

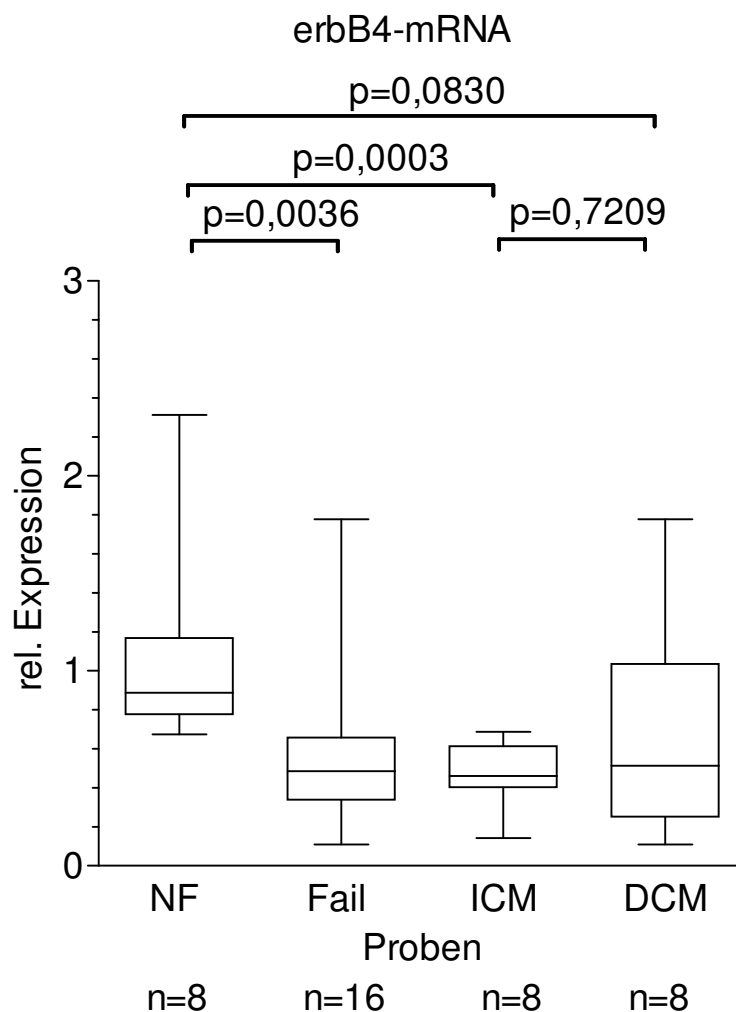


Abbildung 5-18 Grafische Darstellung der anhand der  $\Delta\Delta C_T$ -Werte ermittelten und auf die mittlere Expression in Normalgewebe normalisierte *erbB4*-mRNA-Expression. Dargestellt sind die 10., 25., 50. (Median), 75., und 90. Perzentile. In Failing und ICM-Proben zeigt sich eine deutliche Abnahme der Expression.

## 5.6 Neuregulin-1- $\alpha$

### Nachweis und Quantifizierung der Neuregulin-1- $\alpha$ -mRNA

Die *Primer* zur Amplifikation der Neuregulin-1- $\alpha$ -cDNA binden an die Positionen 544-561(Fw) und 666-685 (Rev) der mRNA (Referenz: NM\_013964). Bei korrekter - von der cDNA ausgehender - Amplifikation ist demnach ein Produkt von 142 bp zu erwarten. Zwischen den *Primern* liegt im Neuregulin-1- $\alpha$ -Gen ein Intron mit einer Länge von 13930 Basen. Bei Amplifikation genomischer DNA wäre daher ein PCR-Produkt von mehr als 14000 bp zu erwarten. Die Lage der verwendeten *Primer* in Beziehung zur genomischen DNA und der mRNA ist in Abbildung 5-22 dargestellt.

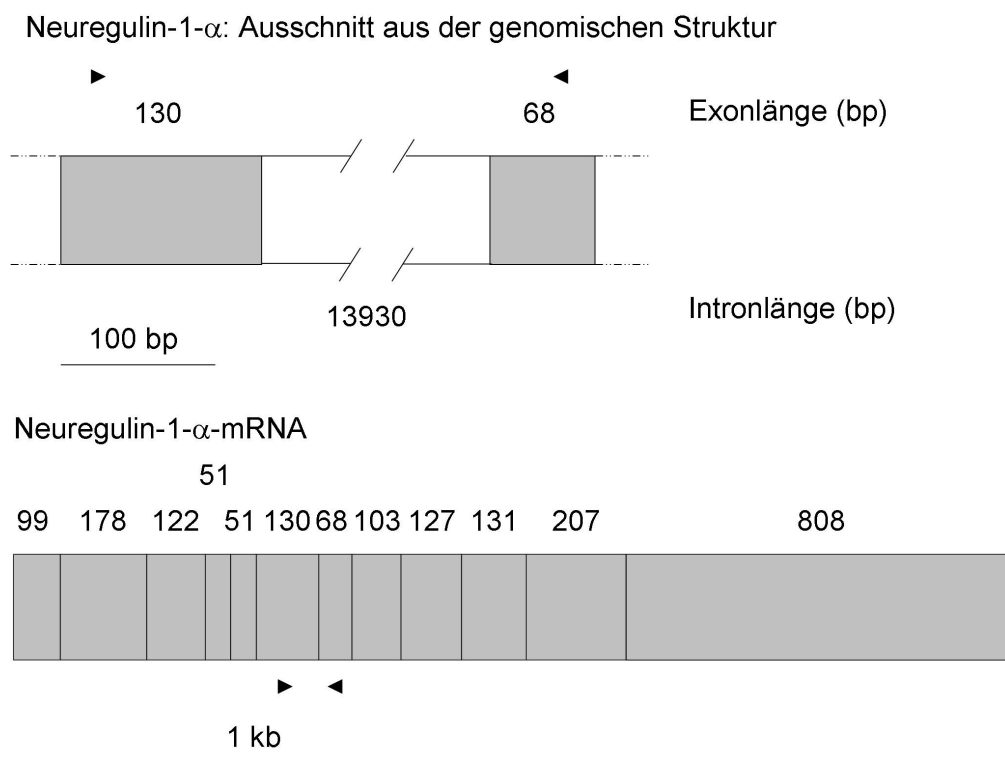


Abbildung 5-19: Darstellung eines Ausschnitts der Exon-Intronstruktur des Neuregulin-1- $\alpha$ -Gens und der Struktur der mRNA von Neuregulin-1- $\alpha$ . Die Länge der Exons bzw. Introns sind angegeben. Introns sind weiß, Exons grau unterlegt. Die Positionen der zur Amplifikation verwendeten *Primer* sind durch Dreiecke symbolisiert.

Die von der cDNA ausgehende PCR ergab ein Produkt der erwarteten Größe (Abb.5-23). Nebenprodukte, wie sie aus der Amplifikation der genomischen DNA entstanden sein könnten, wurden nicht beobachtet. Unspezifische andere PCR-Produkte wurden ebenfalls nicht beobachtet.



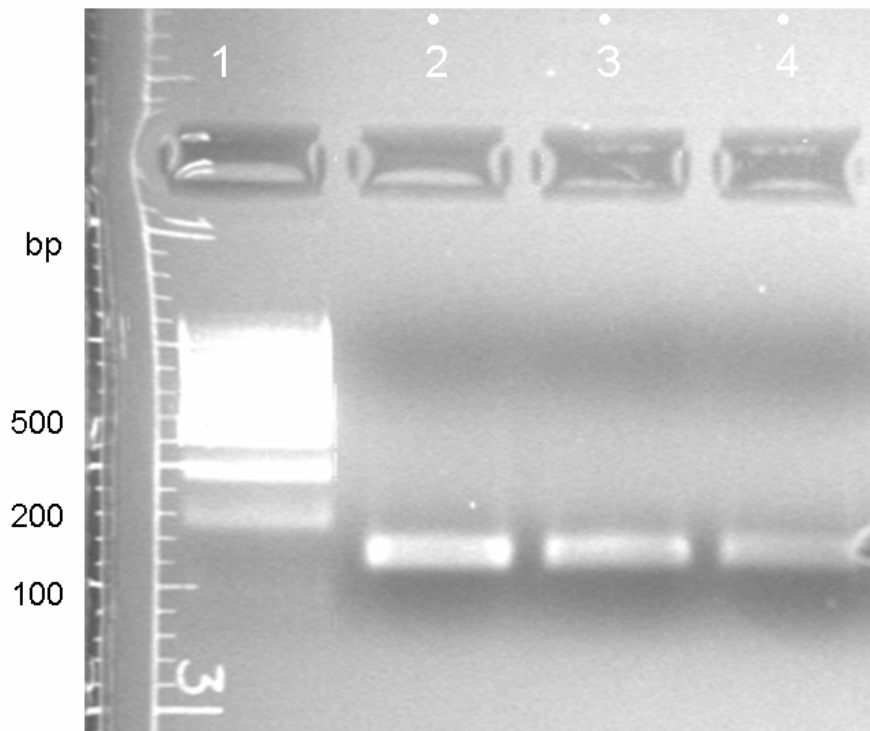


Abbildung 5-20: Gelelektrophorese der Produkte der Neuregulin-1- $\alpha$ -RT-PCR. Spur 1: 100 bp DNA-Standard; Spur 2: Dilatative Kardiomyopathie; Spur 3: Ischämische Kardiomyopathie Spur 4: *Nonfailing*. In allen Myokardproben konnte ein RT-PCR-Signal der erwarteten Größe (142 bp) gefunden werden. Genomische oder unspezifische PCR-Produkte wurden nicht amplifiziert.

Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR 2.1 Vektor kloniert und sequenziert. Der Abgleich mit der Referenzsequenz (NM\_013964) ergab eine vollständige Übereinstimmung des Amplifikats mit der erwarteten Sequenz.

```

Ref 676 tgtgCGgagaaggagaaaactttctgtgtgaatggaggggagtgcttcatggtgaaagac
      |
Pro. 276 tgtgCGgagaaggagnaaactttctgtgtgaatggaggggagtgcttcatggtgaaagac

Ref 736 ctttcaaaccctcgagataacttgtgcaagtGCCaacctggattcactggagcaagatgt
      |
Pro. 216 ctttcaaaccctcgagataacttgtgcaagtGCCaacctggattcactggagcaagatgt

Ref 796 actga 800
      |||||
Pro. 156 actga 152

```

Abbildung 5-21 Sequenzabgleich des klonierten nrg1 $\alpha$ -RT-PCR-Produkts (Pro) mit der Referenz-Sequenz der humanen nrg1 $\alpha$ -mRNA (NM\_013964). Das klonierte Produkt zeigte eine vollständige Übereinstimmung mit der erwarteten Sequenz

Die quantitative *Real-Time* PCR mit *SYBR-Green* zeigte für Neuregulin-1- $\alpha$  einen medianen  $C_T$ -Wert von 29,7. Für GAPDH wurde ein medianer  $C_T$ -Wert von 19,5 bestimmt. Die Neuregulin-1- $\alpha$ -mRNA-Konzentration unterschied sich deutlich zwischen den Untersuchungsgruppen (Abb. 5-25): Sie war im insuffizienten Myokard signifikant höher als im Normalmyokard. Zwischen der Neuregulin-1- $\alpha$ -mRNA-Expression in DCM und ICM-Proben fand sich kein Unterschied. Es konnte keine signifikant höhere Expression in ICM-Proben gegenüber nicht insuffizienten Herzen gemessen werden, wengleich der Median der ICM Proben etwa auf Höhe des Medians der *Failing*-Proben zu liegen kommt.

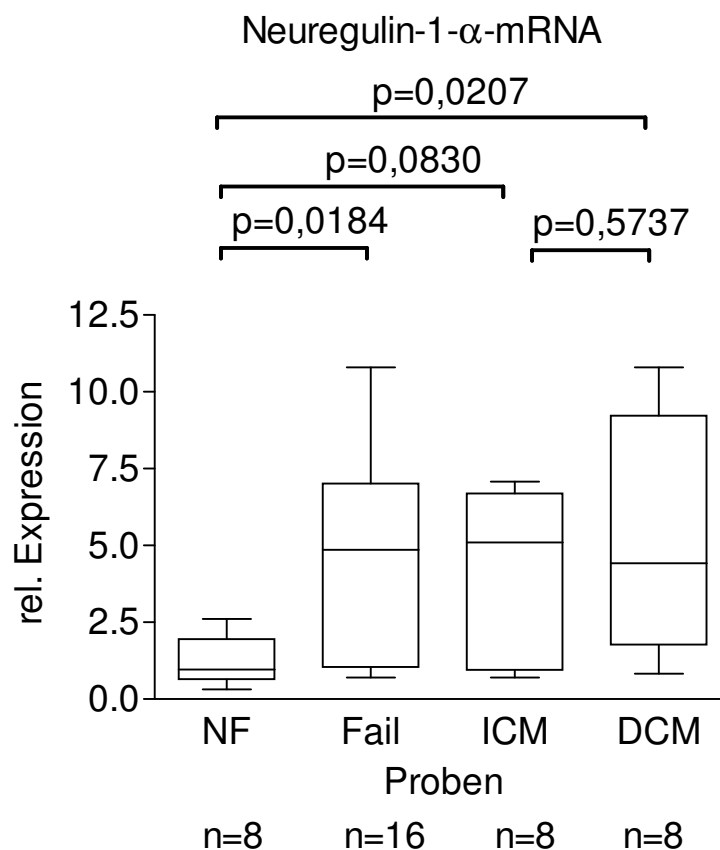


Abbildung 5-22: Grafische Darstellung der anhand der  $\Delta\Delta C_T$ -Werte ermittelten und auf die mittlere Expression in Normalgewebe normalisierte Neuregulin-1- $\alpha$ -mRNA-Expression. Dargestellt sind die 10., 25., 50. (Median), 75., und 90. Perzentile. In Failing und DCM-Proben zeigt sich eine deutliche Zunahme der Expression.

## 5.7 Neuregulin-1-β

### Nachweis und Quantifizierung der Neuregulin-1-β -mRNA

Die *Primer* zur Amplifikation der Neuregulin-1-β-cDNA binden an die Positionen 544-561(Fw) und 664-684 (Rev) der mRNA (NM\_013956). Zwischen den *Primern* liegt auf dem nrg1-Gen ein Intron von 13930 Basenpaaren. Bei korrekter - von der cDNA ausgehender - Amplifikation ist demnach ein Produkt von 141 bp zu erwarten.

Bei Amplifikation genomischer DNA wäre daher ein PCR-Produkt von mehr als 13000 bp zu erwarten. Die Lage der verwendeten *Primer* in Beziehung zur genomischen DNA und der mRNA ist in Abbildung 5-26 dargestellt.

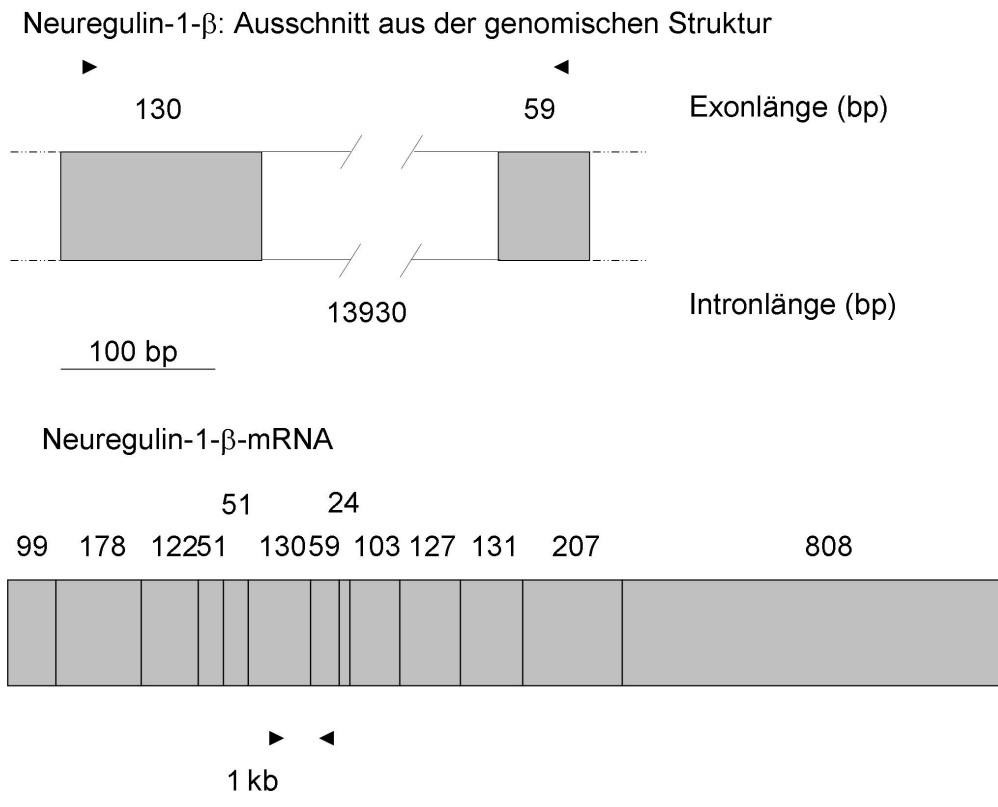


Abbildung 5-23: Darstellung eines Ausschnitts der Exon-Intronstruktur des Neuregulin-1-β-Gens und der Struktur der mRNA von Neuregulin-1-β. Die Länge der Exons bzw. Introns sind angegeben. Introns sind weiß, Exons grau unterlegt. Die Positionen der zur Amplifikation verwendeten *Primer* sind durch Dreiecke symbolisiert.

Die von der cDNA ausgehende PCR ergab ein Produkt der erwarteten Größe (Abb.5-27). Nebenprodukte, wie sie aus der Amplifikation der genomischen DNA entstanden sein könnten, wurden nicht beobachtet. Unspezifische andere PCR-Produkte wurden ebenfalls nicht beobachtet.

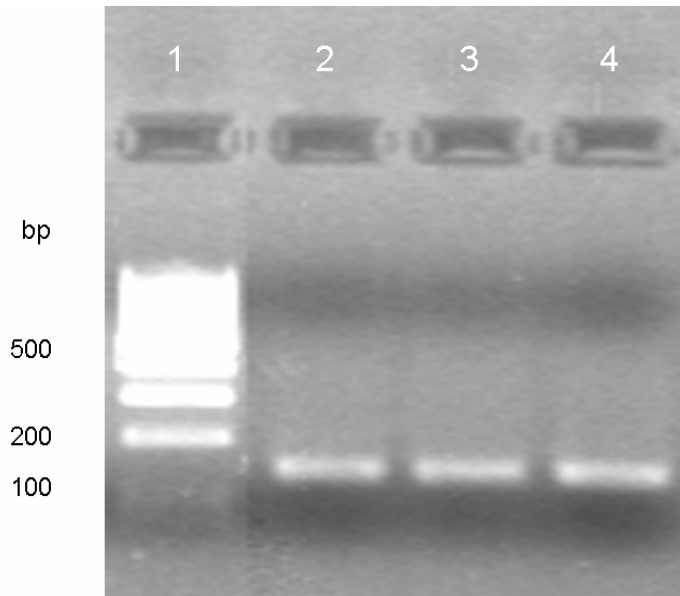


Abbildung 5-24: Gelelektrophorese der Produkte der Neuregulin-1- $\beta$ -RT-PCR. Spur 1: 100 bp DNA-Standard; Spur 2: Dilatative Kardiomyopathie; Spur 3: Ischämische Kardiomyopathie Spur 4: *Nonfailing*. In allen Myokardproben konnte ein RT-PCR Signal der erwarteten Größe (141 bp) gefunden werden. Genomische oder unspezifische PCR-Produkte wurden nicht amplifiziert.

Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR 2.1 Vektor kloniert und sequenziert. Der Abgleich mit der Referenzsequenz (NM\_013956) ergab eine vollständige Übereinstimmung des Amplifikats mit der erwarteten Sequenz.

```

Ref 636 tgtgCGGagaaggagaaaactttctgtgtgaatggaggggagtgcttcatggtgaaagac
      |
Pro. 261 tgtgCGGagaaggagaaaactttctgtgtgaatggaggggagtgcttcatggtgaaagac

Ref 696 ctttcaaaccctcgagataacttgtgcaagtGCCCAATgagtttactggtgatcgctgc
      |
Pro. 201 ctttcaaaccctcgagataacttgtgcaagtGCCCAATgagtttactggtgatcgctgc

Ref 756 caaaactacgta 767
      |
Pro. 141 caaaactacgta 130
  
```

Abbildung 5-25 Sequenzabgleich des klonierten nrg1 $\beta$ -RT-PCR-Produkts (Pro) mit der Referenz-Sequenz der humanen nrg1 $\beta$ -mRNA (NM\_013956). Das klonierte Produkt zeigte eine vollständige Übereinstimmung mit der erwarteten Sequenz

Die quantitative *Real-Time-PCR* mit *SYBR-Green* zeigte für Neuregulin-1- $\beta$  einen medianen  $C_T$ -Wert von 34,4. Für GAPDH wurde ein medianer  $C_T$ -Wert von 19,5 bestimmt. Die Neuregulin-1- $\beta$ -mRNA-Konzentration unterschied sich deutlich zwischen den Untersuchungsgruppen (Abb. 5-29): Sie war im insuffizienten Myokard signifikant höher als im Normalmyokard unabhängig von der Genese der Herzinsuffizienz. Zwischen der Neuregulin-1- $\beta$ -mRNA-Expression in DCM und ICM-Proben fand sich kein Unterschied. Es konnten keine signifikant höhere Expression in ICM-Proben gegenüber nicht insuffizienten Herzen gemessen werden.

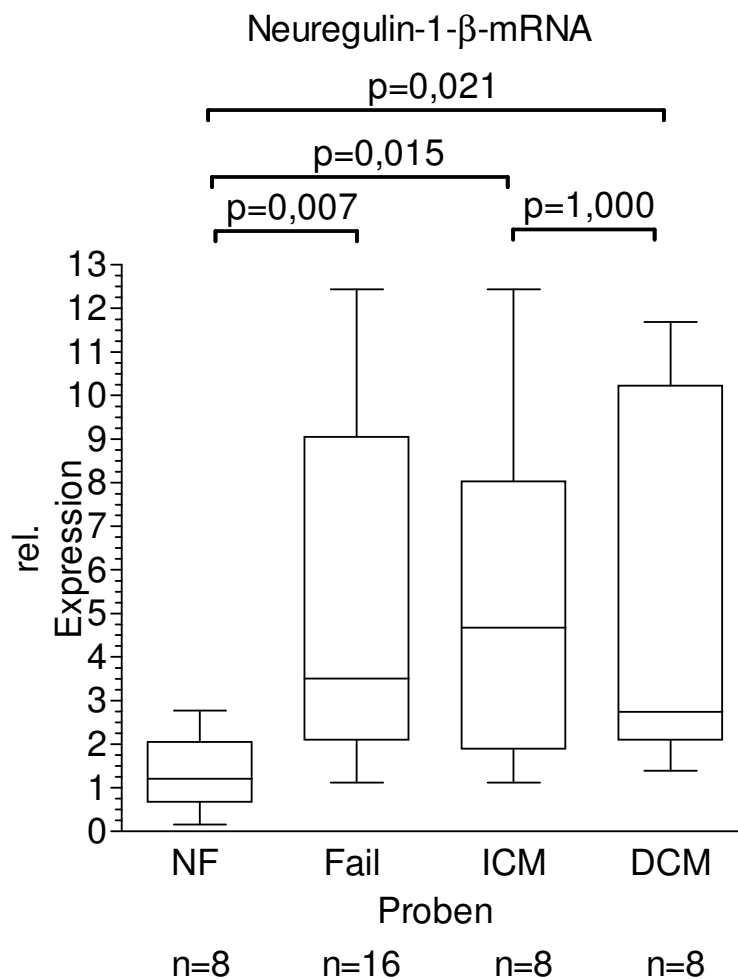


Abbildung 5-26: Grafische Darstellung der anhand der  $\Delta\Delta C_T$ -Werte ermittelten und auf die mittlere Expression in Normalgewebe normalisierte Neuregulin-1- $\beta$ -mRNA-Expression. Dargestellt sind die 10., 25., 50. (Median), 75., und 90. Perzentile. In insuffizienten Herzen zeigt sich eine deutliche Zunahme der Expression unabhängig von der Genese der Herzinsuffizienz.

## 6 Diskussion

### 6.1 Expression von ErbB-Rezeptoren und Neuregulinen im Myokard des Erwachsenen

Die vorliegende Arbeit untersuchte die mRNA Expression mehrerer Rezeptor-Tyrosinkinasen der erbB-Familie, nämlich von erbB1 (EGF-R), erbB2 sowie erbB3 und erbB4 im Myokard des Menschen. Auch die Expression einer Gruppe von Liganden an diesen Rezeptoren, nämlich von Transkripten des nrg-1-Gens wurde untersucht.

Hintergrund der Fragestellungen waren zahlreiche tierexperimentelle Befunde, die auf eine wesentliche Rolle dieser Rezeptor-Tyrosinkinasen und ihrer Liganden sowohl für die kardiale Embryogenese als auch für die Physiologie und Pathophysiologie des Myokards hinweisen. Hauptanstoß für die vorliegenden Untersuchungen war die Nebenwirkung des humanisierten monoklonalen Antikörpers Trastuzumab (Herceptin®), der bei Patientinnen mit Mammakarzinom zum Auftreten einer Herzinsuffizienz geführt hat (Slamon et al. 2001). Insbesondere Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom, die mit kardiotoxischen Chemotherapeutika in Kombination mit Trastuzumab behandelt wurden, entwickelten diese unerwünschte Arzneimittelwirkung, mit deren Auftreten im Vorwege nicht gerechnet worden war.

Ziel war es zunächst festzustellen, ob Transkripte dieser Gene im Myokard des Erwachsenen überhaupt nachweisbar sind. Als Methode zum Nachweis diente eine *Realtime*-PCR unter Verwendung des Doppelstrang-spezifischen Farbstoffs *SYBR-Green I*. Die *Primer* wurden so gewählt, dass sie in unterschiedlichen Exons hybridisieren, die durch große Introns voneinander getrennt waren. Durch dieses Vorgehen konnte die Amplifikation kontaminierender genomischer DNA verhindert werden. Alle entstehenden PCR-Produkte wurden zur Bestätigung der korrekten Amplifikation kloniert und sequenziert.

Es zeigte sich, dass alle untersuchten ErbB-Rezeptoren sowie die Neuregulin-Isoformen 1- $\alpha$  und 1- $\beta$  im Myokard von Erwachsenen exprimiert werden. Die durch quantitative *Real-time* PCR ermittelten  $C_T$ -Werte sind in Tabelle 6-1 zusammengefasst:

Gen	GAPDH	EGF-R	erbB2	Herstatin	erbB3	erbB4	nrg1 $\alpha$	nrg1 $\beta$
$C_T$ -Werte	19,5	25,7	27,1	35,4	33	28,1	29,7	34,4

Tabelle 6-1: Darstellung der gemessenen  $C_T$ -Werte in nicht insuffizienten Herzen.

Die Expressions-Niveaus der nachgewiesenen Gene unterschieden sich deutlich voneinander. So wurden bei der RT-PCR von erbB2  $C_T$ -Werte in der Größenordnung

von mittelabundant bis abundant exprimierten Genen gefunden. Demgegenüber konnte die Expression von erbB3 erst bei  $C_T$ -Werten von 33 nachgewiesen werden, was – unter der Annahme einer ähnlich effizienten reversen Transkription und Amplifikation – auf eine etwa 50-fach stärkere Expression von erbB2 hinweist. Durch die Verwendung von Isotyp-spezifischen *Primern* konnten auch die mRNA von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Formen der nrg1-Familie nachgewiesen werden. Dabei sind  $\alpha$ -Neureguline im Myokard stärker exprimiert als  $\beta$ -Neureguline.

Die in dieser Arbeit verwendete Technik mit SYBR-Green bedarf stets einer kritischen Evaluation der Untersuchungsergebnisse. Bei unspezifischer Amplifikation kann ein Signal erhalten werden, das anhand der Amplifikationskurven nicht sicher als fehlerhaft erkannt werden kann. Daher wurde besonderes Augenmerk auf die Wahl der Primer gelegt und die Produkte der RT-PCR exemplarisch durch Gelelektrophorese untersucht. Das absolute Ausmaß der Unterschiede lässt sich durch die verwendete relative Nachweismethode nicht bestimmen.

## 6.2 Regulation von ErbB-Rezeptoren und Neuregulinen in der Herzinsuffizienz

Hauptaugenmerk war es, Expressionsunterschiede im Myokard herzinsuffizienter Patienten und nicht-insuffizienter Spender zu untersuchen. Das Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz zeigte deutliche Unterschiede im Vergleich zu den Proben von nicht-insuffizienten Spenderherzen für einige der nachgewiesenen Gene. Es konnte festgestellt werden, dass die Expression der mRNA von erbB2, erbB3 und erbB4 im Myokard herzinsuffizienter Patienten signifikant vermindert ist. Die mRNA-Expression war dabei für die genannten Rezeptor-Tyrosinkinasen um etwa 50% reduziert. Demgegenüber wurde keine Veränderung in der Expression des EGF-Rezeptors (erbB1) beobachtet. Die Befunde sind in der Tabelle 6-2 schematisch zusammen gefasst.

	Gewebe		
	Herzinsuffizienz Gesamt	ICM	DCM
EGF-R	±	±	± <sup>a</sup>
erbB2	↓↓ <sup>**</sup>	↓↓ <sup>**</sup>	↓↓ <sup>**</sup>
Herstatin	±	±	±
erbB3	↓↓ <sup>**</sup>	↓↓ <sup>**</sup>	↓ <sup>b</sup>
erbB4	↓↓ <sup>**</sup>	↓↓ <sup>**</sup>	↓ <sup>#</sup>
nrg1α	↑↑ <sup>*</sup>	↑ <sup>a</sup>	↑↑ <sup>*</sup>
nrg1β	↑↑ <sup>**</sup>	↑↑ <sup>*</sup>	↑↑ <sup>*</sup>

Tabelle 6-2: Tabellarische Übersicht der mRNA-Expressionsunterschiede in Myokardproben von terminal herzinsuffizienten Patienten im Vergleich zur Expression im Myokard nicht herzinsuffizienter Spender. (<sup>a</sup> nicht signifikant erhöht, <sup>b</sup> nicht signifikant erniedrigt; \* p<0,05; \*\* p<0,01).

Die beobachteten Expressionsunterschiede der ErbB-Rezeptoren sind konsistent mit der Arbeit von Rohrbach et al. 2005, die während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit publiziert wurden. Diese Untersuchung stellt die einzige andere Studie zur Expression der erbB-Tyrosinkinase und der Neureguline Typ1 im menschlichen Herzen dar. Auch in dieser Untersuchung wurden erbB2- und erbB4-mRNAs in insuffizientem Myokard in geringerer Konzentration nachgewiesen als in Proben nicht-insuffizienter Spenderherzen. In der Arbeit von Rohrbach wurden Northern-Blots zur Untersuchung der mRNA-Expression verwendet. Die Befunde der in dieser Arbeit verwendeten Technik decken sich also qualitativ mit den Befunden die mit einer anderen Technik erhoben wurden, was die Robustheit der Befunde untermauert. In der Arbeit von Rohrbach wurde auf mRNA-Ebene für erbB2 und erbB4 eine Verminderung um ca. 50% in insuffizienten Myokardproben gemessen, was sich gut mit der in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen deckt. Der EGF-Rezeptor und erbB3 wurden in der genannten Arbeit nicht untersucht.



Diese Befunde der Verminderung der erbB2- und erbB4-Expression in der Myokardinsuffizienz des Menschen stimmen gut mit tierexperimentellen Befunden zur Veränderung der Expression von erbB2 durch partielle Aortenligatur bei Ratten überein (Rohrbach et al. 1999). Die Experimente zeigten eine mit der Zeit nach der Ligatur zunehmende Verminderung der erbB2-Expression.

Die Arbeit von Rohrbach geht hinsichtlich der Analyse der Expression über die vorliegende Arbeit hinaus, da auch die Proteinexpression von erbB2 und erbB4 untersucht wurde. Trotz zahlreicher Versuche mit unterschiedlichen Antikörpern gelang es in der vorliegenden Arbeit nicht, durch Westernblot den Nachweis einer Expression der genannten Rezeptortyrosinkinasen auf Proteinebene beim Menschen zu führen. Diese Daten stehen in Widerspruch zu den Befunden von Rohrbach et al, die nicht nur eine parallele Verminderung der Proteinexpression von ErbB2 und ErbB4 im Myokard herzinsuffizienter Patienten, sondern auch eine verminderten Phosphorylierungsgrad der Rezeptoren nahe legen. Allerdings konnte auch bei der immunhistochemischen Analyse von menschlichem Myokardgewebe bislang kein eindeutiger Nachweis einer Expression geführt werde (Fuchs et al. 2003). Auch in den anderen tierexperimentellen Arbeiten ist in der Regel eine Immunpräzipitation mit nachfolgendem Westernblot notwendig, um das Protein nachzuweisen (Kuramochi et al. 2004; Sawyer et al. 2002).

Die Arbeit von Rohrbach zeigt ebenfalls eine vermehrte Expression von Neuregulin-1 in insuffizientem Myokard (ca. 2-fach). Wir beobachteten demgegenüber mediane 4 bis 5-fach höhere Expressionsniveaus in den insuffizienten Myokardproben, die eine deutliche Streuung aufwiesen. Die abgebildeten Northern-Blots der Arbeit von Rohrbach legen stärkere Unterschiede nahe, als dies die zusammenfassende Statistik widerspiegelt. Die densitometrische Analyse von Röntgenfilmen kann durch den Schwarzschildeffekt Unterschiede unterschätzen. Hier bietet die Real-Time PCR Methodik nach den vorliegenden Erfahrungen vermutlich präzisere Ergebnisse – insbesondere wenn die Expressionsunterschiede sehr deutlich sind, wie dies im Fall der Neuregulin-Expression der Fall ist. Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit zeigen die Northern-Blots erhebliche Schwankungen in der Signalintensität der Proben von Patienten mit Herzinsuffizienz.

Die Analyse der Neuregulin-1-Protein-Expression wird durch die zahlreichen existierenden Splice-Varianten kompliziert, so dass zur Frage der Höhe der Proteinexpression in menschlichem Myokard derzeit keine Informationen vorliegen. In kultivierten mikrovaskulären Endothelzellen (*CMEC*) der Ratte wurden verschiedene Splicevarianten nachgewiesen, wobei Transkripte, die eine Kringle-Domäne oder

einen cysteinreichen N-Terminus aufweisen, in kultivierten *CMEC* nicht nachweisbar waren (Cote et al. 2005).

### 6.3 Pathophysiologie

Die molekularen Ursachen und Konsequenzen der verminderten mRNA Expression von erbB2, erbB3 und erbB4 in Myokardgewebe von Patienten mit Herzinsuffizienz sind nicht bekannt. Es liegen keine Informationen zur Aktivität der Promotoren in Kardiomyozyten und ihrer Regulation vor. Denkbar wären in diesem Zusammenhang einerseits Effekte, die von der Stimulation der Rezeptoren durch die erhöhte Ligandenkonzentration ausgehen. Dieser Mechanismus wäre also als negativer Feedback-Mechanismus zu interpretieren, der dann durch Veränderung der Promoter-Aktivität oder der mRNA-Halbwertszeit zu den beobachteten Konzentrationsunterschieden führen könnte. Andererseits könnte die Verminderung der Expression der mRNAs der Tyrosinkinasen von erbB2, erbB3 und erbB4 auch durch andere Mechanismen wie z.B. die erheblich gesteigerte adrenerge Stimulation der Kardiomyozyten bei Herzinsuffizienz bedingt sein.

Auf Proteinebene wurde eine Modulation der ErbB2-Proteinstabilität durch eine Interaktion mit Hsp90 beschrieben. Dabei kann beispielsweise durch eine Verarmung der Zellen an ATP eine Destabilisierung des ErbB2/HSP-90 Komplexes auslösen (Peng et al. 2005). Dieser Mechanismus könnte also zusätzlich zur Verminderung der mRNA-Expression zu einer Erniedrigung der Proteinexpression beitragen. In Übereinstimmung mit dieser postulierten Funktion von HSP-90 als Stabilisator des ErbB2-proteins, kam es in einem Modellsystem der Doxorubicin-Kardiotoxizität bei Ratten zu einer Zunahme der Apoptose, wenn die Funktion von HSP90 pharmakologisch gehemmt wurde. Unter der Gabe von Doxorubicin wurde in diesem Modellsystem keine Veränderung der erbB2 mRNA-Expression beobachtet, sondern im Unterschied zu den anderen bislang geschilderten Modellen eine Zunahme der ErbB2-Expression auf Proteinebene. Parallel und ebenfalls abhängig von der Doxorubicin-Dosis nahm in den behandelten Ratten die HSP-90 Expression zu (Gabrielson et al. 2007). Wenn nun die HSP-90-Funktion in vitro pharmakologisch in der Anwesenheit von Doxorubicin gehemmt wurde, kam es zu einer signifikanten Zunahme der Apoptose der kultivierten Rattenkardiomyozyten. Zusammengefasst kann die erbB2-Expression sowohl durch transkriptionelle Prozesse als auch durch Modulation der Proteinkonzentration durch HSP90-Interaktionen beeinflusst werden.

Auch für die Modulation der Neuregulin-Expression durch pathophysiologische Stimuli liegen bislang nur wenige Befunde vor. Zu den Stimuli, die eine vermehrte mRNA- und Proteinexpression in vitro auslösen können, gehören Endothelin und mechanische

Dehnung (Lemmens et al. 2006; Zhao et al. 1998). Darüber hinaus können Stimuli zu einer Freisetzung diffusibler Neureguline aus dem membranständigen *Precursor* führen, so dass diese durch Diffusion die Kardiomyozyten erreichen könnten. So zeigte sich an myokardialen mikrovaskulären Endothelzellen der Ratte eine Stimulation der Freisetzung von Neuregulinen durch oxidativen Stress (Kuramochi et al. 2004). Die Freisetzung erfolgt durch Proteolyse der präformierten Neureguline von der Zellmembran. An diesem Prozess sind vermutlich Metalloproteinasen beteiligt. Über die regulatorischen Mechanismen auf der Ebene der Genexpression liegen keine Informationen vor, und Experimente zur Promoteraktivität werden durch das komplexe Splicingmuster erschwert. Auffallend ist die deutliche Variabilität der Neuregulin1-Expression in den verschiedenen Proben von insuffizientem menschlichem Myokard, die sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in der Arbeit von Rohrbach (Rohrbach et al. 2005) gezeigt wurde. Diese Variabilität ähnelt den starken interindividuellen Unterschieden der Expression von Proteinmarkern der neurohumoralen Aktivierung (wie z.B. ANP oder BNP). So beobachteten wir im Median eine Vervierfachung der Expression von  $\beta$ -Neuregulinen in insuffizientem vs. nicht insuffizientem Myokard. Allerdings betrug der Interquartilenabstand der Expression in insuffizienten Proben 7 (2 bis 9), wobei 25% der Proben eine Expression mehr als 9-fach über dem Median der nicht-insuffizienten Gewebe aufwies. Auch für ANP und BNP findet sich eine entsprechende Variabilität der Expression. Neureguline sind in der Lage die ANP-Expression von Kardiomyozyten zu stimulieren (Zhao et al. 1998), so dass die Variabilität der Neuregulin-Expression die Variabilität der ANP-Expression teilweise erklären könnte.

#### 6.4 Klinische Bedeutung und Ausblick

Die Neuregulin/ErbB2-Kaskade wird allgemein als protektiv angesehen. Zwar lösen Neureguline eine Hypertrophie der Kardiomyozyten aus (Zhao et al. 1998) und die Gabe kann im Tiermodell akut negativ inotrop wirken (Lemmens et al. 2004). An der negativen Inotropie scheint die Aktivierung der eNOS beteiligt zu sein. Andererseits löst ein konditioneller Knock-out von erbB2 im Tierexperiment auch bei erwachsenen Tieren eine Herzinsuffizienz aus (Crone et al. 2002; Ozcelik et al. 2002). Eine Stimulation von Kardiomyozyten durch Nrg1 $\beta$  führt zu anti-apoptotischen Effekten und löst eine Reprogrammierung der Genexpression aus (Giraud et al. 2005).

Myokardiale Entlastung von Patienten durch *Assist-Devices* führte zu einer Steigerung der ErbB2-Expression auf Kontrollniveau (Rohrbach et al. 2005). Direkte Evidenz für eine protektive Wirkung von Neuregulinen konnte kürzlich in mehreren Insuffizienzmodellen gefunden werden (Liu et al. 2006). Eine intravenöse Gabe von

Neuregulinen bei Ratten, die entweder einer RIVA-Ligation, einer Behandlung mit Doxorubicin oder einer Infektion mit Coxsackie-Viren unterzogen worden waren, verbesserte sowohl hämodynamische Parameter als auch das Überleben der Tiere.

Ob eine weitere Steigerung der Neuregulin-Konzentrationen beim Menschen eine protektive Rolle ausüben und die Prognose von Patienten mit einer Herzinsuffizienz verbessern könnte, ist derzeit nicht bekannt. Das Sicherheitsprofil einer solchen Intervention lässt sich derzeit nicht abschätzen, allerdings muss der wachstumsfördernde Effekt dieser Stoffe bedacht werden und die Auswirkung auf benigne und maligne Neoplasien bei den Patienten bedürfte sicher besonderer Aufmerksamkeit. Aufgrund der raschen Freisetzung der Neureguline unter pathophysiologischen Stimuli im Tierexperiment, könnte es sich hier um interessante Markermoleküle für akute und chronische kardiale Erkrankungen handeln, wenn die freigesetzten Moleküle im Plasma nachweisbar sein sollten.

## 7 Zusammenfassung

**Hintergrund:** Die vorliegende Arbeit untersuchte die mRNA-Expression der erbB-Tyrosinkinassen (erbB1 (EGF-R) bis erbB4) und der Liganden (Neuregulin 1-Klasse) im menschlichen Myokard. Hintergrund der Fragestellung waren tierexperimentelle und klinische Beobachtungen, die eine wesentliche Funktion der Neuregulin-1/erbB-Kaskade für die myokardiale Entwicklung und Pathophysiologie nahe legen. Die Expression der untersuchten mRNAs im Myokard und ihre Expressionsveränderungen im Rahmen der Herzinsuffizienz waren bei Beginn dieser Untersuchungen unbekannt.

**Methodik:** Es wurde RNA aus humanem Herzmuskelgewebe extrahiert. Es standen Proben von nicht-insuffizienten Spendern (NF, n=8) und von 16 Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz aufgrund einer koronaren Herzerkrankung (ICM; n=8) oder einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM; n=8) zur Verfügung. Die RNA wurde mittels einer Reversen Transkriptasereaktion in cDNA umgewandelt. Durch die Wahl intronüberspannender *Primer* wurde die spezifische Amplifikation der mRNA sichergestellt. Die cDNAs wurden kloniert und sequenziert. Nachfolgend wurde die Expression in Myokardproben durch Echtzeit-PCR untersucht.

**Ergebnisse:** Die in dieser Arbeit erhobenen Daten belegen die mRNA-Expression aller Mitglieder der erbB-Rezeptorfamilie und der Neureguline-1- $\alpha$  und - $\beta$  im Myokard des erwachsenen Menschen. Es konnten Expressionsveränderungen der untersuchten Gene im Rahmen der Herzinsuffizienz nachgewiesen werden. Die Neuregulin-Transkripte waren im Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz signifikant höher konzentriert als im Myokard nicht-insuffizienter Spender (Faktor 4-5). Dabei zeigte sich eine ähnliche Schwankungsbreite wie sie für neurohumorale Marker (z.B. ANP) beobachtet wurde. Demgegenüber waren die mRNAs von erbB2, erbB3 und erbB4 in der myokardialen mRNA von Patienten signifikant um ca. 50% vermindert. EGF-Rezeptor-Transkripte (erbB1) waren unverändert.

**Schlussfolgerungen:** Der verminderten Expression von ErbB-Kinasen bei der dilatativen und ischämischen Kardiomyopathie könnte in Analogie zu experimentellen Beobachtungen eine zentrale pathophysiologische Bedeutung in der Herzinsuffizienz des Menschen zukommen. Darüber hinaus könnte die vermehrte Expression der Liganden der Neuregulin-1 Familie zur Variabilität der Expression von ANP beitragen, da die Expression dieses Gens zumindest *in vitro* der Regulation durch Neuregulin unterworfen ist. Praktische Bedeutung könnte die Kaskade im Rahmen neuerer Ansätze zur Therapie der Herzinsuffizienz oder zur Diagnostik kardialer Erkrankungen gewinnen. Darüber hinaus müssen die myokardialen Effekte bedacht werden, die bei Hemmung dieses Signalwegs im Rahmen onkologischer Therapien durch Antikörper oder durch Tyrosinkinase-Inhibitoren auftreten können.

## 8 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Thomas Eschenhagen für die Vergabe der Promotionsarbeit sowie die vorbildliche Anleitung und Unterstützung bei der Ausarbeitung der Promotion.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Dr. med. Thomas Rau für die Überlassung meines Promotionsthemas bedanken, dass mich bis zum heutigen Tage fasziniert und mir den Anstoß für weitere wissenschaftliche Arbeit gibt. Besonders die freundschaftliche Betreuung, die hervorragende Anleitung zum selbstständigen wissenschaftlichen Arbeiten sowie seine ständige Bereitschaft zur Diskussion haben die Promotionszeit zu einer besonders interessanten Phase meiner Ausbildung gemacht.

Herrn Ingo Schubert gilt mein besonderer Dank für die immer freundliche Unterstützung, und die ständige Bereitschaft, mir in- und außerhalb des Labors mit Rat und Tat zur Seite zu stehen, sowie für die Herstellung der verwendeten RNA-Proben.

Ebenso danke ich Sabine Langer für die hervorragende Anleitung im Labor und das freundschaftliche und hilfsbereite Miteinander.

Ganz besonderen Dank möchte ich meinen Eltern aussprechen, die mich immer liebevoll unterstützt haben, und nicht zuletzt dadurch einen großen Anteil an meiner persönlichen und beruflichen Entwicklung haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei dem gesamten Team der klinischen Pharmakologie Erlangen für die freundliche Aufnahme im Labor und die Unterstützung bei meiner Arbeit danken.

Die Experimente wurden mit finanzieller Unterstützung der Johannes und Frieda Marohn-Stiftung durchgeführt.

## 9 Lebenslauf

Name: Bernd Ebner  
Geboren am: 26.01.1976  
Geburtsort: Waldshut  
Eltern: Josef Ebner, geb. 20.11.1947, Chemielaborant  
Ingrid Ebner, geb. 05.01.1950, geb. Dold, Hausfrau  
Geschwister: Eva Ebner geboren 11.07.1979 und  
Claudia Ebner geboren 29.05.1982

### Schule:

Grundschule Dogern	1982-86
Hochrhein Gymnasium Waldshut-Tiengen	1986-95

### Zivildienst:

Krankenhaus Waldshut	1995-1996
----------------------	-----------

### Studium:

Humanmedizin Friedrich-Alexander-Universität Erlangen	1997-2003
Ärztliche Vorprüfung (Physikum)	03/1999
1. Staatsexamen	03/2000
2. Staatsexamen	07/2002
3. Staatsexamen	10/2003

Dissertation	10/2001- 11/2007
--------------	------------------

am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung für klinische Pharmakologie der Universität Erlangen

Klinische Tätigkeit:	Seit 02/2004
----------------------	--------------

Assistenzarzt am Herzzentrum Medizinische Klinik II der Universität Dresden

## 10 Eidesstattliche Versicherung:

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.

Unterschrift: .....

Bernd Ebner



## 11 Literaturverzeichnis

1. Alroy, I and Yarden, Y. 1997. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 410:83-86.
2. Anderson, D, Koch, CA, Grey, L, Ellis, C, Moran, MF, Pawson, T. 1990. Binding of SH2 domains of phospholipase C gamma 1, GAP, and Src to activated growth factor receptors. *Science* 250:979-982.
3. Azios, NG, Romero, FJ, Denton, MC, Doherty, JK, Clinton, GM. 2001. Expression of herstatin, an autoinhibitor of HER-2/neu, inhibits transactivation of HER-3 by HER-2 and blocks EGF activation of the EGF receptor. *Oncogene* 20:5199-5209.
4. Baliga, RR, Pimental, DR, Zhao, YY, Simmons, WW, Marchionni, MA, Sawyer, DB, Kelly, RA. 1999. NRG-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. Role of PI-3-kinase, p70(S6K), and MEK-MAPK-RSK. *Am J Physiol* 277:H2026-H2037.
5. Bargmann, CI, Hung, MC, Weinberg, RA. 1986. Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell* 45:649-657.
6. Baselga, J. 2000. Clinical trials of single-agent trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* 27:20-26.
7. Beerli, RR, Graus-Porta, D, Woods-Cook, K, Chen, X, Yarden, Y, Hynes, NE. 1995. Neu differentiation factor activation of ErbB-3 and ErbB-4 is cell specific and displays a differential requirement for ErbB-2. *Mol Cell Biol* 15:6496-6505.
8. Burgess, TL, Ross, SL, Qian, YX, Brankow, D, Hu, S. 1995. Biosynthetic processing of neu differentiation factor. Glycosylation trafficking, and regulated cleavage from the cell surface. *J Biol Chem* 270:19188-19196.
9. Carraway, KL, III and Burden, SJ. 1995. Neuregulins and their receptors. *Curr Opin Neurobiol* 5:606-612.
10. Carraway, KL, III and Cantley, LC. 1994a. A neu acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signaling. *Cell* 78:5-8.
11. Carraway, KL, III, Sliwkowski, MX, Akita, R, Platko, JV, Guy, PM, Nuijens, A, Diamonti, AJ, Vandlen, RL, Cantley, LC, Cerione, RA. 1994b. The erbB3 gene product is a receptor for heregulin. *J Biol Chem* 269:14303-14306.
12. Carraway, KL, III, Weber, JL, Unger, MJ, Ledesma, J, Yu, N, Gassmann, M, Lai, C. 1997. Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases. *Nature* 387:512-516.

13. Carter, P, Presta, L, Gorman, CM, Ridgway, JB, Henner, D, Wong, WL, Rowland, AM, Kotts, C, Carver, ME, Shepard, HM. 1992. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4285-4289.
14. Chin, YE, Kitagawa, M, Kuida, K, Flavell, RA, Fu, XY. 1997. Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol Cell Biol* 17:5328-5337.
15. Cooke, T, Reeves, J, Lannigan, A, Stanton, P. 2001. The value of the human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) as a prognostic marker. *Eur J Cancer* 37 Suppl 1:3-10.
16. Crone, SA, Zhao, YY, Fan, L, Gu, Y, Minamisawa, S, Liu, Y, Peterson, KL, Chen, J, Kahn, R, Condorelli, G, Ross, J, Jr., Chien, KR, Lee, KF. 2002. ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy. *Nat Med* 8:459-465.
17. Doherty, JK, Bond, C, Jardim, A, Adelman, JP, Clinton, GM. 1999. The HER-2/neu receptor tyrosine kinase gene encodes a secreted autoinhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10869-10874.
18. Erickson, SL, O'Shea, KS, Ghaboosi, N, Loverro, L, Frantz, G, Bauer, M, Lu, LH, Moore, MW. 1997. ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2- and heregulin-deficient mice. *Development* 124:4999-5011.
19. Falls, DL, Rosen, KM, Corfas, G, Lane, WS, Fischbach, GD. 1993. ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family. *Cell* 72:801-815.
20. Fischbach, GD and Rosen, KM. 1997. ARIA: a neuromuscular junction neuregulin. *Annu Rev Neurosci* 20:429-458.
21. Fuchs, IB, Landt, S, Bueler, H, Kuehl, U, Coupland, S, Kleine-Tebbe, A, Lichtenegger, W, Schaller, G. 2003. Analysis of HER2 and HER4 in human myocardium to clarify the cardiotoxicity of trastuzumab (Herceptin). *Breast Cancer Res Treat* 82:23-28.
22. Fukazawa, R, Miller, TA, Kuramochi, Y, Frantz, S, Kim, YD, Marchionni, MA, Kelly, RA, Sawyer, DB. 2003. Neuregulin-1 protects ventricular myocytes from anthracycline-induced apoptosis via erbB4-dependent activation of PI3-kinase/Akt. *J Mol Cell Cardiol* 35:1473-1479.
23. Gabrielson, K, Bedja, D, Pin, S, Tsao, A, Gama, L, Yuan, B, Muratore, N. 2007. Heat shock protein 90 and ErbB2 in the cardiac response to doxorubicin injury. *Cancer Res* 67:1436-1441.
24. Galisteo, ML, Dikic, I, Batzer, AG, Langdon, WY, Schlessinger, J. 1995. Tyrosine phosphorylation of the c-cbl proto-oncogene protein product and association with epidermal growth factor (EGF) receptor upon EGF stimulation. *J Biol Chem* 270:20242-20245.
25. Gassmann, M, Casagrande, F, Orioli, D, Simon, H, Lai, C, Klein, R, Lemke, G. 1995. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* 378:390-394.

26. Giraud, MN, Fluck, M, Zuppinger, C, Suter, TM. 2005. Expressional reprogramming of survival pathways in rat cardiocytes by neuregulin-1beta. *J Appl Physiol* 99:313-322.
27. Grazette, LP, Boecker, W, Matsui, T, Semigran, M, Force, TL, Hajjar, RJ, Rosenzweig, A. 2004. Inhibition of ErbB2 causes mitochondrial dysfunction in cardiomyocytes: implications for herceptin-induced cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 44:2231-2238.
28. Harari, D, Tzahar, E, Romano, J, Shelly, M, Pierce, JH, Andrews, GC, Yarden, Y. 1999. Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 18:2681-2689.
29. Ho, WH, Armanini, MP, Nuijens, A, Phillips, HS, Osheroff, PL. 1995. Sensory and motor neuron-derived factor. A novel heregulin variant highly expressed in sensory and motor neurons. *J Biol Chem* 270:14523-14532.
30. Holmes, WE, Sliwkowski, MX, Akita, RW, Henzel, WJ, Lee, J, Park, JW, Yansura, D, Abadi, N, Raab, H, Lewis, GD, . 1992. Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science* 256:1205-1210.
31. Horan, T, Wen, J, Arakawa, T, Liu, N, Brankow, D, Hu, S, Ratzkin, B, Philo, JS. 1995. Binding of Neu differentiation factor with the extracellular domain of Her2 and Her3. *J Biol Chem* 270:24604-24608.
32. Hudziak, RM, Lewis, GD, Winget, M, Fendly, BM, Shepard, HM, Ullrich, A. 1989. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 9:1165-1172.
33. Iwamoto, R, Yamazaki, S, Asakura, M, Takashima, S, Hasuwa, H, Miyado, K, Adachi, S, Kitakaze, M, Hashimoto, K, Raab, G, Nanba, D, Higashiyama, S, Hori, M, Klagsbrun, M, Mekada, E. 2003. Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3221-3226.
34. Jaulin-Bastard, F, Saito, H, Le Bivic, A, Ollendorff, V, Marchetto, S, Birnbaum, D, Borg, JP. 2001. The ERBB2/HER2 receptor differentially interacts with ERBIN and PICK1 PSD-95/DLG/ZO-1 domain proteins. *J Biol Chem* 276:15256-15263.
35. Joensuu, H, Kellokumpu-Lehtinen, PL, Bono, P, Alanko, T, Kataja, V, Asola, R, Utriainen, T, Kokko, R, Hemminki, A, Tarkkanen, M, Turpeenniemi-Hujanen, T, Jyrkkio, S, Flander, M, Helle, L, Ingalsuo, S, Johansson, K, Jaaskelainen, AS, Pajunen, M, Rauhala, M, Kaleva-Kerola, J, Salminen, T, Leinonen, M, Elomaa, I, Isola, J. 2006. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med* 354:809-820.
36. Kuramochi, Y, Cote, GM, Guo, X, Lebrasseur, NK, Cui, L, Liao, R, Sawyer, DB. 2004. Cardiac endothelial cells regulate reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis through neuregulin-1beta/erbB4 signaling. *J Biol Chem* 279:51141-51147.

37. Lee, H, Akita, RW, Sliwkowski, MX, Maihle, NJ. 2001. A naturally occurring secreted human ErbB3 receptor isoform inhibits heregulin-stimulated activation of ErbB2, ErbB3, and ErbB4. *Cancer Res* 61:4467-4473.
38. Lee, KF, Simon, H, Chen, H, Bates, B, Hung, MC, Hauser, C. 1995. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 378:394-398.
39. Lemke, G. 1996. Neuregulins in development. *Mol Cell Neurosci* 7:247-262.
40. Lemmens, K, Fransen, P, Sys, SU, Brutsaert, DL, De Keulenaer, GW. 2004. Neuregulin-1 induces a negative inotropic effect in cardiac muscle: role of nitric oxide synthase. *Circulation* 109:324-326.
41. Lemmens, K, Segers, VF, Demolder, M, De Keulenaer, GW. 2006. Role of neuregulin-1/ErbB2 signaling in endothelium-cardiomyocyte cross-talk. *J Biol Chem* 281:19469-19477.
42. Liu, X, Gu, X, Li, Z, Li, X, Li, H, Chang, J, Chen, P, Jin, J, Xi, B, Chen, D, Lai, D, Graham, RM, Zhou, M. 2006. Neuregulin-1/erbB-activation improves cardiac function and survival in models of ischemic, dilated, and viral cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 48:1438-1447.
43. Liu, X, Hwang, H, Cao, L, Buckland, M, Cunningham, A, Chen, J, Chien, KR, Graham, RM, Zhou, M. 1998a. Domain-specific gene disruption reveals critical regulation of neuregulin signaling by its cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13024-13029.
44. Liu, X, Hwang, H, Cao, L, Wen, D, Liu, N, Graham, RM, Zhou, M. 1998b. Release of the neuregulin functional polypeptide requires its cytoplasmic tail. *J Biol Chem* 273:34335-34340.
45. Lowenstein, EJ, Daly, RJ, Batzer, AG, Li, W, Margolis, B, Lammers, R, Ullrich, A, Skolnik, EY, Bar-Sagi, D, Schlessinger, J. 1992. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70:431-442.
46. Marchionni, MA, Goodearl, AD, Chen, MS, Bermingham-McDonogh, O, Kirk, C, Hendricks, M, Danehy, F, Misumi, D, Sudhalter, J, Kobayashi, K, . 1993. Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. *Nature* 362:312-318.
47. Meyer, D and Birchmeier, C. 1995. Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* 378:386-390.
48. Morris, JK, Lin, W, Hauser, C, Marchuk, Y, Getman, D, Lee, KF. 1999. Rescue of the cardiac defect in ErbB2 mutant mice reveals essential roles of ErbB2 in peripheral nervous system development. *Neuron* 23:273-283.
49. Morrissey, TK, Levi, AD, Nuijens, A, Sliwkowski, MX, Bunge, RP. 1995. Axon-induced mitogenesis of human Schwann cells involves heregulin and p185erbB2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1431-1435.
50. Okoshi, K, Nakayama, M, Yan, X, Okoshi, MP, Schuldt, AJ, Marchionni, MA, Lorell, BH. 2004. Neuregulins regulate cardiac parasympathetic activity:

muscarinic modulation of beta-adrenergic activity in myocytes from mice with neuregulin-1 gene deletion. *Circulation* 110:713-717.

51. Olayioye, MA. 2001. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res* 3:385-389.
52. Ozcelik, C, Erdmann, B, Pilz, B, Wettschureck, N, Britsch, S, Hubner, N, Chien, KR, Birchmeier, C, Garratt, AN. 2002. Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8880-8885.
53. Peles, E, Bacus, SS, Koski, RA, Lu, HS, Wen, D, Ogden, SG, Levy, RB, Yarden, Y. 1992. Isolation of the neu/HER-2 stimulatory ligand: a 44 kd glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells. *Cell* 69:205-216.
54. Pelicci, G, Lanfrancone, L, Grignani, F, McGlade, J, Cavallo, F, Forni, G, Nicoletti, I, Grignani, F, Pawson, T, Pelicci, PG. 1992. A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell* 70:93-104.
55. Peng, X, Guo, X, Borkan, SC, Bharti, A, Kuramochi, Y, Calderwood, S, Sawyer, DB. 2005. Heat shock protein 90 stabilization of ErbB2 expression is disrupted by ATP depletion in myocytes. *J Biol Chem* 280:13148-13152.
56. Piccart-Gebhart, MJ, Procter, M, Leyland-Jones, B, Goldhirsch, A, Untch, M, Smith, I, Gianni, L, Baselga, J, Bell, R, Jackisch, C, Cameron, D, Dowsett, M, Barrios, CH, Steger, G, Huang, CS, Andersson, M, Inbar, M, Lichinitser, M, Lang, I, Nitz, U, Iwata, H, Thomssen, C, Lohrisch, C, Suter, TM, Ruschoff, J, Suto, T, Greatorex, V, Ward, C, Straehle, C, McFadden, E, Dolci, MS, Gelber, RD. 2005. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353:1659-1672.
57. Plowman, GD, Culouscou, JM, Whitney, GS, Green, JM, Carlton, GW, Foy, L, Neubauer, MG, Shoyab, M. 1993a. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1746-1750.
58. Plowman, GD, Green, JM, Culouscou, JM, Carlton, GW, Rothwell, VM, Buckley, S. 1993b. Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180erbB4. *Nature* 366:473-475.
59. Quian, XL, Decker, SJ, Greene, MI. 1992. p185c-neu and epidermal growth factor receptor associate into a structure composed of activated kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1330-1334.
60. Riese, DJ, Bermingham, Y, van Raaij, TM, Buckley, S, Plowman, GD, Stern, DF. 1996a. Betacellulin activates the epidermal growth factor receptor and erbB-4, and induces cellular response patterns distinct from those stimulated by epidermal growth factor or neuregulin-beta. *Oncogene* 12:345-353.
61. Riese, DJ, Kim, ED, Elenius, K, Buckley, S, Klagsbrun, M, Plowman, GD, Stern, DF. 1996b. The epidermal growth factor receptor couples transforming

growth factor-alpha, heparin-binding epidermal growth factor-like factor, and amphiregulin to Neu, ErbB-3, and ErbB-4. *J Biol Chem* 271:20047-20052.

62. Riese, DJ, van Raaij, TM, Plowman, GD, Andrews, GC, Stern, DF. 1995. The cellular response to neuregulins is governed by complex interactions of the erbB receptor family. *Mol Cell Biol* 15:5770-5776.
63. Rohrbach, S, Niemann, B, Silber, RE, Holtz, J. 2005. Neuregulin receptors erbB2 and erbB4 in failing human myocardium Depressed expression and attenuated activation. *Basic Res Cardiol* 100:240-249.
64. Rohrbach, S, Yan, X, Weinberg, EO, Hasan, F, Bartunek, J, Marchionni, MA, Lorell, BH. 1999. Neuregulin in cardiac hypertrophy in rats with aortic stenosis. Differential expression of erbB2 and erbB4 receptors. *Circulation* 100:407-412.
65. Romond, EH, Perez, EA, Bryant, J, Suman, VJ, Geyer, CE, Jr., Davidson, NE, Tan-Chiu, E, Martino, S, Paik, S, Kaufman, PA, Swain, SM, Pisansky, TM, Fehrenbacher, L, Kutteh, LA, Vogel, VG, Visscher, DW, Yothers, G, Jenkins, RB, Brown, AM, Dakhil, SR, Mamounas, EP, Lingle, WL, Klein, PM, Ingle, JN, Wolmark, N. 2005. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353:1673-1684.
66. Salzer, JL, Bunge, RP, Glaser, L. 1980. Studies of Schwann cell proliferation. III. Evidence for the surface localization of the neurite mitogen. *J Cell Biol* 84:767-778.
67. Sarup, JC, Johnson, RM, King, KL, Fendly, BM, Lipari, MT, Napier, MA, Ullrich, A, Shepard, HM. 1991. Characterization of an anti-p185HER2 monoclonal antibody that stimulates receptor function and inhibits tumor cell growth. *Growth Regul* 1:72-82.
68. Sawyer, DB, Zuppinger, C, Miller, TA, Eppenberger, HM, Suter, TM. 2002. Modulation of anthracycline-induced myofibrillar disarray in rat ventricular myocytes by neuregulin-1beta and anti-erbB2: potential mechanism for trastuzumab-induced cardiotoxicity. *Circulation* 105:1551-1554.
69. Schechter, AL, Hung, MC, Vaidyanathan, L, Weinberg, RA, Yang-Feng, TL, Francke, U, Ullrich, A, Coussens, L. 1985. The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* 229:976-978.
70. Schlessinger, J and Ullrich, A. 1992. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* 9:383-391.
71. Schroering, A and Carey, DJ. 1998. Sensory and motor neuron-derived factor is a transmembrane heregulin that is expressed on the plasma membrane with the active domain exposed to the extracellular environment. *J Biol Chem* 273:30643-30650.
72. Slamon, DJ, Clark, GM, Wong, SG, Levin, WJ, Ullrich, A, McGuire, WL. 1987. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235:177-182.

73. Slamon, DJ, Leyland-Jones, B, Shak, S, Fuchs, H, Paton, V, Bajamonde, A, Fleming, T, Eiermann, W, Wolter, J, Pegram, M, Baselga, J, Norton, L. 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344:783-792.
74. Sliwkowski, MX, Schaefer, G, Akita, RW, Lofgren, JA, Fitzpatrick, VD, Nuijens, A, Fendly, BM, Cerione, RA, Vandlen, RL, Carraway, KL, III. 1994. Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J Biol Chem* 269:14661-14665.
75. Tenev, T, Keilhack, H, Tomic, S, Stoyanov, B, Stein-Gerlach, M, Lammers, R, Krivtsov, AV, Ullrich, A, Bohmer, FD. 1997. Both SH2 domains are involved in interaction of SHP-1 with the epidermal growth factor receptor but cannot confer receptor-directed activity to SHP-1/SHP-2 chimera. *J Biol Chem* 272:5966-5973.
76. Tzahar, E, Levkowitz, G, Karunakaran, D, Yi, L, Peles, E, Lavi, S, Chang, D, Liu, N, Yayon, A, Wen, D. 1994. ErbB-3 and ErbB-4 function as the respective low and high affinity receptors of all Neu differentiation factor/hergulin isoforms. *J Biol Chem* 269:25226-25233.
77. Wang, X, McCullough, KD, Franke, TF, Holbrook, NJ. 2000. Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J Biol Chem* 275:14624-14631.
78. Wang, Z, Gluck, S, Zhang, L, Moran, MF. 1998. Requirement for phospholipase C-gamma1 enzymatic activity in growth factor-induced mitogenesis. *Mol Cell Biol* 18:590-597.
79. Wen, D, Peles, E, Cupples, R, Suggs, SV, Bacus, SS, Luo, Y, Trail, G, Hu, S, Silbiger, SM, Levy, RB, . 1992. Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell* 69:559-572.
80. Yarden, Y and Schlessinger, J. 1987. Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* 26:1443-1451.
81. Yuste, L, Montero, JC, Esparis-Ogando, A, Pandiella, A. 2005. Activation of ErbB2 by overexpression or by transmembrane neuregulin results in differential signaling and sensitivity to heregulin. *Cancer Res* 65:6801-6810.
82. Zhang, D, Sliwkowski, MX, Mark, M, Frantz, G, Akita, R, Sun, Y, Hillan, K, Crowley, C, Brush, J, Godowski, PJ. 1997. Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9562-9567.
83. Zhao, YY, Sawyer, DR, Baliga, RR, Opel, DJ, Han, X, Marchionni, MA, Kelly, RA. 1998. Neuregulins promote survival and growth of cardiac myocytes. Persistence of ErbB2 and ErbB4 expression in neonatal and adult ventricular myocytes. *J Biol Chem* 273:10261-10269.