

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Institut für
Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
des Zentrums für Experimentelle Medizin

Direktor: Prof. Dr. T. Eschenhagen

Expression des cardiac ankyrin repeat protein (CARP) in der humanen Herzinsuffizienz

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Alexander Michael Maurer
aus Wertingen

Hamburg 2009

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 04.02.2010**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg**

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

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. H. Ehmke

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. U. Wenzel

Meiner Familie gewidmet.

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems stellten mit 358.583 Todesfällen im Jahr 2007 die häufigste Todesursache in Deutschland dar, was 43% aller Todesfälle entsprach. Innerhalb dieser Gruppe verstarben 52.000 Patienten an Herzinsuffizienz. 251.000 Patienten wurden aufgrund dieser Diagnose vollstationär aufgenommen. Im Jahr 2006 mussten die Krankenkassen 35,2 Mrd. Euro für die Behandlung von Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems aufwenden. Bei einem Anteil von 16% an allen Krankheitskosten wurden hiervon wiederum 65% für die stationäre Behandlung aufgebracht. Durch die Erkrankung dieses Organsystems wurde die Gesamtwirtschaft mit einem Verlust von 713.000 Erwerbstätigkeitsjahren belastet (Statistisches Bundesamt 2008). Die Prävalenz der Herzinsuffizienz wird in Deutschland mit knapp 1 Million Erkrankter angegeben. Etwa 50% aller Menschen über dem 70. Lebensjahr zeigen mehr oder weniger ausgeprägte Symptome dieser Krankheit. Mehreren Studien zufolge beträgt die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate nach Diagnosestellung 40-50% (Zile und Brutsaert 2002). Der hohe Anteil an stationären Kosten, die Prävalenz von 1% sowie die niedrige 5-Jahres-Überlebensrate zeigen die hohe Relevanz auf, welche die weitere Erforschung der pathophysiologischen Mechanismen der Herzinsuffizienz und die Entwicklung neuer Medikamente zur Therapie und Sekundärprophylaxe für den einzelnen Patienten und für die Gesellschaft haben.

Pathophysiologisch ist das Herz bei der Herzinsuffizienz nicht mehr in der Lage, genügend Blut und somit eine adäquate Menge an Sauerstoff in das Gewebe zu transportieren. Klinisch ist eine Herzinsuffizienz zu diagnostizieren, wenn den Symptomen einer schnellen Ermüdbarkeit, Dyspnoe und Flüssigkeitsretention eine kardiale Funktionsstörung ursächlich zu Grunde liegt (WHO 1995). Eine erweiterte Definition der Herzinsuffizienz durch die Europäische Gesellschaft für Kardiologie fordert zur Diagnosestellung die Symptomenkomplexe Dyspnoe, Müdigkeit und Wasserretention entweder bei Belastung oder in Ruhe und objektivierbare Beweise einer kardialen Dysfunktion in Ruhe. Desweiteren ist das Ansprechen auf die Therapie als bestätigendes, allerdings nicht als für die Diagnose ausreichendes Kriterium anzusehen (Remme und Swedberg 2002).

Als Ursachen für die Herzinsuffizienz gelten Myokarditis, chronische Druck- und Volumenbelastung bei Hypertonie, Klappenfehlern und anderen Vitien, chronischer Sauerstoffmangel bei koronarer Herzkrankheit sowie der Untergang myokardialen

Gewebes nach einem Herzinfarkt (Eschenhagen und Weil 1998). Die häufigste Ursache einer Herzinsuffizienz in westlichen Ländern ist die koronare Herzerkrankung (54-70%). Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist nach der koronaren Herzerkrankung die zweithäufigste Ursache der Herzinsuffizienz. Risikofaktoren für ein koronares Herzsyndrom und Hypertonie sind Hypercholesterinämie, Rauchen, Adipositas, Diabetes mellitus und genetische Disposition.

Gekennzeichnet ist die Herzinsuffizienz sowohl durch Vorwärts- als auch durch Rückwärtsversagen des Herzens. Bei einer alleinigen Linksherzinsuffizienz können beim Patienten Dyspnoe, Lungenödem, Asthma kardiales sowie Leistungsminderung und zerebrale Symptome auftreten. Die reine Rechtsherzinsuffizienz äußert sich durch Ödeme der abhängigen Körperpartien, Stauung der Halsvenen, Hepatomegalie und gastrointestinale Beschwerden. Meist findet sich allerdings eine Kombination von Links- und Rechtsherzinsuffizienz (Riegger 1998). Gemäß einer Empfehlung der New York Heart Association (NYHA) wird die Herzinsuffizienz in die Stadien NYHA I - IV eingeteilt. NYHA I bedeutet, dass keine Einschränkungen bei normaler körperlicher Tätigkeit verzeichnet werden. Patienten, welche bereits in Ruhe Symptome der kardialen Insuffizienz verspüren, werden dem Stadium NYHA IV zugeordnet.

Unabhängig von der Ätiologie zeigen sich auf makroskopischer und mikroskopischer Ebene relativ einheitliche Veränderungen. Da Kardiomyozyten (KM) ihre mitogene Fähigkeit verloren haben, reagieren sie auf die erhöhte Wandspannung mit einer Hypertrophie der Zelle. Mikroskopisch findet man verdickte KM und die Ausbildung neuer, in Serie angeordneter Sarkomere. Die Zellen der extrazellulären Matrix, welche ihre Teilungsfähigkeit behalten haben, zeigen dagegen eine erhöhte Mitoserate, was zu einer Vermehrung der kardialen Matrix und einem Verlust der Plastizität des Herzens führt (Masson et al. 1998). Makroskopisch führt dies zu einer Zunahme der Herzgröße und des Herzgewichtes. Bei reiner Druckbelastung der Ventrikel zeigt sich zunächst eine konzentrische Myokardhypertrophie, die durch Zunahme der Wanddicke gekennzeichnet ist. Eine alleinige Volumenbelastung bewirkt von Anfang an eine exzentrische Hypertrophie des Herzens. Dies spiegelt sich in der Dilatation der Ventrikel wider. Im terminalen Stadium der Herzinsuffizienz findet man zumeist eine exzentrische Myokardhypertrophie. Letztendlich führen beide Mechanismen zu einer reduzierten Kontraktionsfähigkeit und Kontraktionskraft des Herzens.

Da das Herz nicht mehr in der Lage ist, den gesamten Organismus adäquat mit Blut zu versorgen, werden vom Körper kompensatorische Mechanismen in Gang gesetzt, um dieser Minderperfusion entgegenzuwirken. Hier sind vor allem das Renin-Angiotensin

System (Eschenhagen und Weil 1998; Dostal und Baker 1999; Sugden 1999; Akers et al. 2000) sowie eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems, welche zu einem ausgeprägten Anstieg des Plasma-Noradrenalinspiegels führt, zu nennen (Eschenhagen und Weil 1998; Iaccarino et al. 1999; Sugden 1999; Schäfer et al. 2000). Darüber hinaus können auch Cardiotrophin-1 (Schaub et al. 1997), Endothelin (Kaburagi et al. 1999) und Wachstumsfaktoren, wie der Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) und der Transforming Growth Factor ($TGF-\beta$, Hefti et al. 1997) an der Entstehung einer Myokardhypertrophie beteiligt sein.

Innerhalb der Zelle werden durch diese hypertroph wirkenden Faktoren multiple Veränderungen bewirkt. Es werden geänderte bzw. gesteigerte RNA- und Proteinsyntheseraten, eine Veränderung des Verhältnisses von β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren (AR) von etwa 4:1 im gesunden auf 1:1 im insuffizienten Herz sowie Veränderungen am kontraktilen Apparat beschrieben (Clerk und Sugden 2000, Schäfer et al. 2000; Port und Bristow 2001). Auch die Kalziumhomöostase und die elektromechanische Kopplung in der Zelle sind bei der Herzinsuffizienz verändert. Durch eine chronische Stimulation der KM mit Noradrenalin wird eine abgeschwächte inotrope, chronotrope und lusitrope Reaktion auf weitere adrenerge Reize beobachtet. Diese Desensitivierung resultiert aus einer verminderten β -Adrenozeptor-Dichte an der Oberfläche der Kardiomyozyten, einer vermehrten Expression inhibitorischer G-Proteine und einer Phosphorylierung der Rezeptoren durch die in Aktivität und Expression vermehrte β -Adrenozeptor-Kinase (Iaccarino et al. 1999; Manning et al. 2000; Port und Bristow 2001). Die funktionelle Konsequenz dieser Veränderung ist eine Verminderung der positiv inotropen Effekte von endogenen Katecholaminen und von zyklischem AMP (cAMP) abhängigen, positiv inotropen Substanzen. Die Bedeutung eines erhöhten Katecholaminspiegels für die Progredienz und Mortalität der Herzinsuffizienz wird in einer Studie von Cohn et al. (1984) deutlich. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der Plasma-Katecholaminspiegel und der Mortalitätsrate bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz. Darüber hinaus erwies sich in dieser Studie lediglich der Plasma-Katecholaminspiegel im Vergleich zur Plasma-Reninaktivität, Serum-Kaliumkonzentration oder Herzfrequenz als prognostisch signifikanter Parameter.

Auf zellulärer Ebene kann ferner die Reexpression sogenannter "fetaler Gene" beobachtet werden. Diese Proteine werden normalerweise nur während der intrauterinen Entwicklung und in den ersten Lebenstagen und -wochen im Herzen exprimiert. Später sind sie nur noch in geringen Mengen oder gar nicht mehr detektierbar. Durch die Veränderung der Gentranskription, vermittelt durch hypertrophe Reize, werden diese Proteine erneut

produziert. Hierbei handelt es sich beispielsweise um glattmuskuläres α -Aktin und die Vorhof- und Gehirn-spezifischen natriuretischen Peptide (ANP und BNP), welche häufig als Hypertrophie-Marker eingesetzt werden. ANP ist am gesunden Herzen nur im Vorhof, nicht aber im Ventrikel exprimiert, während es am hypertrophen Herzen erneut auch im Ventrikel nachweisbar ist (Sugden 1999; Clerk und Sugden 2000). Die Reexpression dieser fetalen Proteine muss nicht notwendigerweise negative Konsequenzen für das Herz haben. Es ist gezeigt worden, dass endogenes ANP die Hypertrophie von KM reduziert (Horio et al. 2000).

Zu diesen fetalen Proteinen könnte auch das cardiac ankyrin repeat protein (CARP) zählen, das bei der Herzinsuffizienz in verschiedenen Tiermodellen vermehrt exprimiert nachgewiesen wurde (Manning et al. 2000; Aihara et al. 2000a)

1.2 Entdeckung, Struktur und Funktion des cardiac ankyrin repeat protein

Zwischen 1995 und 1997 wurde CARP von 4 Autoren unabhängig voneinander beschrieben. Chu et al. berichteten 1995 von einem Protein, das in humanen mikrovaskulären Endothelzellen durch Interleukin 1 α und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) induziert wird. Sie nannten dieses durch differentielle Expressionsanalyse identifizierte Gen C-193.

Bei einer differentiellen Expressionsanalyse einer cDNA-Library aus denervierten Skelettmuskelzellen entdeckten Baumeister et al. ein Protein mit dem Namen muscle ankyrin repeat protein (MARP). Auf der Suche nach einem Bindungspartner für YB-1 entdeckten Zou et al. durch Yeast Two-Hybrid-Screening einer cDNA-Library von Herzen neonataler Ratten mit YB-1 als Bait (=“Köder“) das cardiac ankyrin repeat protein. Bei YB-1 handelt es sich um einen ubiquitär vorkommenden Transkriptionsfaktor, der sich an die HF-1 Bindungsstelle des Promotors für die ventrikuläre Myosin-Leichtkette (MLC-2v) anlagert (Ross et al. 1996).

Jeyaseelan et al. (1997) beschreiben gleichzeitig ein Protein, das durch das Zytostatikum Doxorubicin in Herzmuskelzellen neonataler Ratten negativ reguliert wird. Das Produkt des durch Differential-Display-Technik isolierten Gens nannten sie cardiac-adriamycin-responsive protein (CARP).

Durch Sequenzanalysen fand man heraus, dass es sich beim muscle ankyrin repeat protein, dem cardiac ankyrin repeat protein sowie beim cardiac adriamycin-responsive

Protein um ein und dasselbe Protein handelte (Baumeister et al. 1997; Jeyaseelan et al. 1997). Später wurde in der Literatur der Begriff cardiac ankyrin repeat protein (CARP) verwendet. Das Gen, welches CARP codiert, wird als ankyrin repeat domain 1, *ANKRD1*, bezeichnet. C-193 stellt das humane Pendant zum CARP der Ratte mit einer Homologie von 91% dar (Zou et al. 1997).

CARP stellt ein primär herzspezifisches Protein dar. Der Expressionsgipfel liegt in der embryonalen Entwicklung und nimmt bis zu einem konstant niedrigen Niveau im adulten Herzen stetig ab (Zou et al. 1997). Geringe Mengen konnten darüber hinaus auch in Lunge, Skelettmuskel und Plazenta adulter Ratten detektiert werden (Baumeister et al. 1997). Das Vorkommen von CARP in der Lunge wird auf atriales Gewebe, welches die Pulmonalvenen invaginiert, zurückgeführt (Zou et al. 1997).

Während der Kardiogenese kann CARP erstmals 7,5 Tage post conceptionem (p.c.) im murinen Herzen, abgesehen von den Klappen und dem Endokard, nachgewiesen werden (Zou et al. 1997). CARP ist in den Tagen 11,5 bis 16,5 p.c. auch in den Enden der primären Muskelmyofibrillen detektierbar (Baumeister et al. 1997). Während in der Embryogenese eine einheitliche Verteilung im Myokard zu finden ist, wird im Vorhof mehr CARP als im Ventrikel exprimiert (Baumeister et al. 1997). Allerdings ist auch in den adulten Vorhöfen CARP gegenüber dem embryonalen Wert erniedrigt. Eine signifikante Zunahme an CARP wurde im hypertrophen Herzen festgestellt (Zou et al. 1997; Aihara et al. 2000 a). Auch durch Denervierung eines Skelettmuskels oder durch Ballondilatation von Arterien konnte die CARP mRNA-Expression in quergestreiften (Baumeister et al. 1997) bzw. glatten Muskelzellen (Kanai et al. 2001) erneut induziert werden.

Die 1.749 Basenpaare (bp) große CARP-cDNA kodiert ein 319 Aminosäuren langes Protein. Rechnerisch ergibt sich für CARP ein Molekulargewicht von 36,2 kDa. Die mRNA enthält 9 Exons (Kuo et al. 1999). Innerhalb der Basensequenz sind 4 Ankyrin-ähnliche Domänen zu finden.

Jeyaseelan et al. (1997) beschreiben noch eine weitere Ankyrin-ähnliche Domäne, wobei jedoch im Vergleich zu den anderen 4 gegenüber der Konsensussequenz für Ankyrin-Domänen eine deutlich geringere Homologie auffällt.

Eine typische Ankyrin-ähnliche Domäne besteht aus etwa 33 Aminosäurenresten, welche eine β -Haarnadel-Helix-Schleife-Helix-Struktur ausbilden. Die Ankyrin-ähnlichen Domänen dienen auch bei CARP als Gerüst zur Interaktion mit anderen Proteinen.

Den Ankyrin-ähnlichen Domänen ist ein putatives nukleäres Lokalisationssignal vorgelagert. Diese Aminosäuresequenz ermöglicht den intrazellulären Transport des Proteins nach Translation und posttranslationalen Modifikationen in den Kern (Dingwall et al. 1982). Hierdurch ist die starke Anreicherung des Proteins im Kern erklärbar (Jeyaseelan et al. 1997). Nach der Translation könnte CARP an multiplen Phosphorylierungsstellen modifiziert werden. Von Jeyaseelan et al. (1997) werden für CARP 12 putative Phosphorylierungsstellen beschrieben. Das apparente Gewicht von 40 kDa könnte sich durch posttranslationale Phosphorylierung an einer oder mehrerer dieser Stellen erklären.

Schließlich sind im Gen von CARP noch multiple Degradierungssignale enthalten. Zum einen handelt es sich um 5 ATTA Degradierungs-Sequenzen im untranslatierten Bereich des 3'-Endes, die für den schnellen Abbau der mRNA verantwortlich sind. Darüber hinaus ist im Protein selbst eine PEST-Sequenz vorhanden, welche die rasche intrazelluläre Degradierung des Proteins bewirkt (Chu et al. 1995). PEST-Sequenzen sind typisch für viele kurzlebige Proteine, darunter auch die Proto-Onkogene c-fos und c-myc (Rechsteiner und Rogers 1996).

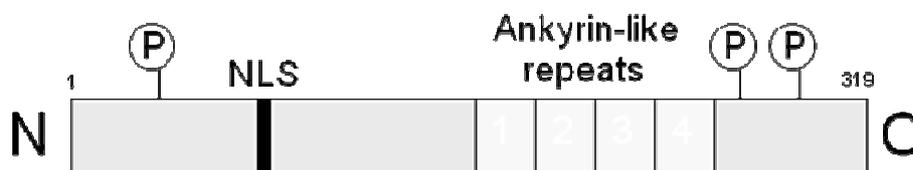


Abbildung 1:

Struktur-Modell des cardiac ankyrin repeat protein (CARP). Darstellung der Amino- (N) und Carboxylenden (C) des Proteins und der relativen Lokalisation des putativen nukleären Lokalisationssignals (NLS), der Ankyrin-ähnlichen Domänen 1 bis 4 sowie der putativer Phosphorylierungsstellen (P). Modifiziert nach Chu et al. (1995).

1.3 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Eine vermehrte CARP-Expression konnte bereits in verschiedenen Tiermodellen der Herzhypertrophie, wie spontan hypertensive Ratten, Dahl salzsensitiven Ratten, Aortenligationsmodell der Ratte und in Muscle LIM Protein (MLP) defizienten Mäusen nachgewiesen werden.

Auf der Suche nach bislang unbekanntem Genen, die möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese der Herzinsuffizienz spielen, wurden Veränderungen der kardialen Genexpression in einem experimentellen Tiermodell der Herzinsuffizienz im Vergleich zu entsprechenden gesunden Kontrolltieren untersucht. Mittels der Suppression Hybridization (SSH)-Technik gelang es, in insuffizientem Herzmuskelgewebe von Hunden (Schrittmacher-Überstimulation) CARP als ein im Vergleich zu gesundem Myokard erhöht exprimiertes Gen nachzuweisen.

Während tierexperimentelle Studien unabhängig von dem untersuchten Modell der Herzinsuffizienz übereinstimmend eine erhöhte CARP-Expression im insuffizienten Myokard zeigten, fehlten entsprechende Daten zur menschlichen Herzinsuffizienz.

Es ergaben sich im Einzelnen folgende Fragestellungen:

- 1) Welche Veränderungen zeigen sich in der CARP Expression an insuffizienten menschlichen Herzen im Vergleich zu gesunden Herzen?
- 2) Besteht eine Abhängigkeit der CARP-Expression von der Ätiologie der Herzinsuffizienz (dilatative versus ischämische Kardiomyopathie)?
- 3) Bestehen Unterschiede in der Expression von CARP zwischen Vorhof- und Ventrikelmyokard?
- 4) Sublokalisierung von CARP in der Zelle?
- 5) Welche Auswirkungen hat eine adenoviral induzierte Überexpression von CARP auf das Expressionsmuster neonataler Rattenkardiomyozyten?

2 Material und Methoden

Soweit nicht bereits im Text erwähnt, sind alle verwendeten Materialien im Anhang unter Punkt 9.1 tabellarisch aufgeführt. Alle Arbeitsschritte wurden, wenn nicht anders im Text angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.1 Expression von CARP in humanem Herzmuskelgewebe

2.1.1 Humanes Herzmuskelgewebe

Insuffizientes Myokardgewebe stammte von explantierten Herzen chronisch herzinsuffizienter Patienten. Alle Patienten waren gemäß der Einteilung der New York Heart Association in Klasse III-IV eingestuft und wiesen abnorme hämodynamische Parameter vor der Transplantation auf.

Gesundes Herzmuskelgewebe entstammte Spenderherzen, die aufgrund fehlender geeigneter Empfänger nicht für eine Transplantation verwendet werden konnten. Bei diesen Organspendern war in keinem Fall eine kardiovaskuläre Krankheitsvorgeschichte bekannt.

Die Proben der Herzgewebekbank wurden ausschließlich in synonymisierter Form verwendet (positives Votum der Ethik-Kommission bei der Ärztekammer Hamburg, Az. 532/116/9.7.1991).

Nr.	Alter	Geschlecht	Diagnose	NYHA Stadium	LVEF (%)	CI (L/min/m ²)	Therapie
1	52	M	NF (ICB)				
2	44	M	NF (SAB)				
3	50	F	NF (SAB)				
4	49	F	NF (CIC)				
5	31	M	NF (SHT)				
6	35	M	NF (SHT)				
7	36	M	NF (SHT)				
8	45	M	NF (SHT)				
9	52	M	NF (ICB)				
10	19	M	NF (SHT)				
11	36	M	NF (ICB)				
12	50	M	DCM	III-IV	n.b.	2,8	DGCNA
13	16	M	DCM	IV	n.b.	2,2	DGNAO
14	65	M	DCM	IV	n.b.		DNR
15	33	M	DCM	III	40	3,5	DGNA
16	35	M	DCM	IV	25	1,9	DGNARO
17	59	M	DCM	III	n.b.	1,7	DGNA
18	62	M	DCM	IV	<20	2,2	DGAR
19	47	M	DCM	IV	25	2,2	DGNAR
20	43	M	DCM	III	26	2,7	GDCNA
21	48	M	DCM	III-IV	n.b.	1,7	GDCNA
22	59	M	DCM	III	24	1,7	GDNA
23	61	F	ICM	III-IV	20	n.b.	n.b.
24	64	M	ICM	III-IV	25	n.b.	DNAO
25	46	M	ICM	III-IV	n.b.	n.b.	n.b.
26	54	M	ICM	III-IV	n.b.	n.b.	n.b.
27	57	M	ICM	III-IV	n.b.	n.b.	DGNR
28	66	M	ICM	III-IV	16	1,9	DCA
29	62	M	ICM	IV	n.b.	n.b.	DGNR
30	64	M	ICM	III-IV	n.b.	1,8	DGNARO
31	50	M	ICM	IV	<20	1,2	DGNA
32	62	M	ICM	III-IV	n.b.	3,1	DGNA
33	54	M	ICM	III	20	1,5	DGNAR

Tabelle 1: Charakterisierung der humanen Herzmuskelproben. Abkürzungen: M = männlich, F = weiblich, NF = gesundes Spenderherz, DCM = dilatative Kardiomyopathie, ICM = ischämische Kardiomyopathie, ICB = intrazerebrale Blutung, SAB = Subarachnoidalblutung, CIC = zerebrale Ischämie, SHT = Schädel-Hirn-Trauma, LVEF = linksventrikuläre Ejektionsfraktion, CI = kardialer Index (Herzminutenvolumen / Körperoberfläche), A = ACE-Inhibitoren oder AT II Rezeptorantagonisten, C = Kalzium-Antagonisten, D = Diuretika, G = Herzglykoside, N = Nitrate, R = Antiarrhythmika, O Dopamin/Dobutamin, n.b. unbekannt.

2.1.2 Quantifizierung der kardialen CARP mRNA-Expression im Northern-Blot

2.1.2.1 RNA-Isolierung

Zum Vergleich der Genexpression im Herzgewebe wurde die RNA in einer modifizierten Methode nach Chomczynski und Scacchi (1987) präpariert.

Die RNA-Isolierung erfolgte mittels TRIZOL[®] (GIBCO BRL Life Technologies, Ebersberg). Durch TRIZOL[®], eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisothiozyanat, wurden die Zellen unter Erhaltung der Integrität der RNA lysiert. Die so gewonnene RNA war weitgehend frei von Proteinen und DNA.

Aus den bei -80 °C tiefgefrorenen Herzen wurden ca. 100 mg Gewebe abgewogen (LP620S, Sartorius, Göttingen) und mit einem Mörser in flüssigem Stickstoff pulverisiert. Das zermörserte Gewebe wurde in 1000 µl TRIZOL[®] aufgenommen und 2 x für 30 sec bei 1.400 U/min mit einem Glas-Teflon-Potter (Potter S, Braun Biotech, Melsungen) weiter homogenisiert. Die RNA wurde nach dem Protokoll des Herstellers aus dem Homogenat isoliert.

Nach Fällung der RNA und dem letzten Waschschrift wurde die Flüssigkeit komplett abgesaugt und das RNA-Pellet an der Luft getrocknet. Die Resuspension der RNA erfolgte in 35 µl Diethyl-Pyrocyanat H₂O (DEPC-H₂O). Die photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes wurde in einer Verdünnung von 1:25 bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum für RNA) durchgeführt (Smart Spec 3000, Bio Rad, München). Zur Bestimmung des Reinheitsgrades der isolierten RNA wurde gleichzeitig die optische Dichte bei 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine) gemessen und der Quotient OD 260/OD 280 gebildet, der bei allen Messungen zwischen 1,8 und 2,0 lag.

DEPC-H₂O:

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

2.1.2.2 Gelelektrophorese und Blot

Die Auftrennung von 5 µg RNA je Probe erfolgte durch eine horizontale Agarose-Gel-Elektrophorese (Sambrook et al. 1989). Die RNA wurde mit einer äquivalenten Menge an RNA-Ladepuffer versetzt und bei 65 °C für 10 min denaturiert. Nach 5 min Abkühlung auf Eis konnten die Proben auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und in 1 x Morpholinopropansulfonsäure- (MOPS-) Puffer aufgetrennt werden. Die angelegte Spannung betrug in der Einlaufzeit 60 V und wurde anschließend für 3 h auf 70 V erhöht. Unter UV-Licht wurden die Ethidiumbromid-markierten 18S- und 28S-RNA Banden der ribosomalen RNA sichtbar gemacht, um die Gleichmäßigkeit der RNA-Beladung sowie etwaige RNA-Degradationen zu beurteilen.

Die im Gel elektrophoretisch aufgetrennte RNA wurde in Kapillarblot-Technik auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) übertragen. Als Transfermedium diente 20 x SSC. Nach 48 h wurde der Erfolg des Blottens durch den Transfer der 18S- und 28S-RNA Banden unter UV-Licht dokumentiert. Zur kovalenten Bindung der RNA an die Nylonmembran wurde diese unter UV-Licht von beiden Seiten mit jeweils 150 mJ bestrahlt (GS Gene Linker, Bio Rad, München).

1% Agarosegel: 1,2 g Agarose, 1,8 ml Formaldehyd 37%; 10 ml 10 x MOPS-Puffer; 100 ml a.i. H₂O.

10 x MOPS-Puffer: 0,01 M EDTA; 0,05 M Na-Acetat; 0,2 M MOPS; pH 7,0.

RNA-Ladepuffer (in µl): 1000 Formamid; 440 Formaldehyd 37%; 250 10 x MOPS-Puffer; 200 Ladepuffer; 10 Ethidiumbromid.

Ladepuffer: 50% Glycerin; 50% gesättigte Bromphenolblaulösung mit 47,5% Formamid.

20 x SSC: 350,6 g NaCl; 176,6 g Natriumzitraddihydrat; ad 2 l USF-Wasser; pH 7,0.

2.1.2.3 Radioaktive Markierung

2.1.2.3.1 Herstellung der radioaktiven Sonde

Die radioaktive Markierung der Sonde erfolgte mit Random-Oligonucleotiden als Primer basierend auf der von Feinberg und Vogelstein (1983) publizierten Methode unter Verwendung des Prime It II Random Primer Labelling Kit (Stratagen, La Jolla, USA) und dem radioaktiven Nukleotid Desoxycytidin-5'(α - ^{32}P)-triphosphat (^{32}P -dCTP; 3000 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$). Zu 2 ng der entsprechenden cDNA (humanes CARP oder Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase (GAPDH) als internes Standardprotein) wurden 10 μl Random 9-ner Primer gegeben und auf 34 μl Endvolumen mit a.i. H_2O aufgefüllt. Das Reaktionsgemisch wurde für 5 min bei 95 °C denaturiert, anschließend mit 10 μl dCTP 5 x Puffer, 5 μl ^{32}P -dCTP und 1 μl Klenow-Polymerase versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 2 μl EDTA-Stop-Mix wurde die Synthese-Reaktion beendet.

Die Trennung der radioaktiv markierten DNA-Sonde von ungebundener Radioaktivität erfolgte über eine Reinigungssäule (Stratagen, La Jolla, USA) mit STE-Puffer. Vor Zugabe der in denaturierter Lachssperma-DNA (SS-DNA) aufgefangenen Sonde in die Hybridisierungslösung wurde der Ansatz erneut für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend zur Verhinderung einer erneuten Basenpaarung auf Eis abgekühlt.

STE-Puffer (in mmol/l): 100 NaCl; 20 Tris HCl pH 7,5; 10 EDTA.

2.1.2.3.2 Hybridisierung der Membran

Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der Nylonmembran erfolgte durch Inkubation der Membran in 20 ml Prähybridisierungslösung und 50 μl denaturierter SS-DNA (10 mg/ml) für 2 h bei 42 °C in kontinuierlich rotierenden Hybridisierungsröhren (Mini Hybridisation Oven, Appligene, Heidelberg). Die Membran wurde nach Zugabe der Sonde bei 42 °C über Nacht hybridisiert und am nächsten Tag wie folgt gewaschen:

- 1 x für 15 min bei 42 °C mit 2 x SSPE
- 2 x für 20 min bei 62 °C mit 2 x SSPE / 2% Natriumdodezylsulfat (SDS).

Die Detektion der radioaktiv markierten Banden erfolgte durch Belichtung von Phosphoimagerplatten (GS 525 Molecular Imager SystemR, Bio Rad, München) oder Röntgenfilmen (HyperfilmR, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), welche manuell entwickelt wurden. Die densitometrische Auswertung der Phosphoimagerplatten wie auch

die Messung der Schwärzung der Röntgenfilme erfolgte mit der Gel-Densitometrie- und Auswertesoftware "Multi Analyst" (Bio Rad, München).

Zur Normalisierung der gemessenen CARP-Genexpression auf die Expression des Haushaltsgens GAPDH wurde die Membran zunächst für 5 min in einer Strip-Lösung gekocht und anschließend für 15 min bei RT in 2 x SSPE gewaschen. Nach erneuter Blockade unspezifischer Bindungsstellen erfolgten Inkubation mit der GAPDH-Sonde, Waschen und Auswertung der Membran analog zur CARP-Hybridisierung. Um eine Vergleichbarkeit verschiedener Northern-Blots untereinander zu erreichen, wurde jeweils auf das arithmetische Mittel der CARP-Expression der auf jedem Blot aufgetragenen Kontrollen normiert und dieser Wert gleich 1 gesetzt.

Prähybridisierungslösung: 25 ml 20 x SSPE; 50 ml Formamid; 10 ml 50 x Denhardts; 10 ml 20 x SDS; 5 ml DEPC-H₂O.

50 x Denhardts: 1% Ficoll; 1% Polyvinylpyrrolidone; 1% Bovines Serum Albumin.

20 x SSPE: 174 g NaCl; 27,6 g NaH₂PO₄ x 2H₂O; 7,4 g EDTA; ad 1000 ml USF-Wasser; pH 7,4 autoklavieren.

20 x SDS: 100 g SDS ad 500 ml DEPC-H₂O.

2 x SSPE / 2% SDS: 56,9 ml 20 x SSPE; 0,5 ml 20 x SDS; 442 ml DEPC-H₂O.

Strip-Lösung: 10 ml Tris pH 7,5; 4 ml 0,25 M EDTA pH 8,0; 50 ml 20 x SDS; 936 ml DEPC-H₂O.

Entwickler: 500 ml Roentoroll Part I; 25 ml Part II; 50 ml Part III; ad 2000 ml USF-Wasser.

Fixierer: 400 ml Superfix MRP Part I; 100 ml Part II; ad 2000 ml USF-Wasser.

2.1.3 Quantifizierung der CARP Protein-Expression im Western Blot

2.1.3.1 Protein-Isolierung

Von den in flüssigem Stickstoff gekühlten Herzen wurden 100 mg Gewebe abgewogen, mit einem Mörser in flüssigem Stickstoff pulverisiert und mit 500 µl Lysepuffer versetzt. Die Homogenisierung erfolgte bei 1.000 U/min für 2 x 30 sec mit einem Glas-Teflon-Potter. Zur Trennung der Proteinfraction von nicht aufgeschlossenem Gewebe, Bindegewebe und Zellkernen wurde das Homogenat für 5 min bei 4 °C und 14.000 U/min zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Für die Präparation der Proteine der Kardiomyozyten neonataler Ratten aus der 2-D Zellkultur wurden nach Entfernen des Nährmediums die Zellen mit 1000 µl Lysepuffer abgespült und aufgefangen.

Lysepuffer: 5% SDS; 50 mmol/l Tris pH 7,5; 250 mmol/l Succrose; 75 mmol/l Urea-Harnstoff; 3 mmol/l 1,4-Dithiothreitol (DTT).

2.1.3.2 Bestimmung der Protein Konzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Lysaten aus Herzgewebe und Rattenkardiomyozyten basierte auf der Methode nach Lowry et al. (1951). Die Absorption der Lösung wurde bei 540 nm photometrisch bestimmt. Als Standard diente Rinderserumalbumin in einem Konzentrationsbereich von 200 bis 2000 µg/ml. Die Bestimmung erfolgte mit Fertigreagenzien (DC-Assay, Bio Rad, München) nach Angaben des Herstellers.

2.1.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die vertikalelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte durch eine denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Sie wurde unter Verwendung eines 5%-igen Sammelgels und eines 10%-igen Trenngels (Tabelle 1) nach Laemmli (1970) durchgeführt.

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

	Trenngel 10%	Sammelgel 5%
30% Acrylamid (ml)	12	5,4
Tris (ml)	7,5 (1,5 M, pH 8,8)	2,5 (0,5 M, pH 6,8)
a.i. H ₂ O (ml)	12	5,4
10% SDS (µl)	300	100
10% Ammoniumpersulfat (µl)	150	50
TEMED (µl)	10	10

Die Beladung der Gele erfolgte mit 50 µg Protein je Slot. Zur Probenvorbereitung wurde die entsprechende Menge an Lysat mit 20 µl Ladepuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Neben den Proben wurde ein Molekulargewichtsstandard (Low Range Marker: 21,3 bis 112 kDa, Bio Rad, München) aufgetragen. Der Probeneinlauf fand bei 40 mA statt, die weitere Probenaufftrennung erfolgte bei 50 mA mit jeweils konstantem Gleichstrom.

Puffer (Stock): 4,84 g Tris; 1,0 g SDS; 3,0 g EDTA; ad 80 ml a.i. H₂O; auf pH 8,0 mit 5 M HCl titrieren; ad 100 ml mit a.i. H₂O.

Puffer (Arbeitsverdünnung): 10 ml Puffer (Stock); 10 mg Bromphenolblau.

Ladepuffer: 1 ml Puffer (Arbeitsverdünnung); 10 µl DTT-Lösung (50 µg DTT; 100 µl a.i. H₂O).

Laufpuffer: 125 mmol/l Tris-Base; 960 mmol/l Glyzin; ad 1 l USF-Wasser.

2.1.3.4 Immunoblot

Die im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine wurden im anschließenden Nassblot-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran (Protran[®], 0,45 µm Porengröße, Schleicher und Schüll, Dassel) übertragen. Der Protein-Transfer erfolgte für 2 h bei einem konstanten Gleichstrom von 400 mA. Der Blot-Puffer enthielt 20% Methanol, um eine Quellung des Gels während des Transfers zu verhindern. Der elektrophoretische Transfer wurde durch Anfärbung der geblotteten Proteine auf der Membran mit Ponceau-Rot-Lösung kontrolliert. Anhand des Molekulargewichtsstandards konnte die Membran bei etwa 45 kDa durchtrennt werden, um CARP (40 kDa) und Calsequestrin (CSQ; 52 kDa) parallel zu detektieren. Die Darstellung des internen Standardproteins CSQ diente zur Normalisierung der ermittelten CARP-Expressionswerte auf die eingesetzte Proteinmenge.

Alle folgenden Wasch- und Inkubationsschritte wurden unter ständiger Bewegung auf einem Schwenktisch (Polymax 1040, Heidolph, Kehlheim) durchgeführt. Die Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen erfolgte mit 5% in TBS mit TWEEN (TBST) gelöstem Magermilchpulver bei 4 °C o/n oder für 3 h bei RT. Nach 3-maligem Waschen für 15 min wurden die Membranen mit den aus dem Kaninchen stammenden, in TBST verdünnten polyklonalen Primärantikörpern vom IgG-Typ gegen CARP (1:2000) bzw. gegen CSQ (1:1500) bei RT inkubiert. Der CARP-IgG-Antikörper stammte von Dr. Pico Caroni, Friedrich Miescher Institut, Basel, Schweiz. Nach 1 h wurden die Membranen 4 x für 15 min gewaschen und anschließend mit einem Peroxidase-konjugiertem anti-Kaninchen IgG aus der Ziege als Sekundärantikörper (1:12500) bei RT für 1 h inkubiert. Nach 4-maligem Waschen für 15 min erfolgte die Entwicklung mit dem ECL Immunoblot-Detektionsreagenz (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Die Banden wurden durch eine Chemilumineszenzreaktion sichtbar gemacht. Nach der Entwicklung wurden die Filme densitometrisch mit der Software "Multi-Analyst" ausgewertet. Um die densitometrischen Ergebnisse aus unterschiedlichen Blots miteinander vergleichen zu können, wurde auch hier auf das arithmetische Mittel auf der CARP-Expression der jeweiligen Kontrollen der einzelnen Blots normiert und dieser Wert gleich 1 gesetzt.

Blot-Puffer: 25 mmol/l Tris Base; 192 mmol/l Glyzin; 20% Methanol; ad 2 l USF-Wasser.

TBST: 1 l TBS; 0,5 ml TWEEN.

2.1.4 Intrazelluläre Lokalisation von CARP

2.1.4.1 Fraktionierung

Für das Fraktionierungsexperiment wurden die humanen Herzmuskelgewebeproben unter Stickstoffkühlung zunächst zermörsert. Anschließend wurde hypotoner Puffer im Verhältnis 1:5 hinzugegeben. Die Proben wurden 30 min auf Eis inkubiert und anschließend homogenisiert (Potter S, Braun Biotech Melsungen). Zur Abtrennung der Kerne erfolgte eine „low-spin“-Zentrifugation (500 g, 5 min, 4 °C, Zentrifuge 5417 R, Eppendorf). Der Überstand wurde zur Trennung von Zytosol- und Membranfraktion einer „high spin“-Zentrifugation (100000 g, 1 h, 4 °C, Ultrazentrifuge L7-65 mit Festwinkelrotor Type 75 Ti; Polycarbonatröhrchen, Herolab, Wiesloch) unterzogen. Der klare Überstand entspricht der zytosolischen Fraktion. Das Pellet (entspricht der Membranfraktion) wurde in 50 µl hypotonem Lysepuffer, dem zur besseren Solubilisierung der Membranen 1% Triton X-100 zugesetzt wurde, aufgenommen. Ein Aliquot wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration abgenommen und wie die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Die Analyse des CARP-Proteingehaltes der einzelnen Zellkompartimente erfolgte mittels Western Blot analog 2.1.3.

Hypotoner Puffer: 10mM Tris-HCl pH 7,4; 1mM MgCl₂; 10 mM NaCl; 5mM CaCl₂; 2,8mM DTT.

Sucrose Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,4; 1mM MgCl₂; 2,2 mM Sucrose.

2.1.4.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die intrazelluläre Lokalisation wurde darüber hinaus fluoreszenzmikroskopisch ermittelt. Hierzu wurde ein Adenovirus hergestellt, dessen Transfektion zur Expression eines CARP-GFP Fusionsproteins führte. Die Herstellung des Adenovirus erfolgte analog der Herstellung der in Kapitel 2.2 beschriebenen Methode, allerdings enthielt hier der Transfervektor in monozistronischer Organisation die cDNA von CARP und n-terminal die cDNA des GFP. Für die fluoreszenzmikroskopische Darstellung des CARP-GFP Proteins wurden neonatale Rattenkardiomyozyten auf mit Gelatine beschichteten Deckgläschen kultiviert und mit dem Adenovirus transfiziert. Nach 48 h erfolgte mittels konfokaler Lasermikroskopie (Axiovert 100, Zeiss, Jena) die Bestimmung der intrazellulären Lokalisation anhand der Grünfluoreszenz des GFP-CARP-Fusionsproteins.

2.2 Adenovirale Überexpression

2.2.1 Gentransfer mithilfe rekombinanter Adenoviren

Die Herstellung rekombinanter Adenoviren erfolgte mit dem pAdEasy-System, einem Vektorsystem, das genomische und subgenomische Bestandteile des Adenovirus Typ 5 (Ad 5) enthält (He et al. 1998). Die damit produzierten rekombinanten Adenoviren sind für Säugetierzellen infektiös, durch Deletion der frühen Gene E1 und E3 aber replikationsdefizient. Die Produktion rekombinanter Adenoviren erfolgte nach dem in Abb. 2 dargestellten Schema (He et al. 1998).

Die Herstellung eines CARP-kompetenten Adenovirus erfolgte in drei Schritten. Zunächst wurde CARP in den pAdTrack-CMV Transfervektor kloniert. Der Transfervektor enthält in bizistronischer Organisation die cDNA für ein unter UV-Anregung sichtbares Reporterprotein (*green fluorescent protein*, GFP). Die Cytomegalie-Virus-(CMV) Promotoren dienen im später hergestellten Virus als starke Promotoren für die CARP- und GFP-Transkription in den infizierten Zellen.

Nach der Klonierung wurde der pAdTrack Shuttle mit den noch fehlenden genetischen Bestandteilen des Virus (pAdEasy-1) in *Escherichia coli* (E.coli) rekombiniert. Nach Vervielfältigung des rekombinanten Virus wurde dieses auf kultivierte Rattenkardiomyozyten gegeben und die erfolgreiche Transfektion durch die Fluoreszenz von GFP nachgewiesen.

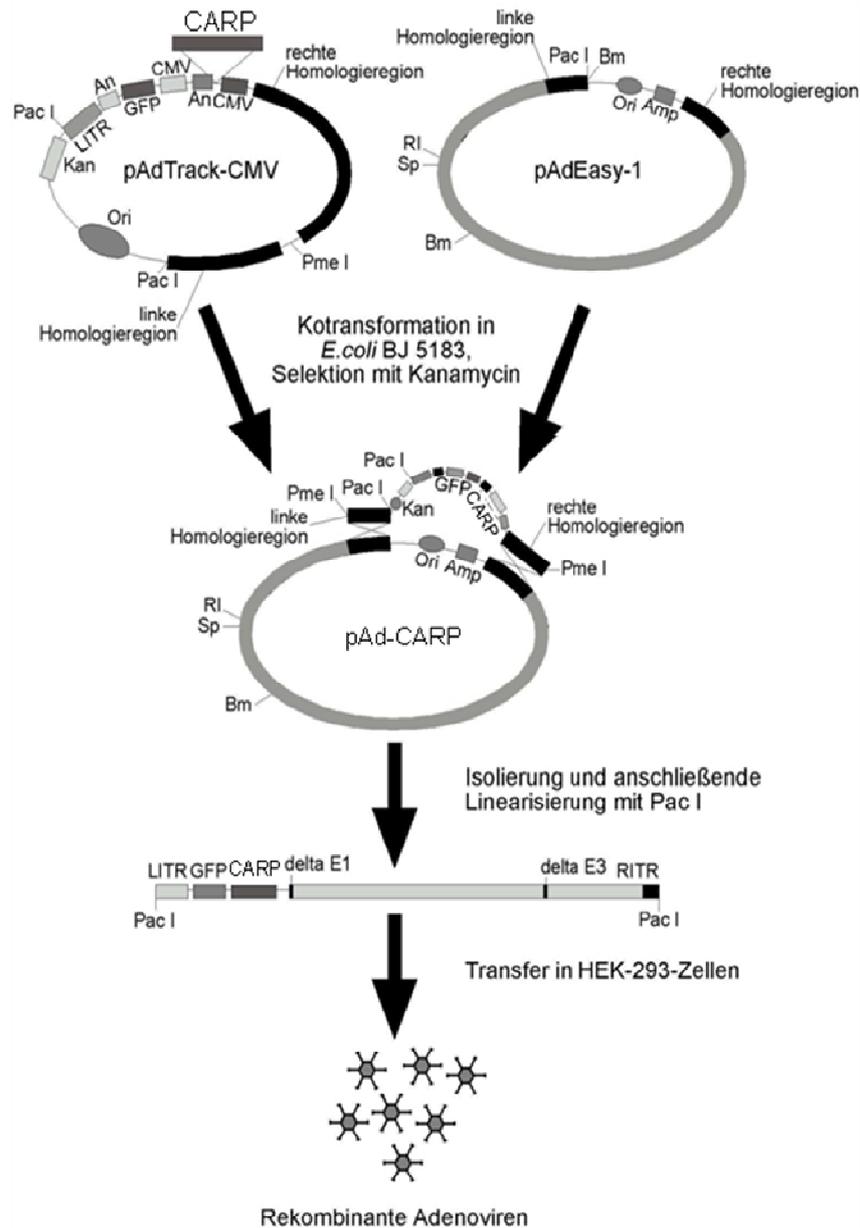


Abbildung 2: Herstellung rekombinanter Adenoviren mithilfe des pAdEasy-Systems. Nach Insertion des Fremdgenes in den Transfervektor pAdTrack-CMV durch Ligation erfolgt mittels homologer Rekombination des entstandenen Plasmids mit dem Vektor pAdEasy-1 in *E. coli* BJ 5183-Zellen die Herstellung rekombinanter adenoviraler DNA. Für die anschließende Produktion rekombinanter Adenoviren wurden HEK-293-Zellen verwendet (modifiziert nach He et al. 1998).

2.2.2 Herstellung des CARP-GFP-Shuttles

Als Vektor zur Einklonierung von CARP wurde der pAdTrack-CMV mit einer Länge von 9220 bp verwendet.

2.2.3 Insertion der CARP DNA in den Transfervektor

Zunächst wurde die komplementäre DNA (cDNA) von CARP (von Herrn Dr. Kluxen, Firma Merck KGaA, Darmstadt zur Verfügung gestellt) in den Transfervektor pAdTrack-CMV ligiert. Der Transfervektor enthält die cDNA für ein unter UV-Anregung sichtbares Reporterprotein (*green fluorescent protein*, GFP). Dadurch wurde in den folgenden Schritten die direkte Beobachtung der Effizienz von Transfektion und Infektion möglich. Die Insertion der CARP-DNA in den Vektor erfolgte durch eine Ligation mithilfe der T4-DNA-Ligase. DNA-Insert und Transfervektor wurden zuvor mit den gleichen Restriktionsendonukleasen, Kpn I und Hind III, behandelt.

Ligationsansatz: 400 U T4-DNA Ligase; 100-200 ng pAdTrack-CMV; molarer Überschuß von Insert:Vektor = 5:1; ad 10 µl Puffer.

Die Ligation erfolgte für die Dauer von 10 h bei einer Temperatur von 16 °C. Anschließend wurde die Ligase durch Hitzeinkubation (10 min bei 65 °C) inaktiviert. Von der Plasmid-DNA wurden 2 µl für die Transformation von 40 µl elektrokompetenten E. coli XL1-Blue-Zellen durch Elektroporation verwendet. Danach erfolgte die Selektion auf positive Transformanden durch Anzucht auf kanamycinhaltigen (50 µg/ml) LB-Agarplatten über Nacht bei 37 °C.

2.2.4 Herstellung rekombinanter adenoviraler DNA mittels homologer Rekombination

Der nächste Schritt zur Produktion rekombinanter Adenoviren umfasste die homologe Rekombination. Zunächst wurde der Vektor pAdTrack-CMV, der die CARP cDNA enthält, durch einen Restriktionverdau mit dem Enzym Pme I linearisiert und anschließend aufgereinigt. Zur homologen Rekombination wurde der linearisierte Transfer-Vektor mit dem supercoiled vorliegenden Vektor pAdEasy-1 mittels Elektroporation in elektrokompetente E. coli BJ 5183-Zellen kotransformiert.

Transformationsansatz: 500 ng pAdTrack CMV; 100 ng pAdEasy-1; 20 µl E. coli (Stamm BJ 5183).

Zu dem Transformationsansatz wurden 250 µl LB-Medium gegeben. Anschließend folgte eine Inkubation für 20 min bei 37 °C. Zur Selektion homolog rekombinierter Vektoren wurden diese auf kanamycinhaltigen (50 µg/ml) LB-Agarplatten angezogen. Die erhaltenen Klone wurden nach einer Plasmidpräparation mit einer analytischen Restriktion auf eine homologe Rekombination hin überprüft.

LB-Festmedium: 7,5 g Agarose; 5 g Tryptone; 2,5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl ad 500 ml USF Wasser; autoklavieren.

LB-Flüssigmedium: 5 g Tryptone; 2,5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; 500 µl NaOH; ad 500 ml USF-Wasser; autoklavieren.

2.2.5 Transfektion von HEK-Zellen mit adenoviralen Konstrukten

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

HEK 293 Zellen wurden im Zellkulturschrank bis zu einer Kohärenz von 70% kultiviert (Ø 35 mm Zellkulturschalen). Nach Absaugen des HEK-Nährmediums und der Zugabe von 1000 µl OptiMEM je Schale erfolgte die Inkubation der Zellen bei 37 °C für 60 min. In zwei Probengefäße wurde parallel zu jeweils 250 µl OptiMEM 10 µg Plasmid-DNA bzw. 6 µl Lipofectamine2000 (Invitrogen) pipettiert. Dem Schütteln der Probengefäße für 60 sec (Vortex) folgte eine Inkubation von 5 min bei RT. Anschließend wurden beide Ansätze gemischt, erneut geschüttelt und schließlich für 20 min bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe des Ansatzes zu den bereits mit OptiMEM versorgten HEK 293 Zellen. Nach 6 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und durch frische HEK-Medium ersetzt. Der Erfolg der Transfektion konnte in den folgenden Tagen anhand der GFP-Expression fluoreszenzmikroskopisch überprüft werden. Nach 9 bis 11 Tagen lösten sich die Zellen von den Zellkulturschalen und begannen zu lysieren.

HEK-Nährmedium: Dulbeccos Minimal Essential Medium (DMEM), 10% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FKS), 1% L-Glutamin und 1% Penicillin G und Streptomycin (P/S).

2.2.6 Large-scale-Präparation der Adenoviren

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

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

Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS): 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4(\text{H}_2\text{O})_7$, 0,2 g KH_2PO_4 , USF-Wasser ad 1000 ml; pH mit HCl auf 7,4 einstellen; autoklavieren.

2.2.7 Aufreinigen der Adenoviren

2.2.7.1 Caesiumchlorid-Gradientenzentrifugation

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

2.2.7.2 Dialyse

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

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

2.2.7.3 DNA Extraktion

Zur DNA Präparation wurden zunächst 250 µl Virusdialysat mit 350 µl TNE-Puffer versetzt. Um die Viruskapsel zu zerstören, wurden 60 µl SDS (10%) zugegeben und die Proben für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 66 µl 2,5 M beta-Mercaptoethanol zur Spaltung der Disulfidbrücken der Proteine erfolgte eine Inkubation von 30 min bei 37 °C. Im Anschluss wurden 19,5 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben und die Proben erneut bei 37 °C für 30 min inkubiert. Alle weiteren Schritte der DNA-Extraktion wurden auf Eis ausgeführt. Zunächst erfolgte die Zugabe von 800 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:25:1; pH 7,5). Daraufhin wurden die Probengefäße für 30 sec geschüttelt (Vortex) und anschließend zur Beschleunigung der Phasenauftrennung für 5 min bei 4 °C mit 12000 g zentrifugiert (Centrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg). Danach wurde die hydrophile DNA-haltige Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Die hydrophobe, phenolische Phase wurde gesondert entsorgt. Der Überstand wurde mit 800 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, um das restliche Phenol auszuwaschen, kurz geschüttelt (Vortex), erneut für 5 min bei 4 °C mit 12000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Nach Zugabe von 600 µl Isopropanol und 60 µl 3 M Natriumacetat pH 5,4 wurde die DNA bei -20 °C für 2 h gefällt. Anschließend wurde die DNA mit 20800 g bei 4 °C für 30 min pelletiert, der klare Überstand verworfen und das Pellet in 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 4 °C, 20.800 g) wurde der Überstand komplett abgesaugt, die DNA für 10 min an der Luft getrocknet und schließlich in 20 µl a.i. H₂O gelöst.

TNE-Puffer: 200 µl 5M NaCl, 100 µl 1 M TrisHCl pH 7,4, 20 µl 0,5 M EDTA und 9,7 ml a.i. H₂O.

2.2.7.4 Photometrische Quantifizierung der DNA

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

21 µg (1 pmol) Virus-DNA entsprechen $6,23 \times 10^{11}$ Viruspartikeln, von denen etwa 1/30 biologisch aktiv sind. Der somit errechnete Titer biologisch aktiver Viren (bav) lag bei 13×10^{11} bav/ml.

2.2.7.5 Agarose-Gelelektrophorese

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

10x TAE-Puffer: 48,46 g Tris-Acetat, 3,72 g EDTA, USF-Wasser ad 1000 ml; pH 8,0.

1x TAE-Puffer: 100 ml 10x TAE-Puffer, USF Wasser ad 1000 ml.

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

2.2.7.6 Titerbestimmung an neonatalen Rattenkardiomyozyten

Zur Überprüfung der Effizienz des Gentransfers wurden neonatale Rattenkardiomyozyten mit den verschiedenen Viren und mit unterschiedlichen Titern infiziert. Nach 48 h erfolgte die Kontrolle der Infektionseffizienz durch Beurteilung der an einem konfokalen Lasermikroskop (Axiovert 100, Zeiss, Jena) beobachteten und dokumentierten Grünfluoreszenz (GFP-Expression) der Zellen.

2.3 2 D-Modell

2.3.1 Zellpräparation

2.3.1.1 Tierhaltung

Männliche und weibliche Wistar-Ratten aus Eigenzucht des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Erlangen-Nürnberg wurden bei handelsüblichem Labortierfutter (Altromin[®]) und Leitungswasser ad libitum gehalten. Für die Versuchsdurchführung wurden je Präparation zwischen 40 und 80 neonatale Tiere aus verschiedenen Würfen im Alter von 1 bis 3 d verwendet.

2.3.1.2 Organentnahme

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

CBFHH: 136,9 mM NaCl, 5,36 mM KCl, 0,81 mM MgSO₄(H₂O)₇, 5,55 mM Glucose, 0,44 mM KH₂PO₄, 0,34 mM Na₂HPO₄(H₂O)₇, 20 mM [2-Hydroxyethyl]piperazin –N-[2-ethansulfonsäure] (HEPES) gelöst in destilliertem, deionisiertem und pyrogenfreiem Wasser (a.i. H₂O, pH 7,5). Zur Herstellung wurden Stammlösungen benutzt, die mit a.i. H₂O angesetzt und autoklaviert wurden. Die Glucose- und HEPES-Stämme, welche nicht autoklavierbar sind, wurden steril filtriert. Stammlösungen und CBFHH wurden bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

2.3.1.3 Trypsinverdau

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

Nach Abtrennung der Gefäßstiele sowie der Vorhöfe wurden die Herzen in eine neue Kulturschale mit CBFHH überführt. Die Herzkammern wurden eröffnet und nach dreimaligem Spülen mit je 10 ml CBFHH zum Entfernen von Blutresten erfolgte die Zerkleinerung der Herzen mit einer gebogenen chirurgischen Präparationsschere bis auf eine Größe von etwa 1 mm². Mit einer mit CBFHH benetzten, weitlumigen Pipette wurde der Gewebepulver in ein 50 ml Sammelgefäß (Falcon, Heidelberg) transferiert, in dem nach

weiterem dreimaligen Spülen mit je 10 ml CBFHH anschließend der enzymatische Gewebeaufschluss mit Trypsin nach einer modifizierten Methode von Webster et al. (1993) erfolgte. Die zerkleinerten Gewebestücke wurden mit 10 ml (bei 60-70 Herzen) Trypsin-Arbeitslösung und 10 min Inkubation unter kontinuierlichem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde der trübe Überstand verworfen. Nach Resuspension der Gewebestücke in 10 ml Trypsin-Arbeitslösung und 10 min Inkubation unter fortwährendem Schwenken erfolgte erstmalig die Überführung des Überstandes in ein steriles 50 ml Sammelgefäß, das bereits 2 ml hitzeinaktiviertes FKS zur Inaktivierung des Trypsins enthielt. Nach Inkubation der Gewebestücke in 9 ml Trypsin-Arbeitslösung und Titrierung (25x; weitlumige Pipette) wurde der Überstand ebenfalls in das Sammelgefäß überführt. Bei den weiteren Inkubationen mit Trypsin-Arbeitslösung wurde der Überstand bei Einsetzen einer Trübung nach etwa 3 bis 5 min abgenommen, um einen Überverdau zu vermeiden. Dieser Wechsel von Proteinverdau und Inaktivierung des Trypsins durch in der DNase-Arbeitslösung enthaltenes FKS erfolgte unter Reduktion der Volumina in 0,5 ml Schritten auf 6 ml (Trypsin-Arbeitslösung) bzw. 5 ml (DNase-Arbeitslösung), jeweils nach Füllung eines Sammelgefäßes. Die Durchführung des kompletten Verdau der Gewebestücke dauerte bei 60-70 Herzen im Mittel 4 h. Gefüllte Sammelgefäße wurden währenddessen auf Eis gelagert.

Im Anschluss an den Verdau wurden die Sammelgefäße in einer Kühlzentrifuge mit Schwenkbecherrotor zentrifugiert (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg; 60 g, 15 min, 4 °C). Nach Abnahme des klaren Überstandes erfolgte die Resuspension der pelletierten Zellen in jeweils 2 ml Nicht-Kardiomyozyten-Medium (NKM) sowie das Poolen in einem Sammelgefäß (50 ml). Noch vorhandene extrazelluläre DNA wurde durch Zugabe von 0,8% des Gesamtvolumens an DNase-Stammlösung verdaut und wiederum bei 60 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes in 32 ml NKM aufgenommen. Die Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb (Maschengröße: 250 µm) gegeben und das Sammelgefäß und das Sieb mit 10 ml NKM gespült. Nach Färbung mit Trypanblau (250 µl Trypanblau, 150 µl PBS, 100 µl Zellsuspension) wurde die Zahl der vitalen, in diesem Fall nicht gefärbten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde auf Gewebekulturschalen (Ø 10 cm, Falcon, Heidelberg) verteilt und für 60 bis 90 min bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert, um die Kardiomyozyten durch ihre im Vergleich zu den Nicht-Kardiomyozyten deutlich langsamere Anheftung an die Kulturschale im Überstand anzureichern (Preplating).

Anschließend wurden die Kardiomyozyten von den Schalen gespült und in ein Sammelgefäß (50 ml) gepoolt. Die durch das sogenannte Preplating angereicherten

Kardiomyozyten wurden nach erneuter Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer für die 2D-Zellkultur verwendet.

Trypsin-Stammlösung: 100 mg Trypsin pro ml CBFHH bei 4 °C über Nacht rotierend lösen. Vor Gebrauch durch 0,2 µm Filter steril filtrieren.

P/S Stammlösung (100x): 10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin.

DNase-Stammlösung: 100 mg DNase in 50 ml PBS steril ansetzen. Durch 0,2 µm Filter steril filtrieren und bei -20 °C lagern.

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

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

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

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

2.3.2 2-D Zellkultur

2.3.2.1 Kultivierung der Kardiomyozyten

Vor Aussaat wurden die Zellkulturschalen (Ø 3,5 cm) mit Gelatine in einer Konzentration von 50 µg/ml PBS beschichtet und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Beschichtung diente einer besseren und schnelleren Adhäsion der Kardiomyozyten. Anschließend wurden 1x 10⁶ Zellen pro Kulturschale in Kardiomyozyten-Medium (KM) ausgesät. Der im KM-Medium enthaltene Zellteilungsinhibitor 5'-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) sollte eine Überwucherung der postmitotischen Kardiomyozyten mit sich in vitro fortwährend teilenden Zellen, wie Fibroblasten oder Endothelzellen, verhindern. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank gehalten, ein Mediumwechsel fand alle 48 h statt.

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

2.3.3 Adenovirale Überexpression von CARP

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

2.4 Expressionsbestimmung mittels PCR

2.4.1 Reverse Transkription

Nach der Gehaltsbestimmung wurden 2 µg RNA in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit a.i. H₂O auf 11 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von je 1 µl Random Primer (p(dN)₆, Roche Diagnostics, Mannheim) wurde zum Denaturieren für 5 min bei 94 °C inkubiert. Nach raschem Abkühlen auf Eis wurde der Reaktionsmix zugegeben. Zur Durchführung der reversen Transkription wurde für 50 min bei 42 °C inkubiert und anschließend die reverse Transkriptase durch erneute Inkubation bei 94 °C für 5 min inaktiviert. Nach erneutem Abkühlen auf Eis wurde die durch die reverse Transkription erhaltene cDNA mit 60 µl a.i. H₂O verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Reaktionsmix:

5 x First Strand Buffer (Invitrogen)	4 µl
DNTP-Mix (10 mmol/l), Peqlab)	2 µl
DTT (0,1 mol/l, Invitrogen)	1 µl
M-MLV Reverse Transkriptase (Invitrogen)	1 µl

2.4.2 TaqMan-PCR

2.4.2.1 Prinzip der Echtzeit PCR

Die mRNA-Expression wurde mittels quantitativer real-time PCR auf einem ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, Foster City, USA) bestimmt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer Detektion und Quantifizierung des Amplifikationsproduktes in Echtzeit während der Amplifikation. Hierzu wurde für jedes Gen eine fluorogene Sonde konstruiert, die aus einem Oligonukleotid besteht, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (6-Carboxyfluorescein; FAM) markiert ist, während das 3' Ende einen Quencher-Farbstoff (6-Carboxy-teramethylrhodamin;

TAMRA) trägt. Wird die intakte Sonde durch ultraviolettes Licht angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs durch den Quencher aufgrund seiner räumlichen Nähe unterdrückt. Während der PCR hybridisiert die Sonde spezifisch mit dem komplementären Abschnitt des Matrizen-Stranges zwischen dem forward und dem reverse Primer. In der Extensionsphase hydrolysiert die im Reaktionsansatz enthaltene Polymerase AmpliTaq Gold aufgrund ihrer 5'-3' Exonuklease-Aktivität die an die Zielsequenz hybridisierte Sonde. Durch die daraus resultierende Aufhebung der räumlichen Nähe zwischen Reporter und Quencher kommt es nach Anregung durch ultraviolettes Licht zu Fluoreszenz, die entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkt mit jedem PCR-Zyklus ansteigt und in Echtzeit während des gesamten PCR-Laufes aufgezeichnet werden kann. Durch die statistische Anlagerung der Sonde und Primer ist die Geschwindigkeit des Anstieges der Fluoreszenz direkt proportional zur Expression des entsprechenden Gens. Zur Quantifizierung kann der Zeitpunkt während des Laufes bestimmt werden, zu dem die Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert übersteigt (cycle threshold, ct-Wert). Da bei jedem Zyklus der PCR eine Verdoppelung der Zielsequenzen stattfindet, gilt: Expression [Gen X] proportional zu $2^{-\text{ct-Wert}}$.

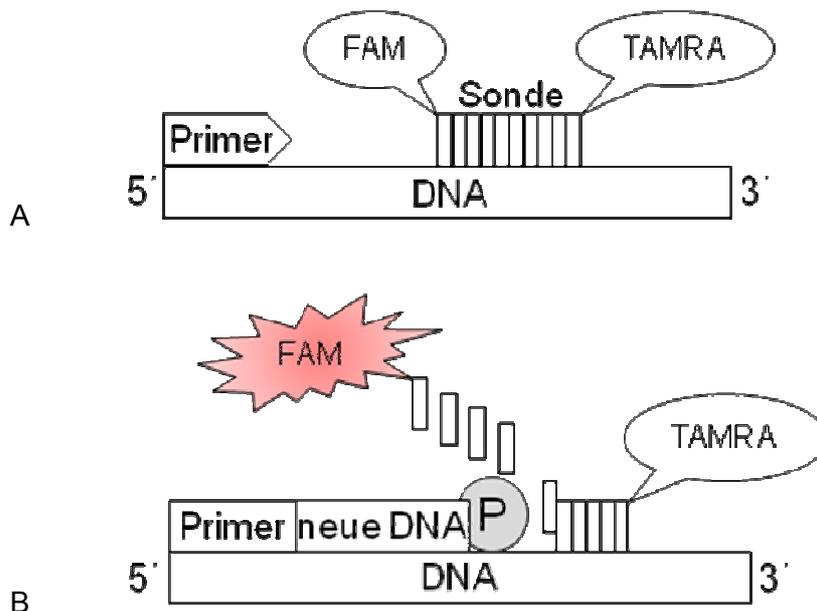


Abbildung 2: Prinzip der TaqMan-PCR

A: Sequenzspezifische Anlagerung der Sonde und eines Primers. B: Synthese der neuen DNA und Hydrolyse der Sonde durch die Polymerase (P). Durch die räumliche Trennung von FAM und TAMRA kann die FAM ein Fluoreszenzsignal emittieren.

2.4.2.2 Design und Optimierung der Sonden und Primer

Die Auswahl von Sonden und Primern mit optimierter Schmelztemperatur, Sekundärstruktur, Basenzusammensetzung und Länge des Amplikons erfolgte mittels der Software "ABI Primer Express" (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Oligonukleotide mit den optimierten Sequenzen wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Um unspezifische Amplifikationen von genomischer DNA zu vermeiden, wurden die Sonden so gewählt, dass ihre Zielsequenzen die Grenze zwischen zwei benachbarten Exons überschreiten. Zur Überprüfung der Spezifität der Primerpaare wurden RT-PCR Reaktionen durchgeführt und die PCR-Produkte auf einem zwei Prozentigen Agarosegel analysiert. Bei nur einer sichtbaren Bande mit der Größe des erwarteten Amplikons wurde das Primerpaar als spezifisch angenommen. Die Sequenzen der Sonden und Primer sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Sequenzen der Primer und Sonden

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	Sonde
SERCA2A	AGT GGC TGA TGG TGC TGA AA	GCA CCC GAA CAC CCT TAC AT	TTA CTC CAG TAT TGC AGG CTC CAG GTA
α-MHC	ACA GAG TGC TTC GTG CCT GAT	CGA ATT TCG GAG GGT TCT GC	ACA GTC ACC GTC TTG CCG TTT TCA GT
β-MHC	GCC TAC AAG CGC CAG GCT	CAT CCT TAG GGT TGG GTA GCA	TTC ATT CAG GCC CTT GGC GCC AAT
ANF	CTG GGA CCC CTC CGA TAG AT	TCG GTA CCG GAA GCT GTT G	TAG TCC GCT CTG GGC TCC AAT CCT
MLC	CAG CCA GCC TCA GAC ACC AT	CTT GTC AAT GAA GCC GTC TCT GT	TGA TTG TGA AGG CCT CCT TGA ACT G
GAPDH	AAC TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA	CAG TCT TCT GAG TGG CAG TGA TG	ATG GAC TGT GGT CAT GAG CCC TTC CA
PLB	GCA GCT GAG CTC CCA GAC TT	TTT CCA TGA TGC CAG GAA GAC	CAC AGA AGC CAA GGC CTC CTA AAA GGA G

2.4.2.3 Versuchsbedingungen

Der beschriebene Reaktionsansatz versteht sich als Ansatz für eine Probe. Für eine entsprechend höhere Probenzahl n wurde ein n -facher Ansatz berechnet. Die Temperaturbedingungen waren bei jedem Lauf identisch und sind in Tabelle 4 aufgeführt. Zur Quantifizierung der Expression wurde für jedes Gen und jeden Lauf eine Verdünnungsreihe mitgeführt. Dazu wurde eine Mischung aus allen für den jeweiligen Lauf verwendeten cDNAs erstellt und diese in relativen Standardkonzentrationen von 1, 0,5, 0,25, 0,125 und 0,00625 eingesetzt. Die aus der Standardreihe erhaltenen relativen Konzentrationen wurden für jede Probe auf die relative Konzentration von GAPDH als internem Standard bezogen. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmung ausgeführt. Bei jedem PCR-Lauf wurde eine NTC (*no template control*, Kontrolle ohne DNA, Wasser-Kontrolle) mitgeführt. Die Messung der Fluoreszenzsignale am Ende der PCR und deren Analyse wurden mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detection Systems und der ABI

PRISM 7700 Sequence Detection System Software Version 1.7 durchgeführt. In Abbildung 3 sind exemplarische Fluoreszenzkurven der Verdünnungsreihe eines TaqMan-PCR Laufes gezeigt.

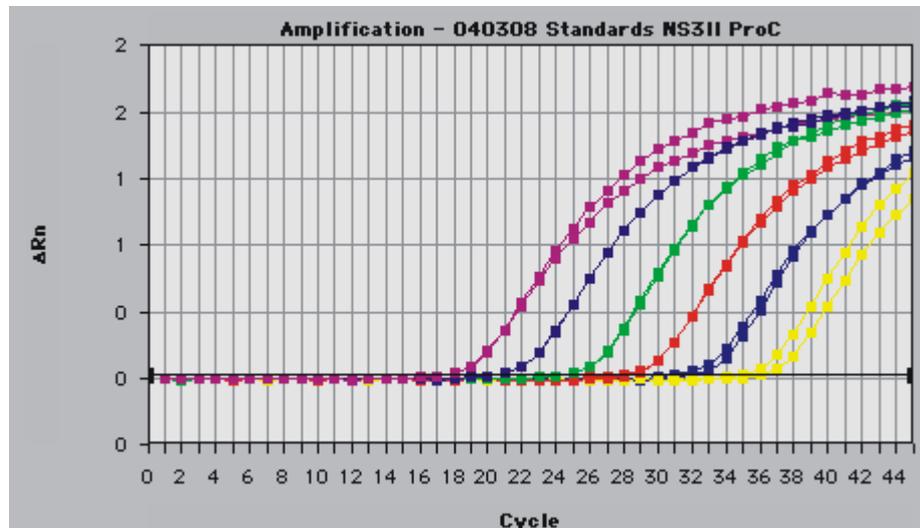


Abbildung 3: Fluoreszenzkurven der Verdünnungsreihe eines exemplarischen TaqMan-PCR-Laufes. Kurven gleicher Farbe repräsentieren die identische Verdünnung, die hier jeweils in Dreifachbestimmung gemessen wurde.

Reaktionsansatz TaqMan:

cDNA		2,0 µl
zehnfach konzentrierter Reaktionspuffer		2,5 µl
MgCl ₂ (25 mmol/l)		3,0 µl
Forward Primer (20 mmol/l)		0,5 µl
Reverse Primer (20 mmol/l)		0,5 µl
Sonde		Menge für 100 nmol/l Endkonzentration
dNTP-Mix (10 mmol/l)		2,0 µl
Taq-Polymerase		0,125 µl
H ₂ O	ad	25 µl

Tabelle 4: Temperaturbedingungen für TaqMan-PCR

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
50 °C	1 min	1
95 °C	10 min	1
94 °C 58 °C	15 s 1 min	45

2.5 Statistische Auswertung

Alle gezeigten Werte sind als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Für die Ergebnisse wurde die statistische Signifikanz entweder mit dem t-Test für unverbundene Stichproben oder dem ANOVA-Test und anschließend dem post hoc Test nach Newman-Keuls überprüft. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant angenommen.

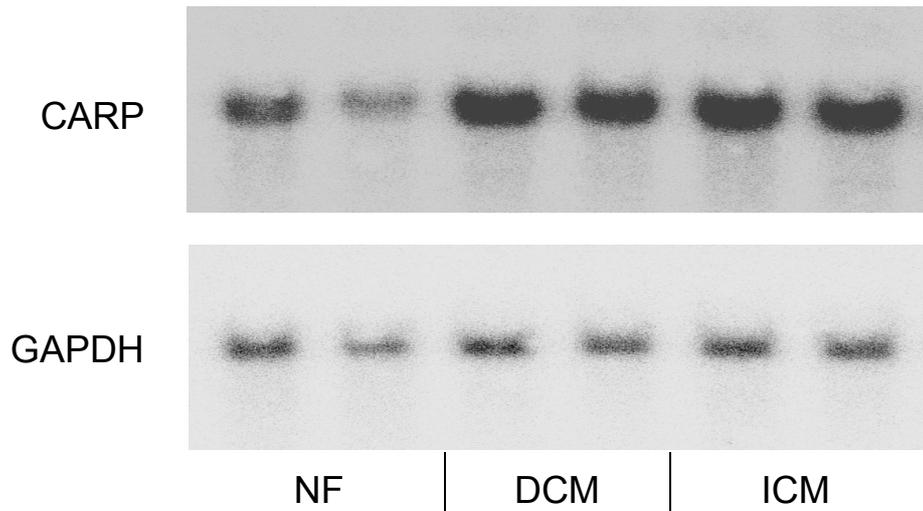
3 Ergebnisse

3.1 CARP mRNA-Expression

Die Gen Expression von CARP wurde in linksventrikulärem Herzmuskelgewebe von Spenderherzen und in Herzmuskelgewebe von terminal herzinsuffizienten Patienten mit dilatativer oder ischämischer Kardiomyopathie mittels Northern-Blot-Analyse bestimmt.

Es zeigte sich eine um 1,7-fach erhöhte Expression der CARP mRNA in insuffizientem Myokard im Vergleich zu gesundem Herzmuskelgewebe. Unterschiede in der mRNA Konzentration zwischen Herzmuskelgewebe von Patienten mit dilatativer oder ischämischer Kardiomyopathie konnten nicht festgestellt werden.

A



B

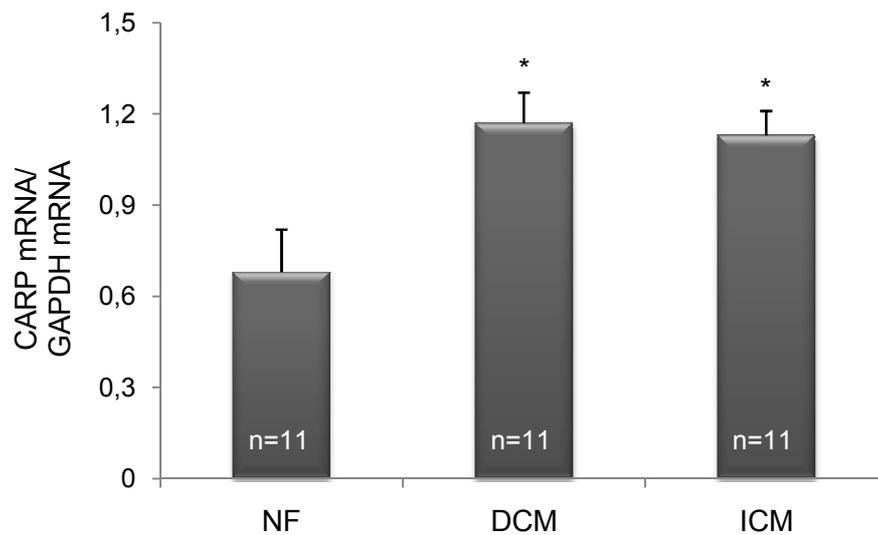


Abbildung 4: Vergleich der CARP-Expression im Northern-Blot zwischen Patienten mit dilatativer (DCM) oder ischämischer (ICM) Kardiomyopathie und gesunden Spenderherzen (NF). (A) Repräsentatives Autoradiogramm eines Northern Blots, der mit ^{32}P -markierter cDNA-Sonde für CARP und GAPDH hybridisiert wurde. (B) Densitometrische Auswertung. Alle Werte sind auf die GAPDH mRNA-Expression normalisiert. * $p < 0,05$ vs. NF

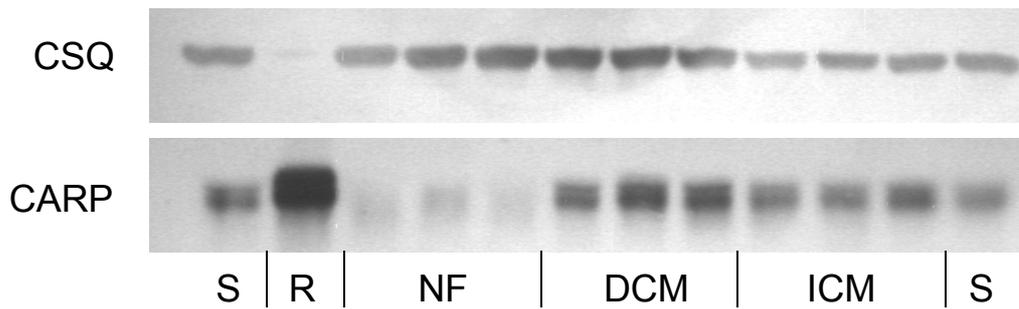
3.2 CARP Proteinexpression

Die Proteinexpression von CARP wurde in linksventrikulärem Herzmuskelgewebe von Spenderherzen und in Herzmuskelgewebe von terminal herzinsuffizienten Patienten mit dilatativer oder ischämischer Kardiomyopathie mittels Western-Blot-Analyse bestimmt.

Für die Untersuchungen der CARP-Expression in vivo standen ventrikuläre Gewebeproben aus 11 gesunden Spenderherzen sowie 11 Proben aus explantierten Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie bzw. 9 Proben mit Herzen, denen eine ischämische Kardiomyopathie zu Grunde lag, zur Verfügung.

Im Vergleich zu den gesunden Spenderherzen zeigte sich in den Proben der insuffizienten Herzen eine Erhöhung der CARP Expression um das 1,8 -fache. Ein signifikanter Unterschied der CARP Expression zwischen Patienten mit ischämischer oder dilatativer Kardiomyopathie bestand nicht.

A



B

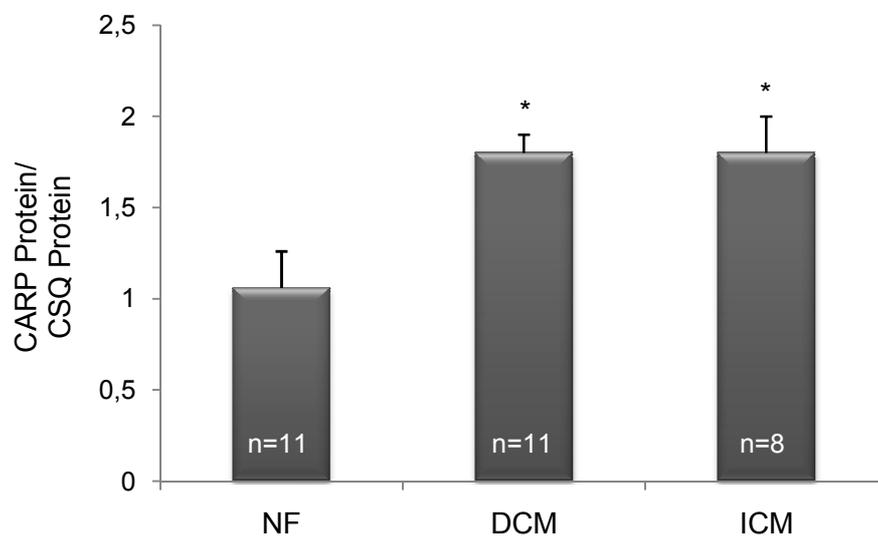


Abbildung 5: Vergleich der CARP Proteinexpression in humanem linksventrikulärem Gewebe aus gesunden Spenderherzen (NF) und explantierten Herzen von Patienten mit dilatativer (DCM) oder ischämischer (ICM) Kardiomyopathie. (A) Repräsentativer Ausschnitt eines Western-Blots für CARP und Calsequestrin (CSQ). Als Kontrolle diente Lysat aus KM (R) in denen CARP adenoviral überexprimiert wurde. Zum Vergleich mehrerer Blots wurde ein Lysat aus unterschiedlichen humanen Myokardproben (S) auf jedem Blot mitgeführt. (B) Densitometrische Auswertung. Alle Werte wurden auf CSQ normalisiert. * $p < 0,05$ vs. NF.

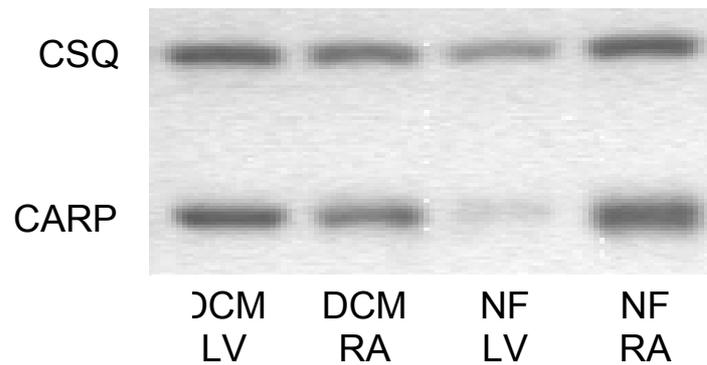
3.3 CARP-Proteinexpression in rechten Vorhöfen

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen in rechtsatrialem Herzmuskelgewebe gesunder Spenderherzen und in insuffizientem Herzmuskelgewebe von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie erfolgte ebenfalls mittels Western-Blot-Analyse.

In Vorhöfen gesunder Spenderherzen zeigte sich im Vergleich zur Expression im linken Ventrikel eine signifikant höhere Expression von CARP.

Der Expression von CARP in gesundem und insuffizientem rechtsatrialen Gewebe unterschied sich nicht signifikant. Insuffizientes atriales Herzmuskelgewebe zeigte ein ähnliches Expressionsniveau wie insuffizientes linksventrikuläres Herzmuskelgewebe.

A



B

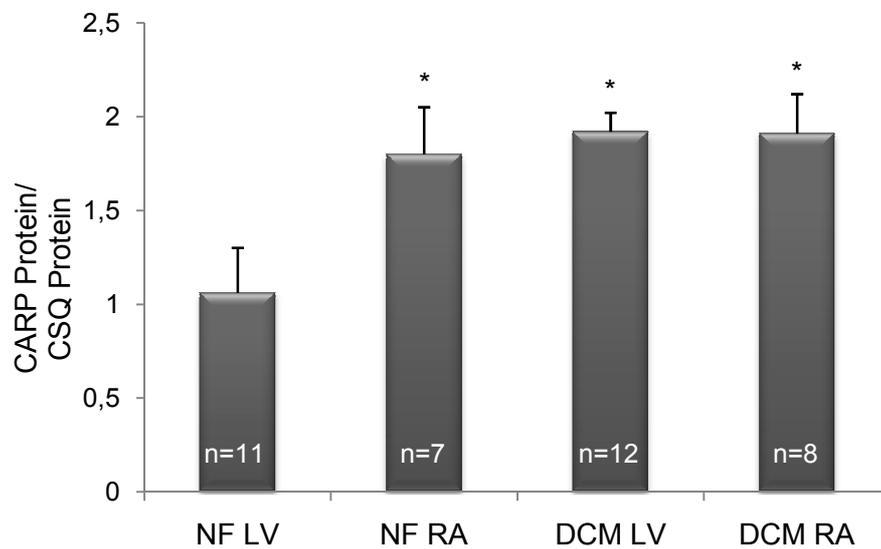


Abbildung 6: Vergleich der CARP Proteinexpression in rechten Vorhöfen (RA) und linken Ventrikeln (LV) von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und gesunden Spenderherzen (NF). (A) Repräsentativer Ausschnitt aus einem Western-Blot für CARP und Calsequestrin (CSQ). (B) Densitometrische Auswertung. Alle Werte wurden auf CSQ normalisiert. * $p < 0,05$ vs. NF LV.

3.4 Intrazelluläre Lokalisation

3.4.1 Fraktionierungsexperiment

Die Auftrennung der Gewebeproben in nukleäre (N), zytosolische (Z) und Membranfraktionen (M) zeigte, dass CARP sowohl in gesundem Myokard als auch in insuffizientem Myokard überwiegend im Zellkern lokalisiert ist. In geringen Mengen konnte es im Zytosol nachgewiesen werden. In Membranen hingegen konnte CARP nicht detektiert werden.

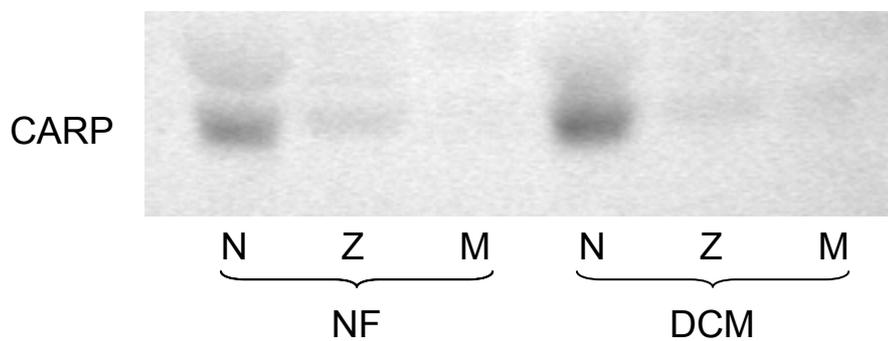


Abbildung 7: Auftrennung des Herzmuskelgewebes in Kern- (N), Zytosol- (Z) und Membranfraktion (M). Repräsentativer Western-Blot für CARP.

3.4.2 Fluoreszenz

Neonatale Kardiomyozyten wurden mit Ad.CARP-GFP-Virus infiziert und 48 Stunden inkubiert. Das CARP-GFP Fusionsprotein zeigte sich im Kern angereichert. Im Zytosol war es ebenfalls, allerdings in deutlich niedrigerer Konzentration vorhanden.

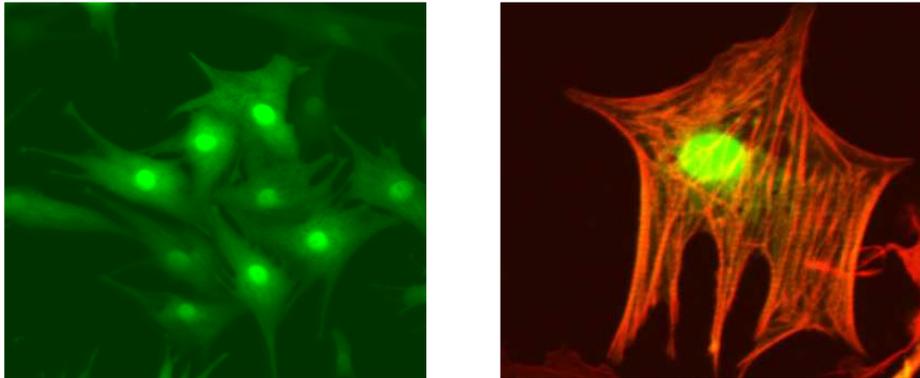


Abbildung 8: Intrazelluläre Lokalisation von CARP in neonatalen Rattenkardiomyozyten. Rechts Darstellung des CARP-GFP Proteins (grüne Fluoreszenz). Links zusätzliche Darstellung von α -Aktinin (rote Fluoreszenz).

3.5 Adenovirale Überexpression

3.5.1 Adenovirale Infektionsüberprüfung

Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden mit unterschiedlicher MOI mit Ad.CARP und dem Kontrollvirus infiziert. Die Infektion wurde mittels des co-exprimierten GFP fluoreszenzmikroskopisch kontrolliert.

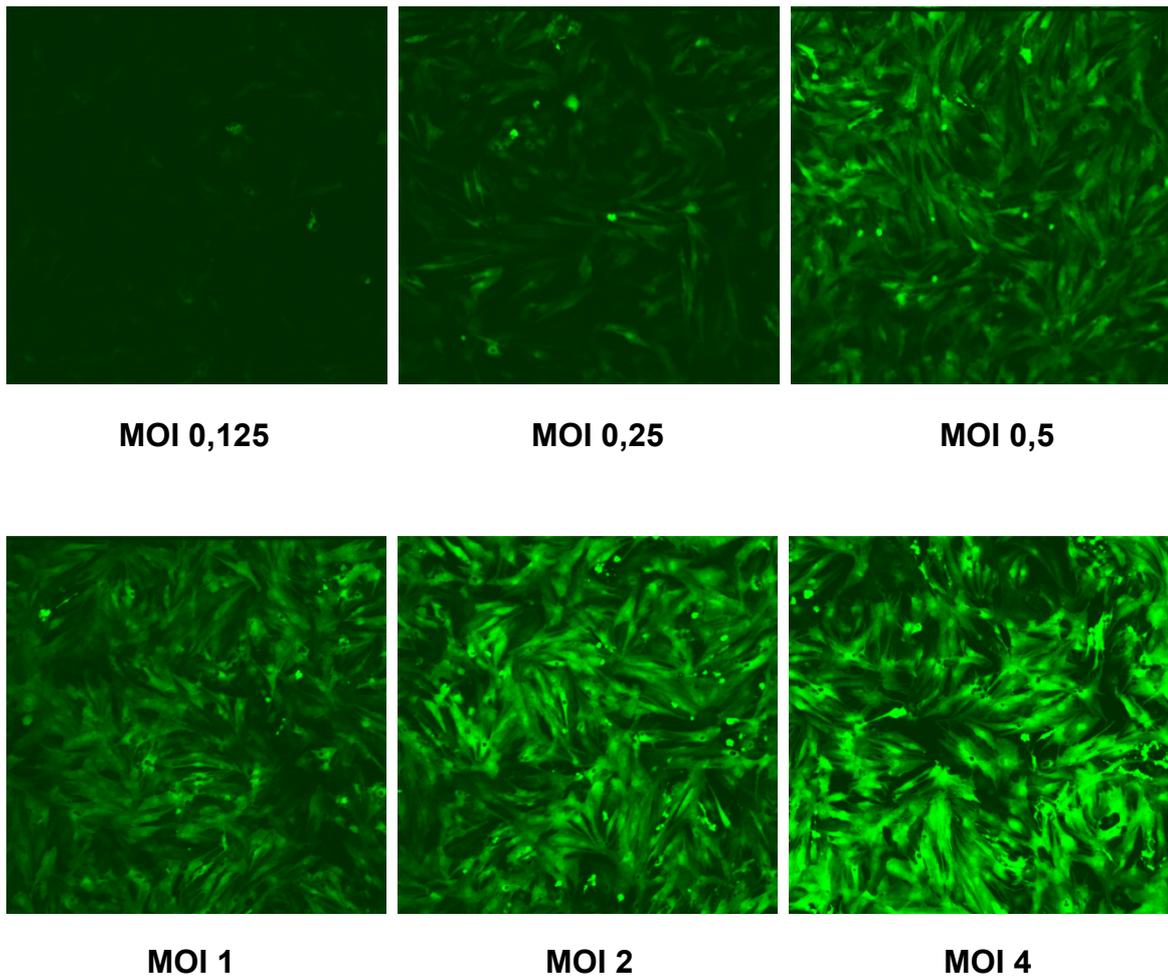


Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopische Infektionskontrolle der mit Ad.CARP in aufsteigender MOI infizierten 2D-Zellkulturen.

Die Expression von CARP in den infizierten Kulturen wurde mittels Western-Blot Verfahren bestimmt.

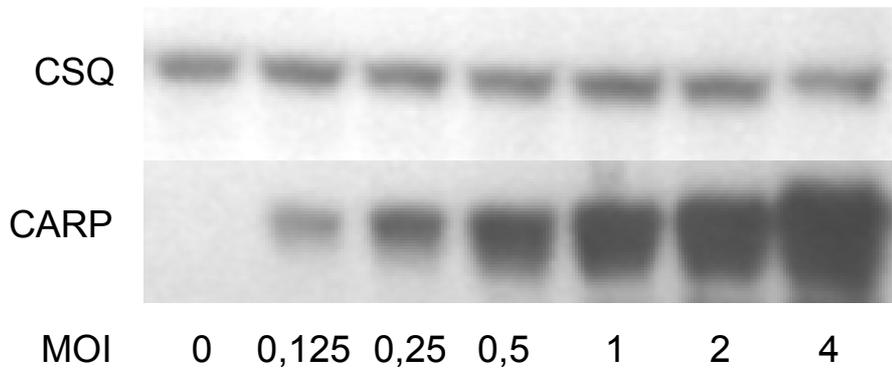


Abbildung 10: Western-Blot Quantifizierung der rekombinanten CARP-Expression in isolierten Herzmuskelzellen neonataler Ratten nach Infektion mit Ad.CARP in unterschiedlichen Konzentrationen (unten). Zur Dokumentation der gleichmäßigen Beladung wurde das interne Standardprotein Calsequestrin (CSQ) detektiert (oben).

3.5.2 Veränderungen des Genexpressionsmusters nach Überexpression von CARP

Zur molekularen Charakterisierung der Auswirkungen einer adenoviral induzierten Überexpression von CARP in neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden mittels TaqMan-PCR die mRNA Expression verschiedener Gene ermittelt.

Zunächst wurde überprüft, ob die Überexpression von CARP die Expression von sog. Housekeeping-Genen beeinflusst. Housekeeping-Gene gelten als vom Zelltyp und äußeren Einflüssen unabhängig und werden daher als interner Standard eingesetzt. Die Expression von GAPDH, einem in allen Zellen exprimierten Gen, zeigte nach Überexpression von CARP keine signifikante Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollen und konnte daher in den folgenden Untersuchungen als interner Standard eingesetzt werden.

Das atriale natriuretische Peptid (ANP), das als Hypertrophiemarker gilt, war in seiner Expression nicht durch CARP beeinflusst.

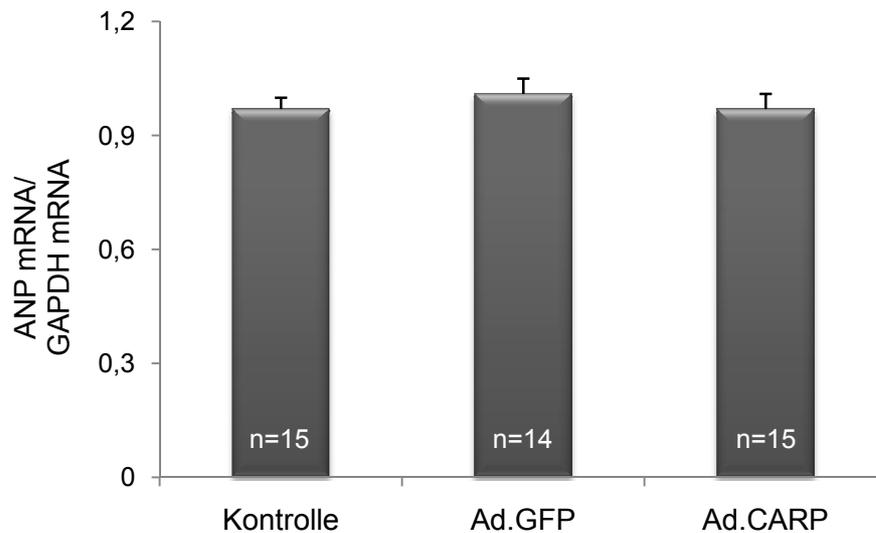


Abbildung 10: Expression von ANP mRNA in neonatalen Rattenkardiomyozyten 48 Stunden nach Infektion mit Ad.CARP und Ad.GFP, sowie nicht infizierten Kontrollzellen.

Bei der Expressionsbestimmung der Proteine der Calciumhomöostase zeigte sich die Expression der sarkoplasmatischen Calcium-ATPase 2A nach Überexpression von CARP unverändert, wohingegen die Expression ihres Inhibitors Phospholamban signifikant reduziert war.

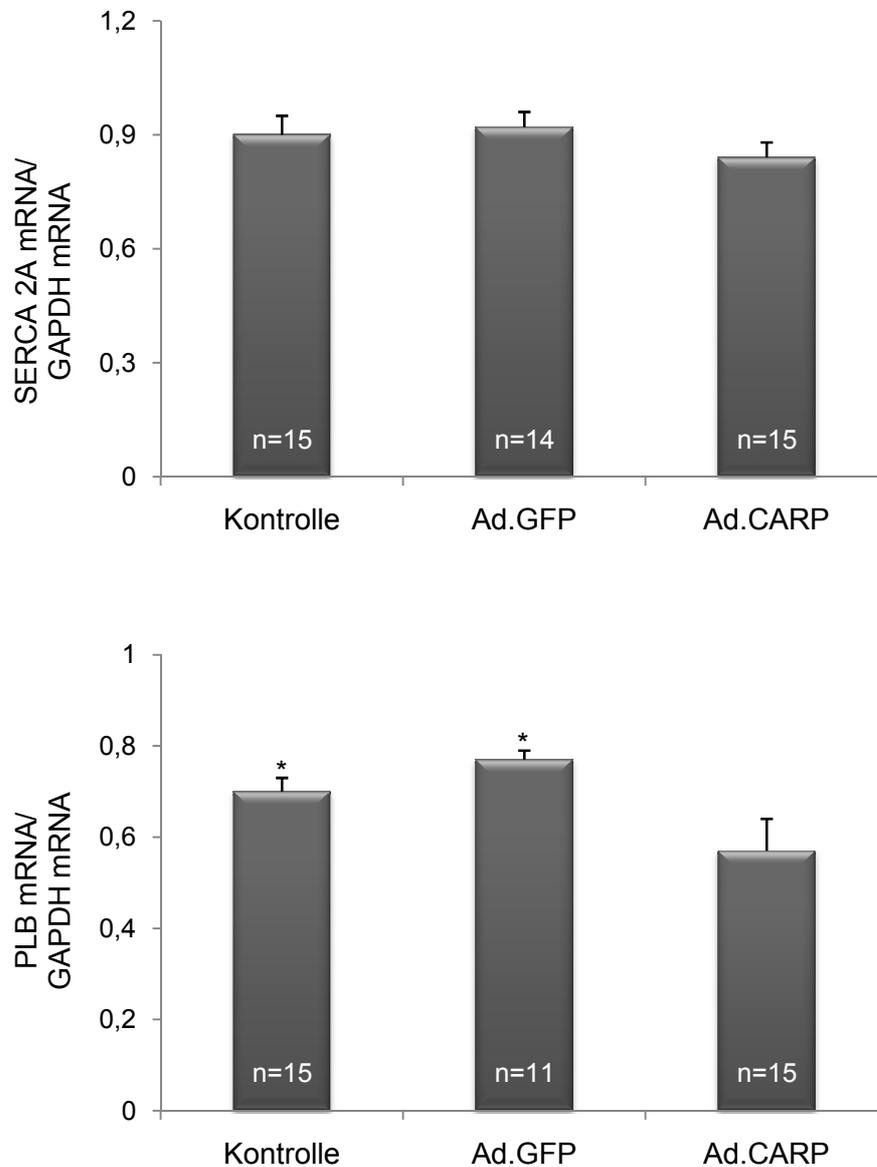


Abbildung 11: Expression von SERCA2A und PLB mRNA in neonatalen Rattenkardiomyozyten 48 Stunden nach Infektion mit Ad.CARP und Ad.GFP, sowie nicht infizierten Kontrollzellen. * $p < 0,05$ vs. Ad.CARP.

Die Expression des α -MHC war leicht, allerdings nicht signifikant, die Expression von β -MHC signifikant reduziert.

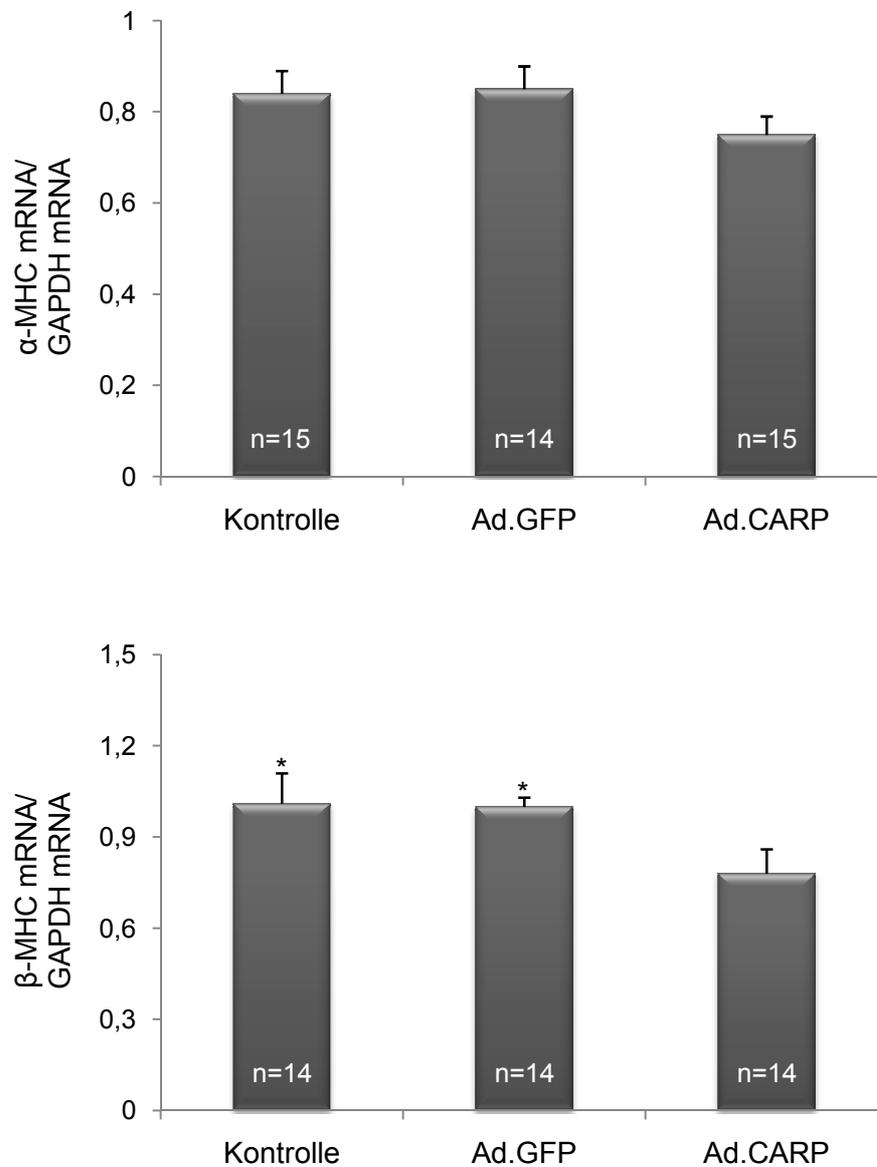


Abbildung 12: Expression von α -MHC und β -MHC mRNA in neonatalen Rattenkardiomyozyten 48 Stunden nach Infektion mit Ad.CARP und Ad.GFP, sowie nicht infizierten Kontrollzellen (K). * $p < 0,05$ vs. Ad.CARP.

Ebenfalls signifikant reduziert war die Expression des MLC Genes.

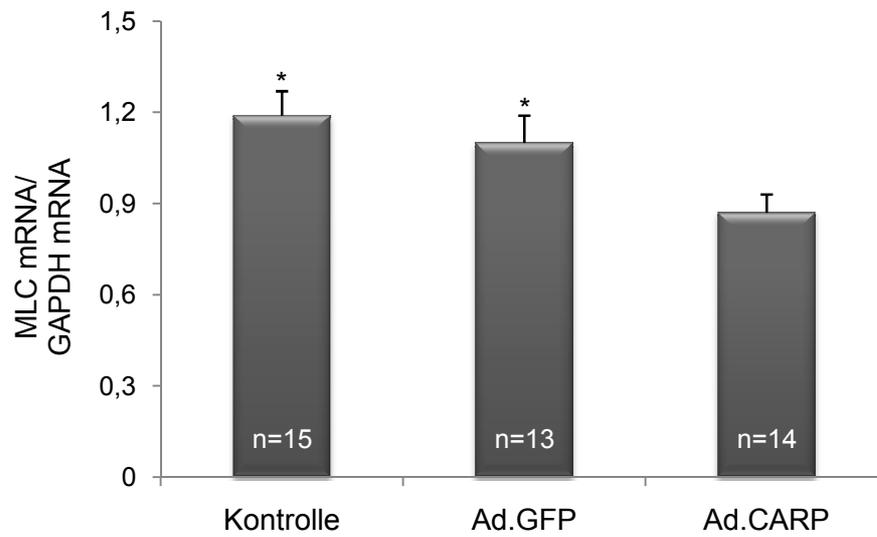


Abbildung 13: Expression von MLC2v mRNA in neonatalen Rattenkardiomyozyten 48 Stunden nach Infektion mit Ad.CARP und Ad.GFP, sowie nicht infizierten Kontrollzellen. * $p < 0,05$ vs. Ad.CARP.

4 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, die Expression des cardiac ankyrin repeat protein in der menschlichen Herzinsuffizienz zu untersuchen. Ein weiterer Teil der Arbeit beschäftigte sich mit den Auswirkungen einer adenoviral induzierten CARP Überexpression auf das Expressionsmuster anderer herzmuskelspezifischer Proteine.

Hierbei stellten sich folgende Fragen: (1) Welche Veränderungen zeigen sich in der CARP Expression an insuffizienten menschlichen Herzen im Vergleich zu gesunden Herzen? (2) Besteht eine Abhängigkeit der CARP-Expression von der Ätiologie der Herzinsuffizienz (dilatative versus ischämische Kardiomyopathie)? (3) Bestehen Unterschiede in der Expression von CARP zwischen Vorhof- und Ventrikelmyokard? (4) Sublokalisierung von CARP in der Zelle? (5) Welche Auswirkungen hat eine adenoviral induzierte Überexpression von CARP auf das Expressionsmuster neonataler Rattenkardiomyozyten?

Folgende Hauptergebnisse wurden hierbei erzielt:

Die Expression von CARP zeigt sich in der menschlichen Herzinsuffizienz im Vergleich zum gesunden Herzen erhöht.

Diese Expressionserhöhung ist unabhängig von der Ursache der Herzinsuffizienz.

Die Expression von CARP ist in rechten Vorhöfen gesunder Spenderherzen im Vergleich zur Expression in linken Herzkammern erhöht.

CARP ist überwiegend im Zellkern lokalisiert, in geringen Mengen findet man es im Zytosol.

Die adenoviral induzierte Überexpression von CARP in neonatalen Rattenkardiomyozyten führt zu einer veränderten Genexpression. Es findet eine negative Regulierung bestimmter Gene statt. Die Expression von PLB, β -MHC und MLC ist reduziert.

4.1 Die Expression von CARP

Jeyaseelan et al. (1997) sehen in CARP ein herzmuskelspezifisches Protein, dessen Expression sie sehr gut in Kardiomyozyten nachweisen konnten. Weder in Hirn- noch in Leber-, Nieren-, Hoden- oder Skelettmuskelzellen gelang ihnen ein Nachweis von CARP. Auch in kardialen Fibroblasten wurde CARP nicht exprimiert. Eine geringe Expression fand sich in Endokard und Herzklappen. Die CARP Genexpression ist in den frühen Stadien der kardialen Morphogenese besonders hoch und nimmt mit zunehmender Reifung des Herzgewebes kontinuierlich ab. Untersuchungen an der adulten Maus zur Gewebespezifität zeigen, dass CARP relativ herzspezifisch ist mit der höchsten Genexpression im Herz und einer deutlich geringeren Expression in der Skelettmuskulatur (Zou et al. 1997). In Leber, Niere, Milz und Gehirngewebe konnte CARP nicht nachgewiesen werden. CARP Transkripte wurden auch in der Lunge der Maus nachgewiesen. Die CARP-Expression in der Lunge ist wahrscheinlich Folge der Migration von atrialen Myoblasten in die Pulmonalvene während der fetalen Entwicklung der Maus (sog. „pulmonales Myokard“ der Maus, Jones et al. 1994).

Bei Mäusen, bei denen durch Aortenkonstriktion eine konzentrische Hypertrophie durch Drucküberladung induziert wurde, findet man eine deutlich vermehrte kardiale Expression von CARP (Kuo et al. 1997). Aihara et al. (2000a) untersuchten die CARP Expression in 3 unterschiedlichen Rattenmodellen der Myokardhypertrophie. Hierbei handelte es sich um spontan hypertensive Ratten, Dahl-salzsensitive Ratten und Ratten, bei denen durch Konstriktion der abdominalen Aorta eine Drucküberlastung hervorgerufen wurde. In allen drei Modellen konnten erhöhte Expressionswerte von CARP festgestellt werden. Arber et al. (1997) fanden in transgenen Mäusen, denen das Muscle LIM Protein (MLP) fehlt, ebenfalls eine erhöhte kardiale CARP-Expression. MLP reguliert einerseits die Entwicklung des Herzmuskels und spielt andererseits bei der Aufrechterhaltung der Struktur von Herzmuskelzellen eine wichtige Rolle. Die MLP^{-/-} Tiere entwickeln eine schwere Herzinsuffizienz zusammen mit einer Myokardhypertrophie.

Eine vermehrte Expression von CARP wurde in unserer Arbeitsgruppe bei der Untersuchung weiterer Tiermodelle bestätigt. In linksventrikulärem Herzmuskelgewebe von Hunden, bei denen die Herzinsuffizienz durch eine Schrittmacher Überstimulation induziert wurde, konnte eine erhöhte Expression von CARP festgestellt werden (Zolk et al. 2002). Bei einem weiteren Hypertrophie-Modell wurde Ratten chronisch Isoprenalin infundiert. Bei der sich durch die verstärkte adrenerge Stimulation ausbildende Hypertrophie konnte ebenfalls eine vermehrte Expression von CARP festgestellt werden (Zolk et al. 2003).

Ob die Erkenntnisse aus den verschiedenen Tiermodellen auch auf den Menschen übertragbar sind, war fraglich.

Unsere Untersuchungen bestätigen die Hinweise aus tierexperimentellen Studien und zeigen sowohl eine erhöhte mRNA-Expression als auch eine erhöhte Proteinexpression von CARP in linksventrikulären Gewebeproben insuffizienter menschlicher Herzen.

Bezüglich der Ätiologie der Herzinsuffizienz zeigten sich keine Unterschiede in den Gewebeproben. Die CARP-Expression in Proben aus Herzen, bei denen eine dilatative Kardiomyopathie zur Insuffizienz führte, unterschied sich nicht signifikant von Proben, denen eine ischämische Kardiomyopathie zu Grunde lag. In gesunden Herzen war die CARP-Expression im Vorhofmyokard signifikant höher als im Ventrikelmyokard. Die CARP-Expression in Vorhöfen gesunder Spenderherzen unterschied sich allerdings nicht von Vorhofproben insuffizienter Herzen. Demnach unterliegt die CARP-Expression im Vorhofmyokard – im Gegensatz zum Ventrikelmyokard – keiner Regulation in der Herzinsuffizienz. CARP wird im Vorhofmyokard also konstitutiv relativ hoch exprimiert.

4.2 Lokalisation von CARP in der Zelle

Die Aminosäuresequenz von CARP beinhaltet ein nukleäres Lokalisationssignal. Mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie konnte ein zuvor hergestelltes CARP-FLAG Protein in transfizierten COS Zellen im Kern lokalisiert werden (Chu et al. 1995). Zou et al. (1997) fanden mittels Immunfluoreszenz endogenes CARP in den Kernen der Myozyten lokalisiert. In transfizierten COS-Zellen akkumuliert das rekombinant exprimierte CARP-Protein im Zellkern (Baumeister et al. 1997). Die eigenen Untersuchungen bestätigen diese Befunde. In den Fraktionierungsexperimenten und mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde CARP-Protein überwiegend im Zellkern detektiert, geringere Mengen von CARP fanden sich im Zytosol, wohingegen CARP in der Membranfraktion nicht nachweisbar war.

4.3 Die Funktion von CARP und Auswirkungen der Überexpression

Über die Auswirkungen der vermehrten Expression von CARP im Verlauf der Herzinsuffizienz ist bisher nur wenig bekannt. Jeyaseelan et al. (1997) sehen CARP als negativen Regulator der kardialen Genexpression. Nach Transfektion von Kardiomyozyten mit einem CARP-Expressionsvektor beobachteten sie eine Abnahme der Promotor-Aktivität von ANP und kardialem Troponin C. CARP wird in den frühen Stadien der embryonalen Kardiogenese exprimiert. Zusammen mit dem ubiquitär vorkommenden und ebenfalls in der frühen embryonalen Kardiogenese vermehrt vorkommenden Transkriptionsfaktor YB-1 bildet es einen stabilen Komplex in Rattenkardiomyozyten. YB-1 bindet mit dem Co-Faktor CARP an die HF-1a Seite eines 28 bp großen HF1a/MEF-2 Elements in der Promotor Region des MLC-2v Genes. Transfektionsuntersuchungen zeigten, dass CARP einen HF-1-TK minimal Promotor negativ regulieren kann. Darüber hinaus besitzt CARP eine transkriptions-hemmende Aktivität, wenn es mit einer GAL4 DNA-Bindedomäne verbunden wird (Zou et al. 1997).

Kuo et al. (1999) sehen in CARP einen Hypertrophiemarker, der ähnlich wie ANP hohe Expressionslevel während der embryonalen Ausbildung des Ventrikels aufweist, im adulten Herzen vermindert exprimiert wird und bei der Hypertrophie im Sinne eines fetalen Genprogrammes reaktiviert wird. Dieses fetale Genprogramm betrifft neben ANP auch β -Myosin Heavy Chain (β -MHC) und skelettales α -Aktin (Izumo et al. 1987, Lee et al. 1988, Schwartz et al. 1986). CARP mRNA und Protein werden über schnelle Degradierungsmechanismen kontrolliert. Diese sind charakteristisch für „Early-Response“-Gene (Baumeister et al. 1997).

Unsere Untersuchungen zeigten, dass die adenovirale Überexpression von CARP zu einer Abnahme der mRNA-Expression von MLC, β -MHC und Phospholamban führt. Im Falle von MLC-2v wurde diese negative Regulation zuvor in einem anderen experimentellen System berichtet (Zou et al. 1995). Hingegen fanden wir keinen signifikanten Unterschied der Expression von ANP, Serca-2a und α -MHC.

Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass CARP die Expression bestimmter Gene negativ reguliert.

4.4 Bedeutung der Ergebnisse für die Erforschung und Therapie der Herzinsuffizienz

Das insuffiziente Herz ist nicht mehr in der Lage, eine dem Bedarf gerecht werdende Menge an Blut und damit Sauerstoff zu den Organen zu transportieren (WHO 1995).

Im Krankheitsverlauf kommt es durch die Minderperfusion der Organsysteme zur Aktivierung neurohumoraler Anpassungsmechanismen. Über Aktivierung des sympathischen Nervensystems und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems sowie die vermehrte Ausschüttung von antidiuretischem Hormon versucht der Organismus, die Perfusion der Organe zu gewährleisten. Im Verlauf der chronischen Erkrankung beschleunigen jedoch diese Faktoren durch Vasokonstriktion und Volumenbelastung die Progression der Herzinsuffizienz (Eschenhagen und Weil 1998). Ein pharmakologischer Eingriff in die oben genannten neurohumoralen Anpassungsmechanismen gehört derzeit zu den wichtigsten therapeutischen Prinzipien der Herzinsuffizienz.

Es gibt aber noch einen weiteren endogenen Anpassungsmechanismus, der von den Auswirkungen auf den Organismus denen der heutigen medikamentösen Therapie ähnelt. Hierbei handelt es sich um die natriuretischen Peptide ANP und BNP. Unter physiologischen Bedingungen werden diese nur in myoendokrinen Zellen des Herzvorhofes - im Falle von BNP auch im Gehirn - gebildet und bei verstärkter Dehnung der Vorhöfe ausgeschüttet. Sie bewirken eine starke Diurese, Vasodilatation und eine Senkung des Sympathikotonus (Bonow et al. 1996). Bei chronischer Herzinsuffizienz nimmt die Bildung und Ausschüttung aus den Vorhöfen zu, außerdem wird das ventrikuläre Myokard zur Produktionsstätte von ANP und BNP (Saito et al. 1989, Yoshimura et al. 1993). Die Expression von CARP korreliert eng mit der Expression von BNP in Dahl-salzsensitiven Ratten (Aihara et al. 2000a).

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass CARP in der menschlichen Herzinsuffizienz in linken Ventrikeln vermehrt exprimiert wird. CARP wirkt als negativer Regulator der kardialen Genexpression. Betroffen sind Gene, die in der Myokardhypertrophie aktiviert werden und für den Hypertrophie-Phänotyp verantwortlich sind. Zou et al. (1997) konnten zeigen, dass CARP die Aktivität eines HF-1-TK Promotors in vitro vermindert und dass CARP nach Bindung an eine GAL4 DNA bindende Domäne eine transkriptionshemmende Aktivität besitzt, was zur Annahme führt, dass CARP als negativer Regulator HF-1-abhängiger Pfade der Genexpression im Myokard wirkt. CARP könnte folglich antihypertrophe Wirkungen besitzen. Unsere Untersuchungen und bereits zuvor durchgeführte Untersuchungen haben gezeigt, dass CARP die Expression von Genen, die eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Kontraktilität des Herzens spielen,

beeinflusst (Zou et al., Jeyaseelan et al.). Die funktionellen Auswirkungen der CARP Überexpression wurden in unserer Arbeitsgruppe an rekonstituiertem Herzgewebe (engineered heart tissue) gemessen. Eine Überexpression von CARP bewirkte hierbei eine kontraktile Dysfunktion des engineered heart tissue (Zolk et al. 2003). Basierend auf diesem Erkenntnis kann vermutet werden, dass CARP während der menschlichen Herzinsuffizienz eine kontraktile Dysfunktion fördert und so zu einem beschleunigten Krankheitsverlauf beiträgt. Zukünftige transgene Untersuchungen sind nötig, um die Hypothese, dass CARP eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Herzinsuffizienz spielt, zu bekräftigen.

Basierend auf diesen Erkenntnissen sowie auf der Erforschung des Signaltransduktionsweges stellt CARP eventuell einen Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer Medikamente und Therapiestrategien zur Behandlung und Prophylaxe der Herzinsuffizienz dar.

5 Zusammenfassung

Hintergrund und Ziele:

CARP, ein 36 kDa schweres nukleäres Protein, ist in verschiedenen Tiermodellen der Myokardhypertrophie vermehrt im Herzen nachweisbar. In-vitro-Experimente zeigten, dass CARP als negativer Regulator die Expression kardialer Gene wie z.B. MLC-2v beeinflusst.

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob CARP im menschlichen Herzen exprimiert ist und inwieweit seine Expression im insuffizienten Myokard verändert ist. Außerdem sollte untersucht werden, inwiefern eine adenoviral-vermittelte Überexpression von CARP das kardiale Genexpressionsmuster in vitro verändert.

Methoden:

Die Expressionsuntersuchung an humanem linksventrikulärem und rechtsatrialem Gewebe erfolgte mittels Northern-Blot zur Bestimmung der mRNA, die CARP-Proteinkonzentration wurde mittels Western-Blot Verfahren ermittelt. CARP wurde durch adenoviralen Gentransfer in isolierten Kardiomyozyten neonataler Ratten überexprimiert. In diesem zellulären Modell wurde der Effekt von CARP auf die Expression typischer myozytärer Gene durch quantitative RT-PCR (TaqMan) untersucht.

Ergebnisse:

Sowohl die CARP mRNA-Expression als auch der CARP Proteingehalt zeigten sich in insuffizientem menschlichen linksventrikulären Gewebe im Vergleich zu gesundem Myokard deutlich erhöht. Die Ätiologie der Herzinsuffizienz (dilatativ vs. ischämisch) hatte keinen signifikanten Einfluss auf die CARP-Expression. Rechtsatrial zeigte CARP in gesundem und insuffizientem Herzmuskelgewebe eine gleich hohe Expression. Der Vergleich zwischen rechtsatrialem und linksventrikulärem Gewebe gesunder Spenderherzen zeigte allerdings eine deutlich niedrigere Expression von CARP im Ventrikel. Nach Fraktionierung des menschlichen Myokards konnte CARP fast ausschließlich in der nukleären Fraktion und nur in geringen Mengen in der Zytosolfraktion lokalisiert werden. Entsprechend konnte das CARP-GFP Fusionsprotein fluoreszenzmikroskopisch überwiegend im Kern und in mit niedrigerem Signal im Zytosol wiedergefunden werden.

Die adenoviral induzierte Überexpression von CARP bewirkte in vitro eine Änderung des Genexpressionsmusters in Kardiomyozyten neonataler Ratten. Die Transkriptkonzentration von PLB, MLC und β -MHC war in CARP exprimierenden Zellen erniedrigt.

Schlussfolgerung:

Die linksventrikuläre Expression von CARP ist in der menschlichen Herzinsuffizienz erhöht. Als nukleärer Faktor beeinflusst es in vitro die Transkription bestimmter kardialer Gene negativ und trägt somit zu einer geänderten Genexpression von Proteinen bei, die am Aufbau des Sarkomers oder an der elektromechanischen Kopplung beteiligt sind. Über diesen Mechanismus könnte CARP eine Rolle in der Pathogenese der Herzinsuffizienz spielen.

6 Literaturverzeichnis

Aihara Y, Kurabayashi M, Saito Y, Ohyama Y, Tanaka T, Takeda S, Tomura K, Sekiguchi K, Arai M, Nakamura T, Nagai R (2000a) Cardiac Ankyrin Repeat Protein Is a Novel Marker of Cardiac Hypertrophy: Role of M-CAT Element within the Promotor. *Hypertension*, 36: 48-53

Aihara Y, Kurabayashi M, Tanaka T, Takeda S, Tomura K, Sekiguchi K, Ohyama Y, Nagai R (2000 b) Doxorubicin Represses CARP Gene Transcription Through the Generation of Oxidative Stress in Neonatal Rat Cardiac Myocytes: Possible Role of Serine/Threonine Kinase-dependent Pathways. *J Mol Cell Cardiol*, 32: 1401-1414

Arber S, Hunter JJ, Ross JJ, Hongo M, Sansing G, Borg J, Perriard JC, Chien KR, Caroni P (1997) MLP-deficient mice exhibit a disruption of cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell*, 88:393-403.

Akers WS, Cross A, Speth R, Dwoskin LP, Cassis LA (2000) Renin-angiotensin system and sympathetic nervous system in cardiac pressure-overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279: H2797-H2806

Baumeister A, Arber S, Caroni P (1997) Accumulation of Muscle Ankyrin Repeat Protein Transcript Reveals Local Activation of Primary Myotube Endcompartements during Muscle Morphogenesis. *J Cell Biol*, 139: 1231-1242

Bonow RO (1996) New insights into the cardiac natriuretic peptides. *Circulation*, 93:1946-1950

Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA Isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-159

Chu W, Burns DK, Swerlick RA, Presky DH (1995) Identification and Characterization of a Novel Cytokine-inducible Nuclear Protein from Human Endothelial Cells. *J Biol Chem*, 270: 10236-10245

Dinwall C, Sharnick SV, Laskey RA (1982) A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus. *Cell*, 30:449-458

Dostal DE, Baker KM (1999) The Cardiac Renin-Angiotensin System – Conceptual, or a Regulator of Cardiac Function? *Circ Res*, 85: 643-650

Eschenhagen T, Weil J (1998) Molekulare Grundlagen der Herzinsuffizienz. In: Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg) *Handbuch der molekularen Medizin (Band 3): Herz-Kreislauf-Erkrankungen*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York: 148-221

Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Noorthrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7413-7417

He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 2509-2514

Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM, Schaub MC (1997) Signaling Pathways in Cardiac Myocyte Hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 29: 2873-2892

Horio T, Nishikimi T, Yoshihara F, Matsuo H, Takishita S, Kangawa K (2000) Inhibitory Regulation of Hypertrophie by Endogenous Atrial Peptide in Cultured Cardiac Myocytes. *Hypertension*, 35 (Pt1): 19-24

Iaccarino G, Dolber PC, Lefkowitz RJ, Kovh WJ (1999) β -Adrenergic Receptor Kinase-1 Levels in Catecholamine-Induced Myocardial Hypertrophy. Regulation by β - but not by α 1-adrenergic stimulation.

Izumo S, Lompre AM, Matsuoka R, Koren G, Schwartz K, Nadal GB, Mahdavi V (1987) Myosin heavy chain messenger RNA and isoform transitions during cardiac hypertrophie. Interaction between haemodynamic and thyroid hormone-induced signals. *J Clin Invest*, 79:970-977

Jeyaseelan R, Poizat C, Baker RK, Abdishoo S, Isterabadi LB, Lyons GE, Kedes L (1997) A Novel Cardiac-Restricted Target for Doxorubicin. CARP, a nuclear modulator of gene expression in cardiac progenitor cells and cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 272:22800-22808

Jones WK, Sanchez A, Robins J (1994) Murine pulmonary myocardium: developmental analysis of cardiac gene expression. *Dev. Dynamics*, 200,117-28

Kanai H, Tanaka T, Aihara Y, Takeda S, Kawabata M, Miyazono K, Nagai R, Kurabayashi M (2001) Transforming Growth Factor- β /Smads Signaling Induces Transcription of the Cell Type-Restricted Ankyrin Repeat Protein CARP Gene Through CAGA Motif in Vascular Smooth muscle cells. *Circ Res*, 88:30-36

Kuo HC, Chen J, Lozano PR, Zou Y, Nemer M, Chien KR (1999) Control of segmental expression of the cardiac-restricted ankyrin repeat protein gene by distinct regulatory pathways in murine cardiogenesis. *Development*, 126: 4223-4234

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685

Lee RT, Bloch KD, Pfeffer JM, Pfeffer MA, Neer EJ, Seidman CE (1988) Atrial natriuretic factor gene expression in ventricles of rats with spontaneous biventricular hypertrophy. *J Clin invest*, 81:431-434.

Lowry OH, Rosebrough HJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurements with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275

Masson S, Arosio B, Luvara G, Gagliano N, Fiordaliso F, Santambrogio D, Vergani C, Latini R, Annoni G (1998) Remodelling of Cardiac Extracellular Matrix during β -adrenergic Stimulation: Upregulation of SPARC in the Myocardium of Adult Rats. *J Mol Cell Cardiol*, 30: 1505-1514

Rechsteiner M, Rogers SW (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*, 21: 267-271

Remme WJ, Swedberg K (2002) Comprehensive guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure. Task force for the diagnosis and treatment of chronic heart failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*, 4: 11-22

Riegger G (1998) Herzinsuffizienz. In: Classen M, Diehl V, Kochsiek K (Hrsg) *Innere Medizin* (4. Auflage). Urban & Schwarzenberg Verlag, München, Wien, Baltimore: 1103-1114

Ross RS, Navankasattusas S, Harvey RP, Chien KR (1996) An HF-1a/HF-1b/MEF-2 combinatorial element confers cardiac ventricular specificity and established an anterior-posterior gradient of expression. *Development*, 122: 1799-1809

Saito Y, Nakao K, Arai H, Nishimura K, Okamura K, Obata K, Takemura G, Fujiwara H, Sugawara A, Yamada T (1989) Augmented expression of atrial natriuretic polypeptide gene in ventricle of failing human heart. *J Clin Invest*, 83: 293-305

Schaub MC, Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM (1997) Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. *J Mol Med*, 75:901-920

Schwartz K, de la Bastie D, Bouveret P, Oliviero P, Alonso S, Buckingham M (1986) Alpha-skeletal muscle actin mRNAs accumulate in hypertrophied adult rat hearts. *Circ Res* 59:551-555

Statistisches Bundesamt (2008) Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern (einschließlich Sterbe-, und Stundenfälle). Wiesbaden Graphische Betriebe GmbH, Wiesbaden: Fachserie 12, Reihe 6.2.1

Sugden PH, Bogoyevitch MA (1996) Endothelin-1 dependent signaling pathways in the myocardium. *Trends Cardiovasc Med*, 6: 87-94

Webster KA, Discher DJ, Bishopric NH (1993) Induction and nuclear accumulation of fos and jun proto-oncogenes in hypoxic cardiac myocytes. *J Biol Chem* 268: 16852-16858

WHO (1995) Physicians Guidelines (for GP's) designed to be translated and distributed worldwide to primary care physicians.

Zolk O, Marx M, Jäckel E, El-Armouche A, Eschenhagen T (2003) β -Adrenergic stimulation induces cardiac repeat protein expression: involvement of protein kinase A and calmodulin-dependent kinase. *Card Res*, 59: 563-572

Zou Y, Chien KR (1995) EFIA/YB-1 is a component of cardiac HF-1a binding activity and positively regulates the transcription of the myosin light chain-2v gene. *Mol Cell Biol*, 11:2273-2281.

Zou Y, Evans S, Chen J, Kuo HC, Harvey RP, Chien KR (1997) CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in NKx2.5 homeobox gene pathway. *Development*, 124:793-804

7 Abkürzungsverzeichnis

α -MHC	schwere Myosinkette, α -Isoform
β -MHC	schwere Myosinkette, β -Isoform
μ Ci	Mikro-Curie
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
2-D	zweidimensional
32 P	Phosphor, radioaktiv
A, V	Ampere, Volt
a.i. H ₂ O	Aqua ad iniectabilia
Abb.	Abbildung
ANP / BNP	vorhof- und gehirnspezifische natiuretische Peptide
Bp	Basenpaar
BrdU	5'-Bromo-2'-desoxyuridin
CARP	cardiac ankyrin repeat protein
CBFHH	calcium- und bicarbonatfreier Hanks Puffer mit HEPES
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
cm, mm, nm	Zentimeter, Millimeter, Nanometer
CSQ	Calsequestrin
DCM	dilatative Kardiomyopathie
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
DTT	1,4 Dithiothreitol
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium

DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	fetales Kälberserum
g (bei der Zentrifugation)	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GFP	Green Fluorescent Protein
HEK-Zellen	Human Embryonic Kidney – Zellen
HEPES	(2-Hydroxyethyl)piperazin-N-(2-ethansulfonsäure)
ICM	ischämische Kardiomyopathie
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilo Dalton
KM	Kardiomyozyt
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
M, mM, nM	Mol, Millimol, Nanomol
MEM	<i>minimal essential medium</i>
MG	Molekulargewicht
MLP	<i>muscle limb protein</i>
MOI	<i>multiplicity of Infection</i>
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MW	Mittelwert
mRNA	<i>messenger</i> Ribonucleinsäure
n	Anzahl der Proben
NKM	Nicht-Kardiomyozyt
ns.	nicht signifikant

Na	Natrium
NF	gesunde Spenderherzen
NYHA-Stadium I-IV	Klassifizierung in vier Schweregrade nach Richtlinien der New York Heart Association
OD	optische Dichte
P/S	Penicillin und Streptomycin
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
R	Lysat aus CARP infizierten KM
RT	Raumtemperatur
S	Standardmix (Lysat aus humanen KM)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SERCA 2A	kardiale Isoform der Calcium ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SS-DNA	Lachssperma-Desoxyribonukleinsäure
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	TBS mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TWEEN	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
UV	Ultraviolett

vs.

versus

VSB

virus storage buffer

8 Veröffentlichungen

Während der Erstellung der vorgelegten Dissertation entstanden die folgenden Publikationen:

Abstract-Veröffentlichungen:

Maurer A, Marx M, Kluxen FW, Hentsch B, Zolk O, Eschenhagen T (2001) Cardiac ankyrin repeat Protein (CARP) - ein potentieller Faktor in der Pathogenese der Herzinsuffizienz. *Z Kardiol*, 90 (Suppl.): 204

Maurer A, Zolk O, Marx M, Feifel N, El-Armouche A, Kluxen FW, Hentsch B, Eschenhagen T (2001) Erhöhte Expression des Cardiac Ankyrin Repeat Proteins (CARP) in der menschlichen Herzinsuffizienz. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 336 (Suppl.): 104

Zolk O, Maurer A, Marx MW, El-Armouche A, Kluxen FW, Hentsch B, Frohme M, Hoheisel J, Eschenhagen T (2001) CARP, a negative regulator of cardiac gene expression is up-regulated in human heart failure. *Eur Heart J*, 22 (Suppl.): 540

Zolk O, Maurer A, Marx MW, Münzel F, Hentsch B, Kluxen FW, Eschenhagen T (2001) Expression of CARP, a negative regulator of cardiac gene expression, is increased in human heart failure. *Circulation*, 104 (Suppl.): 197

Marx MW, Maurer A, El-Armouche A, Caroni P, Eschenhagen T, Zolk O (2001) Beta adrenergic stimulation increases cardiac ankyrin repeat protein expression in vivo and in vitro: Involvement of PKA/CaMK pathways. *Circulation*, 104 (Suppl.): 281

Zolk O, Frohme M, Maurer A, Kluxen FW, Hentsch B, Zubakov D, Hoheisel JD, Zucker IH, Pepe S, Eschenhagen T (2002) Cardiac ankyrin repeat protein, a negative regulator of cardiac gene expression, is augmented in human heart failure. *BBRC*, 293:1377-1382

9 Anhang

9.1 Verwendete Substanzen

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

RNA Methoden

10x Reaktionspuffer	Applied Biosystems, Weiterstadt
³² P-dCTP (3000 µCi/mmol)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
3-Morphlinopropansulfonsäure (MOPS)	Fluka, Steinheim
AmpliTaq Gold DNA Polymerase	Applied Biosystems, Weiterstadt
Chloroform (MG 119,38)	Merck, Darmstadt
Desoxyribonucleotid-5'-triphosphate (dNTPs)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Diethyl-Pyrocyanat (DEPC)	Sigma, Deisenhofen
Ficoll	Sigma, Deisenhofen
Polyvinylpyrrolidone (MG 400.000)	Sigma, Deisenhofen
Formamid	Calbiochem, Bad Soden
Lachssperma-DNA (SS-DNA)	Sigma, Deisenhofen
TRIZOL [®]	Life Technologies, Ebersberg

Protein-Methoden

1,4-Dithiothreitol (DTT)	Fluka, Steinheim
Acrylamid 4K Lösung, 30%	Applichem, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (MG 228,2)	Bio Rad, München
DTT	Fluka, Steinheim
Glyzin	Biomol, Hamburg
Magermilchpulver	Heirler, Radolfzell
Methanol (MG32,04)	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED, MG 116,21)	Merck, Darmstadt
Peroxidase konjugiertes polyklonales anti-Kaninchen IgG aus der Ziege	Merck, Darmstadt
Polyklonales anti-Casequestrin IgG aus dem Kaninchen	Dianova, Hamburg
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat 20 (TWEEN)	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S (MG 760,6)	Sigma, Deisenhofen
Succrose	Merck, Darmstadt
Urea-Harnstoff	Sigma, Deisenhofen

Allgemein verwendete Substanzen

Agarose, peqGold Universal	peqLab, Erlangen
Aqua ad iniectabilia	Universitäts-Apotheke, Erlangen
Bovines Serum Albumin	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau (MG 691,9)	Sigma, Deisenhofen
CaCl ₂ (MG 147,0)	Merck, Darmstadt

Essigsäure 96%	Merck, Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Glukose, wasserfrei (MG 180,6)	Merck, Darmstadt
Glyzerin (MG 92,1)	Merck, Darmstadt
Isopropylalkohol (MG 60,1)	Merck, Darmstadt
KCl (MG 75,4)	Merck, Darmstadt
KH_2PO_4 (MG 136,1)	Merck, Darmstadt
MgCl (MG 95,3)	Merck, Darmstadt
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (MG 246,48)	Merck, Darmstadt
Mowiol	Calbiochem, Bad Soden
Na-Azetat (MG 63,0)	Merck, Darmstadt
Natriumdodezylsulfat (SDS, MG 288,38)	Bio Rad, München
Na-Zitrat $\times 2\text{H}_2\text{O}$ (MG 294,1)	Merck, Darmstadt
NaCl (MG 58,4)	Merck, Darmstadt
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (MG 178,2)	Universitäts-Apotheke, Erlangen
NaHCO_3 (MG 84,0)	Merck, Darmstadt
PBS	Gibco BRL, Karlsruhe
Penizillin/Streptomysin (P/S)	Gibco BRL, Karlsruhe
Roenteroll Part I/II/III	Tetenal, Nordenstedt
Röntgenfilm (HyperfilmR)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Superfix MRP Part I/II	Tetenal, Nordenstedt
Tris Base pH 8,5 (MG 121,1)	Merck, Darmstadt

Tris HCl ph 7,5 (MG 157,6)

Merck, Darmstadt

Whatman-Paper

Filtraq, Bärenstein

9.2 Ergebnistabellen

Tabelle 5: CARP mRNA Expression in humanem linksventrikulären Myokard

	CARP mRNA/ GAPDH mRNA	SEM	n
NF	0,68	0,14	11
DCM	1,17	0,10	11
ICM	1,13	0,08	11

Tabelle 6: CARP Protein Expression in humanem linksventrikulären Myokard

	CARP Protein/ CSQ Protein	SEM	n
NF	1,06	0,2	11
DCM	1,8	0,1	11
ICM	1,8	0,2	8

Tabelle 7: CARP Protein Expression in linksventrikulärem und rechtsatrialen humanen Herzmuskelgewebe

	CARP mRNA/ GAPDH mRNA	SEM	n
linker Ventrikel NF	1,06	0,24	11
rechter Vorhof NF	1,80	0,25	7
linker Ventrikel DCM	1,92	0,1	12
rechter Vorhof DCM	1,91	0,21	8

Tabelle 8: mRNA Expression ANP

	ANP mRNA/ GAPDH mRNA	SEM	n
Kontrolle	0,97	0,03	15
Ad.GFP	1,01	0,04	14
Ad.CARP	0,97	0,04	15

Tabelle 9: mRNA Expression Serca2A

	Serca2A mRNA/ GAPDH mRNA	SEM	n
Kontrolle	0,90	0,05	15
Ad.GFP	0,92	0,04	14
Ad.CARP	0,84	0,04	15

Tabelle 10: mRNA Expression PLB

	ANP mRNA/ GAPDH mRNA	SEM	n
Kontrolle	0,70	0,03	15
Ad.GFP	0,77	0,02	11
Ad.CARP	0,57	0,07	15

Tabelle 11: mRNA Expression α -MHC

	α -MHC mRNA/ GAPDH mRNA	SEM	n
Kontrolle	0,84	0,05	15
Ad.GFP	0,85	0,05	14
Ad.CARP	0,75	0,04	15

Tabelle 12: mRNA Expression β -MHC

	β -MHC mRNA/ GAPDH mRNA	SEM	n
Kontrolle	1,01	0,10	14
Ad.GFP	1,00	0,03	14
Ad.CARP	0,78	0,08	14

Tabelle 13: mRNA Expression MLC

	MLC mRNA/ GAPDH mRNA	SEM	n
Kontrolle	1,19	0,08	15
Ad.GFP	1,10	0,09	13
Ad.CARP	0,87	0,06	14

10 Danksagung

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

Herrn PD Dr. Oliver Zolk danke ich für die vorbildliche wissenschaftliche Betreuung während meiner Doktorarbeit. Durch sein großes persönliches Engagement und die stets freundliche und kooperative Zusammenarbeit war es mir möglich, die Arbeit auch nach einer Unterbrechung fortzuführen.

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

11 Lebenslauf

Name	Alexander Michael Maurer
Geburtsdatum	29. März 1975
Geburtsort	Wertingen
Familienstand	verheiratet, Ehefrau Diana Maurer
Kinder	Jakob Maurer
Eltern	Gertrud und Franz Maurer
Geschwister	Yvonne Hudelmaier

Schulbildung

1981 - 1985	Grundschule in Zipplingen
1985 - 1994	Peutinger Gymnasium, Ellwangen/Jagst Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Ersatzdienst

1994 - 1996	DRK-Altenpflegeheim Bopfingen
-------------	-------------------------------

Hochschulausbildung

1996 - 2003	Studium der Humanmedizin, Friedrich Alexander Universität Erlangen-Nürnberg
-------------	--

Berufstätigkeit

2003 - 2004	AiP Orthopädie, Orthopädisches Krankenhaus Schloss Werneck
2004 - 2007	Assistenzarzt Orthopädie, Orthopädisches Krankenhaus Schloss Werneck
Seit 2007	Assistenzarzt Unfallchirurgie, Kliniken Dr. Erler, Nürnberg

12 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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.

Alexander Maurer