

Aus dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Abteilung für Biochemische Endokrinologie
Leiter: Prof. Dr. H.-J. Seitz

**Die Adenin-Nukleotid-Translokase:
Isoform-spezifische Expression bei Herzinsuffizienz**

Dissertation

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

vorgelegt von
Tanja Glause
aus Hamburg

Hamburg 2004

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
Der Universität Hamburg am: 3. November 2004

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuß, Vorsitzender: Prof. Dr. H.-J. Seitz
2. Gutachter: Prof. Dr. R. Böger
3. Gutachter: Prof. Dr. A. Schuchert

INHALTSVERZEICHNIS

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	S. 4
II. EINLEITUNG	S. 6
1. Die Herzinsuffizienz	S. 6
1.1 Definition	S. 6
1.2 Inzidenz	S. 7
1.3 Ätiologie	S. 7
1.4 Pathophysiologie und -biochemie	S. 8
2. Die Adenin-Nukleotid-Translokase	S. 10
3. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	S. 12
III. MATERIAL UND METHODEN	S. 14
1. Zellkultur	S. 14
2. Molekularbiologische und biochemische Techniken	S. 15
2.1 Mitochondrienpräparation aus Zellen und humanem Herzgewebe	S. 15
2.2 Provokation der Antikörper	S. 15
2.3 IgG-Reinigung der nativen Antiseren und Testung der Spezifität	S. 16
2.4 Western Blot	S. 17
2.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	S. 17
2.4.2 Elektroblot	S. 19
2.4.3 Immunprinting	S. 19
2.5 RNA-Extraktion aus Zellen und humanem Herzgewebe	S. 21
2.6 Northern Blot	S. 21
2.6.1 Gelelektrophorese	S. 21
2.6.2 Kapillar- und Vakuumblot	S. 22
2.6.3 Prehybridisierung, Hybridisierung und Entwicklung	S. 22
3. Histologische Techniken	S. 24
3.1 Anfertigen von Gewebeschnitten	S. 24
3.2 Chemikalien	S. 24
3.3 Immunhistologie an Zellen	S. 25
3.4 Immunhistologie am Gewebeschnitt	S. 26
IV. ERGEBNISSE	S. 27
1. Testung der Antiseren	S. 27
1.1 IgG-Reinigung der nativen Antiseren	S. 27
1.2 Testung der Spezifität der Antiseren im Dot Blot	S. 28
1.3 Darstellung der Spezifität der Antiseren mittels Immunhistologie	S. 29

2. ANT1 im humanen Herzen	S. 32
2.1 ANT1-Protein-Quantifizierung	S. 32
2.2 ANT1-mRNA-Quantifizierung	S. 35
2.3 Immunhistochemischer Nachweis von ANT1	S. 36
3. ANT2 im humanen Herzen	S. 38
3.1 ANT2-Protein-Quantifizierung	S. 38
3.2 ANT2-mRNA-Quantifizierung	S. 40
3.3 Immunhistochemischer Nachweis von ANT2	S. 41
4. ANT3 im humanen Herzen	S. 43
4.1 ANT3-Protein-Quantifizierung	S. 43
4.2 ANT3-mRNA-Quantifizierung	S. 45
4.3 Immunhistochemischer Nachweis von ANT3	S. 45
5. Zusammenfassung der Ergebnisse	S. 48
V. DISKUSSION	S. 49
1. ANT1 im humanen Herzen	S. 50
1.1 ANT1-Quantifizierung	S. 50
1.2 ANT1-Knock-out-Mäuse	S. 51
1.3 Mutationen im ANT1-Gen	S. 52
1.4 ANT1 und Apoptose	S. 53
1.5 Auto-Antikörper gegen ANT1	S. 54
1.6 Der ANT1-Promotor	S. 55
2. ANT2 im humanen Herzen	S. 56
2.1 ANT2-Quantifizierung	S. 56
2.2 ANT2-Expression unter verschiedenen metabolischen Gegebenheiten	S. 57
2.3 ANT2-Expression in verschiedenen Zellpopulationen des Herzens und in der Leber	S. 58
2.4 Der ANT2-Promotor	S. 59
2.5 Funktionelle Unterschiede der ANT-Isoformen	S. 61
2.6 ANT-Expression im fetalen Herzen	S. 61
2.7 ANT2-Expression und T3	S. 63
3. ANT3 im humanen Herzen	S. 64
3.1 ANT3-Quantifizierung	S. 64
3.2 ANT3-Expression in verschiedenen Zellpopulationen des Herzens und in der Leber	S. 64
3.3 Der ANT3-Promotor und die Bedeutung des ANT3	S. 64
VI. ZUSAMMENFASSUNG	S. 65
VII. LITERATURVERZEICHNIS	S. 67
VIII. DANKSAGUNG	S. 72
IX. LEBENS LAUF	S. 73

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAC	ADP/ATP carrier (in der Hefezelle)
ABC	Avidin and Biotinylated horseradish peroxidase macromolecular Complex
ACA	Acrylamid
ADP	Adenosindiphosphat
adPEO	autosomal-dominante progressive externe Ophthalmoplegie
AEBSF	4-(2-Aminoacyl)benzonsulfonylfluorid-Hydrochlorid = $C_8H_{10}NO_2SF \times H_2O$
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
ANT	Adenin-Nukleotid-Translokase (in Säugetierzellen)
AP	Alkalische Phosphatase
AP2	activator protein 2
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin = m-maleimidobenzoyl-N-hydroxy-sulfosuccinimide ester
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CO ₂	Kohlendioxid
CTP	Cytidintriphosphat
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DEP	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulphoxid = C_2H_6OS
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	fetales Kälberserum
GDP	Guanindiphosphat
grb	gel running buffer
GRBOX	glycolysis-regulated box
GTP	Guanintriphosphat
H ₂ O	Wasserstoffoxid = Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICM	Ischämische Kardiomyopathie
IgG	Immunglobulin G
kDa	kilo Dalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
KLH	keyhole limpet hemocyanin = N-succinyl-6-maleimidocaproate

lb	loading buffer
LDH	Laktatdehydrogenase
LV	linksventrikulär
mGPDH	mitochondriale Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase
μCi	Mikro-Curie
MOPS	C3-(N-Morpholino)propanesulfonicacid
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mtDNA	mitochondriale DNA
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NYHA	New York Heart Association
O ₂	Sauerstoff
OXPPOS	oxidative Phosphorylierung
PBS	phosphate buffer soline
PFA	Paraformaldehyd
PP	Probenpuffer
PTPC	permeability transition pore complex
PTP	Permeabilitäts-Transitions-Pore
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minutes
RT-PCR	reverse transcriptase – polymerase chain reaction
ROX	regulation by oxygen
SDS	Natriumduodecylsulfat
Sp1	stimulating protein 1
SSC	Trinatriumcitrat Dihydrat = $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$
SSPE	Saline-Sodium Phosphat-Ethylendiamintetraacetic Acid
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
T3	Triiodthyronin
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin = $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan = $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$
TR	thyroid hormone receptor
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
TTP	Thymidintriphosphat
upm	Umdrehungen pro Minute
URS	upstream repressing sequence
VDAC	voltage-dependent anion channel

II. EINLEITUNG

1. DIE HERZINSUFFIZIENZ

1.1 Definition

Die Herzinsuffizienz ist eine klinische Definition. Man versteht darunter den Zustand eines Patienten, bei dem trotz genügenden venösen Angebots das Herz nicht in der Lage ist, den gesamten Organismus seinen Bedürfnissen entsprechend mit Blut zu versorgen (Braunwald, 1980). Das Bild einer chronischen Herzinsuffizienz manifestiert sich klinisch aber erst, wenn die Einbußen der Myokardkontraktilität durch die Kompensationsmechanismen nicht länger maskiert werden können.

Die Definitionen der World Health Organisation (1996) und der European Society of Cardiology (1995) konzentrieren sich auf drei Punkte:

1. Nachweis einer abnormalen systolischen oder diastolischen Funktion des Herzens,
2. typische Symptome wie Leistungseinschränkung, Dyspnoe, Natrium- und Wasserretention, die nachweislich auf die abnormale Funktion des Herzens zurückzuführen sind und
3. Ansprechen auf Therapie.

Der Linksherzinsuffizienz liegt primär eine Kontraktionsstörung mit Vorwärtsversagen zugrunde. Die Inspektion zeigt einen dyspnoischen Patienten mit peripherer Zyanose. Der oft wahrnehmbare frühdiastolische 3. Herzton ist als Zeichen eines dilatierten, kontraktionsgestörten Ventrikels mit vergrößerten diastolischen Volumina zu werten. Der prä systolische 4. Herzton weist auf eine kontraktile Beanspruchung des Vorhofes bei erschwerter linksventrikulärer Füllung hin. Bei Rechtsherzinsuffizienz besteht primär eine Relaxationsstörung. Sie zieht durch Rückwärtsversagen eine systemische Stauung nach sich. Ein anfänglich allein bestehendes Vorwärtsversagen führt über ein Lungenödem zum pulmonalarteriellen Druckanstieg und damit zur Belastung des rechten Ventrikels. Bei Dekompensation des rechten Ventrikels stellt sich das Bild einer globalen Rechts-Linksherzinsuffizienz ein.

Die New York Heart Association (NYHA) teilte 1972 die chronische Herzinsuffizienz entsprechend der Symptomatik in vier Schweregrade ein:

- I keine Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit
- II Beschwerden bei stärkeren Graden der gewohnten Belastung
- III Beschwerden bei gewohnter körperlicher Tätigkeit
- IV Beschwerden in Ruhe

1.2 Inzidenz

Die Herzinsuffizienz ist eine der am häufigsten gestellten internistischen Diagnosen. Sie stellt ein gesundheitliches und gesundheitsökonomisches Problem dar und ist zunehmend der Grund für eine Hospitalisierung (Sharpe, Doughty, 1998).

Trotz besserer Prävention ist ein Anstieg der Inzidenz der Herzinsuffizienz zu verzeichnen. Eine Ursache hierfür ist die Abnahme der Mortalität nach einem Herzinfarkt, wodurch mehr Patienten eine Herzinsuffizienz als Spätfolge entwickeln. Eine weitere Ursache ist der Anstieg der Morbidität der Koronaren Herzkrankheit (KHK) (Sharpe, Doughty, 1998; Böhm, 2000).

Erste wichtige Daten zur Epidemiologie der Herzinsuffizienz entstammen der Framingham Heart Study, einer prospektiven Kohortenstudie, die seit 1948 über 5000 Bewohner des amerikanischen Ortes Framingham umfasst. Daten dieser Studie zeigen, daß ungefähr 1% der westlichen Bevölkerung an einer chronischen Herzinsuffizienz leidet, daß bei beiden Geschlechtern ein starker Anstieg von Inzidenz und Prävalenz mit höherem Lebensalter zu beobachten ist und daß Frauen etwas seltener an einer Herzinsuffizienz erkranken als Männer (Böhm, 2000). Die Prävalenz beträgt 0,3-2% und steigt altersabhängig auf 3-13%, die Inzidenz beträgt 0,1-0,5% pro Jahr (Cowie et al., 1997).

Mit ca. 50% führen kardiovaskuläre Erkrankungen in Deutschland die Todesursachenstatistik an. Jährlich sind ca. 200.000 Neuerkrankungen an chronischer Herzinsuffizienz zu verzeichnen. Insgesamt leiden 1,6 Millionen Bundesbürger an einer chronischen Herzinsuffizienz, also 2% der Bevölkerung, davon die Hälfte in den Schweregraden II bis IV. Die Sterblichkeit steigt von 7,5% bei NYHA I auf 40-50% bei NYHA IV. Die chronische Herzinsuffizienz bedingt eine überdurchschnittliche stationäre Verweildauer von im Mittel 18 Tagen und jährliche Klinikkosten von circa 2,6Mrd DM (Eyer mann, 2000).

1.3 Ätiologie

Daten der Framingham-Studie zeigen, daß die arterielle Hypertonie mit 70-75% und die KHK mit 15% die beiden häufigsten Ursachen der Herzinsuffizienz darstellen (Cowie et al., 1999; Böhm, 2000). Eine KHK vervierfacht, eine arterielle Hypertonie verdreifacht bei Frauen bzw. verdoppelt bei Männern das Risiko an einer Herzinsuffizienz zu erkranken (Böhm, 2000).

In den letzten Jahrzehnten konnte durch konsequente antihypertensive Therapie die Bedeutung des Bluthochdrucks für die Entstehung einer Herzinsuffizienz zurückgedrängt werden. Gleichzeitig wurde eine relative Zunahme der ischämischen Herzerkrankung als Ursache einer Insuffizienz beobachtet (Böhm, 2000).

Daneben entstehen Insuffizienzen des Herzens auf dem Boden von Myokardinfarkten, Klappenfehlern, Kardiomyopathien und Stoffwechselstörungen oder sind idiopathischer Genese.

Weitere Risikofaktoren sind ventrikuläre Hypertrophie, Tachykardie, verminderte Glucosetoleranz, erhöhte Plasma-Cholesterin-Spiegel, Übergewicht, Rauchen, Alkoholabusus, Stress und geringe körperliche Aktivität (Post et al., 1997; Böhm, 2000).

1.4 Pathophysiologie und Pathobiochemie

Das insuffiziente Herz weist makroskopische und mikroskopische Veränderungen auf, die selten charakteristisch für eine spezifische Erkrankung und nicht regelhaft mit einer spezifischen Ätiologie assoziiert sind. Als Antwort auf eine anhaltene Druck- oder Volumenbelastung reagiert der Herzmuskel mit einer Vermehrung der Muskelmasse: Druckbelastung führt im Allgemeinen zu einer konzentrischen Hypertrophie, Volumenbelastung vornehmlich zu einer Dilatation mit exzentrischer Hypertrophie.

Bis zu einem sogenannten kritischen Herzgewicht findet die Gewichtszunahme als Folge einer Vergrößerung der Einzelzelle statt. Dabei werden in den Myozyten neue Sarkomere gebildet. Sie führen zwar zu einer Verlängerung der Muskelfasern, tragen aber kaum zur Kontraktionskraftverbesserung bei, weil sie nicht achsensenkrecht angeordnet und nicht funktionsgerecht strukturiert sind. Hinzu kommt, daß sich das Verhältnis Myozyten- zu Kapillarquerschnitt so verschlechtert, daß einzelne Myozyten zugrunde gehen. Die noch erhaltenen Myozyten rutschen durch die Herztätigkeit in die freigewordenen Lücken. Sowohl die Verschiebung gegeneinander als auch die longitudinale Wachstumsform verstärken die ventrikuläre Dilatation und Ausdünnung der Wand. Bei dieser myogenen Gefügedilatation muß das Herz während der isovolumetrischen Phase der Systole einen Teil seiner Kraft nur für die Volumenverkleinerung aufbringen, die ihm schließlich bei der Auswurfarbeit fehlt. Gleichzeitig geraten die Myozyten in eine abnorme Zug- und Druckbelastung, was ultrastrukturell zu regressiven Veränderungen wie vergrößerten Zellkernen, Mitochondrienschwellung, Erweiterung des sarkoplasmatischen Retikulums, Auflösung von Myofibrillen und schließlich Myozytennekrosen führt. Durch Auseinanderweichen der Glanzstreifen gehen die für die elektromechanische Kopplung wichtigen Nexus verloren. Es kommt zu einer Vermehrung der Bindegewebszellen mit Aufbau kollagener Matrix und zunehmender Fibrose (Böhm, 2000).

Die Myozyten des insuffizienten Herzens zeigen eine gestörte Calciumhomöostase: infolge verminderter Expression der Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA 2a) ist die Calciumsequestrierung verlangsamt, der Calciumvorrat im SR verringert und die Calciumkonzentration im Zytosol erhöht. Funktionelle Folgen sind Relaxationsstörungen durch

einen diastolischen Resttonus und eine verminderte systolische Kontraktionsfähigkeit (Limas et al., 1987; O'Brien, Gwathmey, 1995; Hellige, 1999; Böhm, 2000, 2001).

Ein zusätzlicher Problemkreis ergibt sich hinsichtlich der myokardialen Energiebilanz. Der Sauerstoffbedarf ist durch die Tachykardie und die erhöhte Wandspannung gesteigert. Gleichzeitig ist das Sauerstoffangebot durch Abnahme der Diastolendauer mit verminderter Koronarperfusion eingeschränkt. Während der Durchsatz in der Atmungskette, im Citratzyklus und der β -Oxidation vermindert ist, ist die Glycolyse verstärkt (Klein et al., 1986; Buchwald et al., 1990; Kalsi et al., 1999). Die insuffizienten Herzen arbeiten also zunehmend anaerob, wie erhöhte Laktatspiegel im Koronarsinusblut sowie erhöhte LDH5- und erniedrigte LDH1-Werte zeigen (Schultheiss, 1992).

Die Kreatinphosphat/ATP-Ratio ist trotz unveränderter ATP-Syntheseraten vermindert. Es besteht eine Korrelation von $r=0,6$ zwischen der Kreatinphosphat/ATP-Ratio und dem NYHA-Grad, nicht aber zwischen der Ratio und der LV-Ejektionsfraktion (Neubauer et al., 1992; Murakami et al., 1999). Nach Klein et al. (1986), O'Brien, Gwathmey (1995) und Kalsi et al. (1999) ist der ATP-turnover jedoch vermindert und die ATP-Produktionskapazität der Kreatinkinase reduziert. Die oxidative Phosphorylierung ist gedrosselt. Ergebnisse von Buchwald et al. (1990) zeigen einen verminderten Cytochrom-Gehalt, die Enzymaktivitäten der Cytochrom c-enthaltene Komplexe I und IV der Atmungskette sind reduziert.

Zur Kompensation der unzureichenden Pumpleistung des Herzens wird das neurohumorale System aktiviert. Die lokale adrenerge Aktivierung mit erhöhter Freisetzung von Noradrenalin aus dem Herzen und verminderter Aktivität des kardialen Noradrenalin-Uptake-1-Carriers geht der generalisierten Sympathikusaktivierung voraus. Bei wiederholter Besetzung der β -Adrenorezeptoren kommt es zur Abnahme der Rezeptordichte. Die β -Adrenorezeptor-Downregulation verläuft proportional zum Schweregrad der Herzinsuffizienz und betrifft vor allem den β_1 -Rezeptorsubtyp (Hellige, 1999; Böhm, 2001).

Durch Vasokonstriktion wird initial eine ausreichende Organperfusion aufrechterhalten. Die Vasokonstriktion ist unter anderem durch Stimulation vaskulärer α -Adrenorezeptoren, Aktivierung des systemischen und kardialen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und erhöhte Konzentrationen an Plasma- und kardialem Gewebs-Endothelin1 bedingt. Der erhöhte periphere Widerstand und die erhöhte Wandspannung bedingen eine kompensatorische Hypertrophie der Myozyten. Auch die erhöhten Konzentrationen an Katecholaminen und anderen Mediatoren wie AngiotensinII, Aldosteron und Endothelin1 wirken als Wachstumsfaktoren mitogen. Sie führen zu einer Hypertrophie der Myozyten und Proliferation der Fibroblasten mit gesteigerter Expression von Kollagen. Der vermehrt bei Herzinsuffizienz freigesetzte $\text{TNF}\alpha$ wirkt negativ inotrop, induziert Apoptose, trägt zum linksventrikulären

Remodeling nach myokardialer Schädigung bei und induziert bei Überexpression eine Kardiomyopathie mit klinisch relevanter Herzinsuffizienz (Hellige, 1999; Böhm, 2001).

2. DIE ADENIN-NUKLEOTID-TRANSLOKASE

Die Adenin-Nukleotid-Translokase (ANT) gehört zu einer Familie von Transportproteinen der inneren Mitochondrienmembran. Die Proteine dieser Familie besitzen eine ähnliche Aminosäuresequenz, eine ähnliche Sekundärstruktur und sind als Homodimere organisiert (Klingenberg, Nelson, 1994). Die Adenin-Nukleotid-Translokase hat mit 10-15% den größten Anteil an den Proteinen der inneren Mitochondrienmembran (Klingenberg, 1981).

ANT ist der einzige Carrier, der den Antiport von im Mitochondrium synthetisiertem ATP gegen zytosolisches ADP im Verhältnis 1:1 über die innere Mitochondrienmembran katalysiert. Der Nukleotidtransport ist hoch spezifisch für ADP und ATP. Der Antiport wird durch die im Protonengradienten gespeicherte Energie in Richtung ATP-Export angetrieben. Die energiereichen Phosphorsäureanhydridbindungen des ATP können so zum Antrieb energieabhängiger Reaktionen im Zytosol genutzt werden. ANT nimmt damit eine zentrale Rolle im Energiehaushalt der Zelle ein (Barbour, Chan, 1981).

Die Rate des Nukleotidaustausches wird durch die Aktivität des Antiporters, die zytosolische ADP/ATP-Ratio, die Konzentration endogener Inhibitoren wie langkettige Acyl-CoA-Ester und den Energiestatus des Mitochondriums beeinflusst (Barbour, Chan, 1981).

ANT ist ein Dimer aus zwei identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 2x 30kDa (Klingenberg, 1981). Ein Monomer besteht aus drei separaten, strukturell verwandten Modulen von jeweils ca. 100 Aminosäuren. Jedes Modul besteht aus 2 hydrophoben, transmembranären α -Helices von ungefähr 20 Aminosäuren, die durch hydrophile matrixexponierte, helikale Loops von 40-50 Aminosäuren verbunden sind. Das N-terminale Ende liegt auf der zytosolischen Seite. Die Nukleotidbindungsstelle liegt in dem hydrophoben Abschnitt der zweiten Domäne (Klingenberg, 1992; Klingenberg, Nelson, 1994).

ANT ist sowohl im peripheren Teil der inneren Mitochondrienmembran als auch in den Abschnitten, welche die Cristae formen, lokalisiert (Bucheler et al., 1991). Mittels ANT-Isotypspezifischer Antikörper und Sequenzanalyse des N-terminalen Endes, konnten Vyssokikh et al. (2001) an aus Rattenherzen isolierten Mitochondrien zeigen, daß die periphere innere Mitochondrienmembran ANT1 und ANT2 enthält, während die Cristae ausschließlich ANT2 enthalten.

Die Insertion des ADP/ATP-Carriers der Hefezelle (AAC) in die innere Mitochondrienmembran ist gut untersucht: AAC ist kernkodiert und wird nach Bildung der mRNA an zytosolischen Ribosomen synthetisiert. Im Gegensatz zu vielen anderen kernkodierten mitochondrialen Proteinen enthält das AAC-Protein keine amino-terminale Präsequenz für die Translokation ins Mitochondrium. Die Targeting-Information liegt bei AAC, wie auch bei anderen Mitgliedern dieser Carrier-Familie, innerhalb der Aminosäuresequenz, wobei jedes der drei Module Targeting-Informationen enthält (Endres et al., 1999; Wiedemann et al., 2001).

Der posttranslationale Transfer via Zytosol erfolgt als löslicher Komplex aus mehreren Proteinmolekülen (Zimmermann, Neupert, 1980). AAC wird nach Bindung an den Außenmembran-Rezeptor Tom70 über die Außenmembran transloziert. Über Assoziation mit verschiedenen Proteinkomplexen des Intermembranraums wird die membranpotential-abhängige Insertion des AAC in die Innenmembran katalysiert, wo das AAC in seine dimere Form übergeht (Sollner et al., 1990; Steger et al., 1990; Endres et al., 1999; Wiedemann et al., 2001). Die Energie für den AAC-Import stammt aus der Hydrolyse von ATP im Zytosol und in der mitochondrialen Matrix sowie aus der protonenmotorischen Kraft über die Innenmembran.

Beim Menschen sind drei ANT-Isoformen bekannt (Neckelmann et al., 1987; Houldsworth, Attardi, 1988; Cosenz et al., 1989; Ku et al., 1990). Daneben gibt es mindestens sieben Pseudogene, die eine hohe Homologie zu den drei ANT-Genen aufweisen, die aber für kein Protein kodieren. Alle drei Isoformen bestehen aus 297 Aminosäuren und zeigen eine hohe Homologie (Houldsworth, Attardi, 1988).

Alle drei Gene bestehen aus je vier Exons. Die drei Introns unterbrechen die kodierende Sequenz an Stellen, die in den extramembranären Loops 1, 4 und 5 liegen (Cosenz et al., 1989). Das ANT1-Gen ist auf Chromosom 4 lokalisiert, das ANT2-Gen auf dem langen Arm des X-Chromosoms und das ANT3-Gen in den pseudoautosomalen Regionen des X- und Y-Chromosoms (Li et al., 1989; Chen et al., 1990; Slim et al., 1993).

Auch in Hefen existieren drei ANT-Isoformen, kodiert durch AAC1, AAC2 und AAC3 (Barath et al., 1999a). Sie zeigen unterschiedliche kinetische Charakteristika (Gawaz et al., 1990). AAC1 und 2 erlauben den Hefezellen aerob zu wachsen, AAC3 ist essentiell für das anaerobe Wachstum, es stellt dem Mitochondrium glycolytisches ATP zur Verfügung, indem es den ADP/ATP-Austausch in umgekehrter Richtung ermöglicht. Die Aminosäuresequenz von ANT2 zeigt die stärkste Homologie zu AAC3 (Giraud et al., 1998).

In Ratten wurden zwei Isoformen beschrieben, die den humanen Isoformen 1 und 2 entsprechen.

Die ANT1-mRNA ist in Herz- und Skelettmuskulatur stark exprimiert (Neckelmann et al., 1987; Li et al., 1989). Neben seiner Funktion als Adenin-Nukleotid-Carrier ist ANT1 an der

Apoptose beteiligt: Zusammen mit Proteinen wie Bax, einem proapoptotisches Bcl-2-Gen, bildet ANT1 als unselektive Pore die Permeabilitäts-Transitions-Pore. Die erhöhte Permeabilität der Innenmembran führt zum Verlust des Membranpotentials, zur Mitochondrienschwellung, zur Freisetzung von Faktoren wie Cytochrom c und schließlich zur Apoptose. Durch Assoziation mit ANT1 reguliert Cyclophilin D die Öffnung der PTP und unterdrückt so die Apoptose im gesunden Gewebe (Ruck et al., 1998; Bauer et al., 1999; Vieira et al., 2000).

Die ANT2-mRNA ist nur in geringem Maße im Herz- und Skelettmuskel sowie stark in Fibroblasten, Leber, Niere und Gehirn exprimiert (Li et al., 1989; Ku et al., 1990).

Die ANT2-mRNA-Expression ist in Geweben mit Proliferationskapazität, in neoplastisch-transformierten Zellen mit hoher Glycolyse-Rate sowie in sich schnell teilenden Zellen hoch. Es besteht eine hohe, positive Korrelation zwischen der Zelldichte und der ANT2-Expression. In Zellen, welche differenzieren, nimmt die ANT2-Expression ab. Bei oxidativem Metabolismus und in ruhenden Zellen sind die ANT2-mRNA-Spiegel niedrig. Beim Übergang vom oxidativen zum glycolytischen Metabolismus kommt es zu einer ANT2-Induktion, wahrscheinlich um die mitochondrialen energieabhängigen Funktionen, durch Import von glycolytischem ATP ins Mitochondrium, sicherzustellen. Schon 1980 beobachteten Krämer und Klingenberg, daß ANT den ADP/ATP-Austausch in beide Richtungen realisieren kann (Battini et al., 1987; Giraud et al., 1998; Barath et al., 1999a). Die ANT2-Expression steigt nach T3-Applikation via Transkriptionsaktivierung an (Dümmeler et al., 1996).

Die ANT3-mRNA ist in allen untersuchten Geweben entweder nicht oder schwach exprimiert (Barath et al., 1999a).

3. FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Bei Herzinsuffizienz induziert die abnorme mechanische Herzdehnung über Veränderungen der Gen- und Proteinexpression das ventrikuläre Remodeling mit Elongation und Hypertrophie der Myozyten. Gleichzeitig kommt es zu Alterationen der oxidativen Phosphorylierung und einer Reduktion der energiereichen Phosphate (Ning et al., 2000). Der desolate Energiehaushalt der Myozyten verstärkt die ventrikuläre Dysfunktion.

Da die Adenin-Nukleotid-Translokase (ANT) essentiell für die Bereitstellung energiereicher Phosphate im Zytosol ist, stellt sich die Frage, inwieweit eine veränderte Expression bzw. Aktivität des ANT an der mangelnden Energieversorgung der Myozyten beteiligt ist.

Im Mittelpunkt des Interesses steht die Frage, ob die Expression von ANT bzw. einzelner Isoformen im Rahmen der Kompensationsmechanismen bei Herzinsuffizienz erhöht wird. Oder besteht primär eine Reduktion des Gesamt-ANT bzw. einzelner Isoformen, wodurch ein Energiedefizit generiert wird, der die ventrikuläre Dysfunktion verursacht oder verstärkt? Und führt dies sekundär zur Erhöhung einer primär nicht affizierten ANT-Isoform?

In der Literatur finden sich widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der ANT-Isoform-Expression im insuffizienten Herzen: Während in explantierten Herzen von Patienten mit Dilatativer Kardiomyopathie eine Zunahme der ANT1-mRNA, eine Abnahme der ANT2-mRNA und ein unveränderter Gehalt an ANT3-mRNA gefunden wurde, zeigte sich im Schwein eine Reduktion der Transkription und Translation von ANT1, wobei die untersuchte Insuffizienz durch Ligation der A. circumflexa induziert wurde. Korrespondierende Proteindaten liegen für die humanen ANT-Isoformen bisher nicht vor.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist zu zeigen, ob und gegebenenfalls wie die Expression der ANT-Isoformen im humanen insuffizienten Herzen im Vergleich zum gesunden Herzen verändert ist. Für die Untersuchungen werden Proben aus dem linken Ventrikel dilatierter (DCM) sowie ischämisch geschädigter Herzen (ICM) verwendet. Die Untersuchung soll nicht nur auf mRNA-Ebene, sondern zum ersten Mal auch auf Proteinebene geführt werden. Eine Aussage über den Proteingehalt ist interessant und sinnvoll, da der Proteingehalt und nicht die Menge der mRNA für die Herzfunktion relevant ist und von einer gegebenenfalls vorhandenen Korrelation zwischen mRNA- und Proteinkonzentration nicht ausgegangen werden kann.

Vorrangiges Ziel für die Untersuchung auf Proteinebene ist die Provokation der isoform-spezifischen Antikörper gegen humanes ANT1, 2 und 3. Die Spezifität der Antikörper wird mittels Dot Blot und immunhistochemisch an verschiedenen Geweben getestet. Die Verifizierung der Spezifität in der Immunhistologie erfolgt unter der Annahme einer zell- und gewebespezifischen ANT-Isoform-Verteilung.

Ziel ist es, die Protein- und mRNA-Mengen der einzelnen ANT-Isoformen bei Herzinsuffizienz näher zu charakterisieren. Die Untersuchungen umfassen:

- semiquantitative Western Blots,
- quantitative Western Blots,
- immunhistologische Nachweise und
- quantitative Northern Blots.

III. MATERIAL UND METHODEN

Die eingesetzten Chemikalien stammen, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck oder Sigma. Bei dem verwendeten H₂O handelt es sich um destilliertes, deionisiertes Wasser. Das humane Herzgewebe der 5 DCM- und 5 ICM-Patienten wurde uns von Herrn Prof. Dr. Wieland (Institut für Pharmakologie, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Die 4 Proben von gesunden Probanden erhielten wir von Herrn Pregla (Deutsches Herzzentrum Berlin) bzw. von Frau Prof. Dr. Lockemann (Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg). Die Paraffinschnitte humaner Herzen und humaner Leber wurden uns von Herrn Prof. Dr. Schäfer (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Die Gewebe stammen von männlichen, über 45jährigen Patienten ohne relevante Begleiterkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus. Alle Proben wurden dem linken Ventrikel entnommen.

1. ZELLKULTUR

Humanes Herzgewebe ist außerordentlich wertvoll und daher ungeeignet, die analytischen Prozeduren zu etablieren. Daher erfolgte die Testung der biochemischen, molekularbiologischen und immunhistologischen Verfahren an hepatozellulären Karzinomazellen (HepG2), welche zudem - im Unterschied zu Myozyten - einfach zu kultivieren sind. Außerdem diente der Einsatz von Leberzellen der Testung der Spezifität der Antiseren sowie als Kontrolle in den Northern Blots, da ANT2 und 3 im Gegensatz zu ANT1 in Hepatozyten exprimiert werden.

HepG2-Zellen (ATCC HB8065) sind humane hepatozelluläre Karzinomazellen. Die Zellen wurden in Dulbeccos MEM (Fa. Gibco BRL, Life Technologies) mit einem Zusatz von 10% FKS (Biochrom Seromed) bei 37°C in einer mit 5% CO₂ angereicherten, wassergesättigten Atmosphäre kultiviert (Brutschrank: Fa. Heraeus). Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen „gesplittet“. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen 1x mit PBS (s. 2.4.3) gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung (Fa. Biochrom KG) bedeckt. Die Trypsin/EDTA-Lösung wurde wieder abgesaugt und die Zellen wurden 5-10 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium suspendiert, vereinzelt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 2×10^4 Zellen/cm² in neue Kulturflaschen (Fa. Greiner) ausgesät. Die Passage der Zellen wurde an der Sicherheitswerkbank (Fa. Antair Anthos, Typ BSK 4 MP) durchgeführt.

2. MOLEKULARBIOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE TECHNIKEN

2.1 Mitochondrien-Präparation aus Zellen und humanem Herzgewebe

Mitochondrienpuffer: 0,3M Sucrose
5mM Tris-HCl, pH 7,6
100mM-AEBSF (Roche)

Zur Untersuchung der ANT-Expression im Western Blot wurden zunächst Mitochondrien präpariert. Dazu wurden die oben genannten Zellen aus der Zellkultur verwendet.

Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen, mit 5ml Mitochondrienpuffer abgeschabt und in den eisgekühlten Downcer überführt. Die Zellen wurden durch 20maliges Downcen aufgeschlossen. Die so erhaltene Suspension wurde in 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt und 10 Minuten bei 1700rpm und 4°C zentrifugiert (Sorvall, RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pont Instruments). Der Überstand, in dem sich die Mitochondrien befanden, wurde in Corex-Röhrchen überführt und die Mitochondrien durch Zentrifugation (20 Minuten bei 10.000rpm und 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde 3x mit 5ml Mitochondrienpuffer gewaschen, zentrifugiert und in 200-500µl Mitochondrienpuffer suspendiert.

Mit Hilfe der Bradford-Methode (Standardkurve, Extinktion gegen Proteinkonzentration) wurde die Proteinkonzentration der Mitochondriensuspension bestimmt (Bradford et al., 1976).

Zur Mitochondrienpräparation von Mitochondrien aus Herzgewebe wurde das Gewebe zunächst grob zerkleinert. Anschließend wurden die Zellen im Potter aufgeschlossen. Die weitere Präparation erfolgte analog zur Mitochondrienpräparation aus Zellen.

2.2 Provokation der Antikörper

Die Schwierigkeit der Provokation spezifischer Antikörper ist darin begründet, ausreichend lange Aminosäure-Sequenzen zu finden, die eine ausreichend hohe Anzahl unterschiedlicher, nicht kreuzreagierender Aminosäuren aufweisen. Durch Vergleich der Aminosäuresequenzen aller drei ANT-Isoformen (s. Abb. 1) wurden Abschnitte gefunden, in denen sich die sonst so ähnlichen Isoformen unterscheiden. In Abbildung 1 sind diejenigen Aminosäuren farblich hervorgehoben, in denen sich die drei Isoformen voneinander unterscheiden. Die farblich unterlegten Abschnitte zeigen die Sequenzen der Peptide, mit denen die Immunisierung vorgenommen wurde. Die Peptide wurden im Heinrich-Pette-Institut von Herrn Dr. Heukeshoven hergestellt:

ANT1-Peptid: gaaqrefhg

ANT2-Peptid: a) mtdaavsfak, b) kagaerefrlgdc

ANT3-Peptid: sgterefrlgdc

hANT1	1	mgdhawsflk	dflaggvaaa	vsktavapie	rvkl111qvqh	askqisaekq	ykgiidcvvr
hANT2	1	mtdaavsfak	dflaggvaaa	isktavapie	rvkl111qvqh	askqitadkq	ykgiidcvvr
hANT3	1	mteqaisfak	dflaggiaaaa	isktavapie	rvkl111qvqh	askqiaadkq	ykgiidcvvr
hANT1	61	ipkeggflsf	wrgnlanvir	yfptqalnfa	fkdkykqlfl	ggvdrhkqfw	ryfagnlasg
hANT2	61	ipkeggvlsf	wrgnlanvir	yfptqalnfa	fkdkykqifl	ggvdkrtqfw	ryfagnlasg
hANT3	61	ipkeggvlsf	wrgnlanvir	yfptqalnfa	fkdkykqifl	ggvdkhtqfw	ryfagnlasg
hANT1	121	gaagatslcf	vypldfartr	laadvkgaa	qrefhglgdc	iikifksdgl	rglyqgfnvs
hANT2	121	gaagatslcf	vypldfartr	laadvkgaga	erefrglgdc	lvkiyksdgi	kglyqgfnvs
hANT3	121	gaagatslcf	vypldfartr	laadvksgt	erefrglgdc	lvkitksdgi	rglyqgfnvs
hANT1	181	vqgiiiyraa	yfgvydtakg	mlpdpknvhi	fvswmiaqsv	tavaglvssyp	fdtvrmmmm
hANT2	181	vqgiiiyraa	yfgiydtakg	mlpdpknthi	viswmiagt	tavagltssyp	fdtvrmmmm
hANT3	181	vqgiiiyraa	yfgvydtakg	mlpdpknthi	fvswmiagt	tavagvssyp	fdtvrmmmm
hANT1	241	qsgrkgadim	ytgtvdcwrk	iakdegakaf	fkqawsnvlr	gmggafvlvl	ydeikkyv
hANT2	241	qsgrkgtdim	ytgtldcwrk	iardegakaf	fkqawsnvlr	gmggafvlvl	ydeikkyt
hANT3	241	qsgrkgadim	ytgtvdcwrk	ifrdegakaf	fkqawsnvlr	gmggafvlvl	ydeikkyi

Abb. 1

Aminosäuresequenzen der drei humanen ANT-Isoformen

Farblich hervorgehoben sind diejenigen Aminosäuren, in denen sich die drei Isoformen voneinander unterscheiden. In den farblich unterlegten Abschnitten bestehen die meisten Abweichungen zwischen den einzelnen Isoformen. Diese Abschnitte zeigen die Sequenzen der Peptide, mit denen die Immunisierung erfolgte und somit die Regionen, gegen die die Antikörper gerichtet sind.

Die Antiseren, welche polyklonale Antikörper gegen humanes ANT1, 2 bzw. 3 enthalten, wurden durch Immunisieren von je zwei Kaninchen mit an unterschiedliche Trägerproteine gekoppelte Peptide gewonnen. Für die erste Immunisierung (Tag0) wurde an KLH (N-Succinyl-6-maleimidocaproate) gekoppeltes Peptid verwendet. Die erste Boosterung (Tag28) erfolgte mit an Ovalbumin (N-Succinyl-4-maleimidobutyrate) gekoppeltem Peptid, die zweite Boosterung (Tag42) mit an BSA (m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxy-sulfosuccinimide ester) gekoppeltem Peptid. Die erste Serumentnahme wurde am 38. Tag, die zweite am 52. Tag und die Entblutung nach einer erneuten Injektion (Tag56) am 70. Tag vorgenommen.

Die Immunisierung erfolgte in der Fa. Charles River Dtl. GmbH, Kißlegg.

2.3 IgG-Reinigung der nativen Antiseren und Testung der Spezifität

Die Entscheidung, ob für die weiteren Untersuchungen das Serum aus der ersten oder zweiten Entnahme bzw. aus der Entblutung verwendet werden soll, wurde mit Hilfe von Western Blots (s. III. 2.4) gefällt.

Um den im Western Blot beobachteten Hintergrund zu minimieren, wurde eine IgG-Reinigung aus den Antiseren vorgenommen.

Mit den Econo-Pac-Säulen (Econo-Pac Serum IgG Purification Kit, Biorad) erfolgte zuerst die Entsalzung des Serums und anschließend die Trennung des IgG von anderen Serumproteinen und Plasminogen.

- "application buffer": 1,3g "rabbit application buffer solids" in 300ml H₂O lösen
durch ein 45µm-Filter filtrieren
pH mit HCl auf 8,0 einstellen
- "regeneration buffer": 12,2g "regeneration buffer solids" in 100ml H₂O lösen
durch ein 45µm-Filter filtrieren

Für die Entsalzung der Proben wurden die 10DG-Säulen mit 20ml "application buffer" äquilibriert. Dann wurden 3ml Serum auf die Säule gegeben und anschließend der Durchlauf verworfen. Die Eluation erfolgte mit 4ml "application buffer".

Für die IgG-Reinigung wurde die Econo-Pac-Säule vor der ersten Benutzung mit 40ml "regeneration buffer" und danach mit 40ml "application buffer" gewaschen. Vor jeder Benutzung wurde die Säule mit 30ml "application buffer" äquilibriert. Dann wurden 2,5ml der entsalzten Probe auf die Säule gegeben und der Durchlauf verworfen. Die Eluation erfolgte mit 20ml "application buffer". Das Eluat wurde in 2,5ml-Fractionen gesammelt. Die einzelnen Fractionen (1:10 gegenüber dem nativen Serum verdünnt) sowie das Eluat nach Entsalzung wurden im Western Blot getestet.

Die Spezifität der Antiseren wurde im Dot Blot getestet. Im Dot Blot wurden von den ANT-Peptiden bestimmte Mengen auf eine Nitrocellulosemembran (Protran^R Nitrocellulose Transfer Membrane, Fa. Schleicher & Schuell) aufgedottet und trocknen gelassen. Danach wurde die Membran in 5% Magermilch/PBS 20 Minuten inkubiert. Die Inkubation mit den Antiseren bzw. dem Präimmunserum wurde in verschiedenen Verdünnungen in 5% Magermilch/PBS über Nacht bei 4°C vorgenommen. Danach wurde wie beim Western Blot verfahren.

Die Spezifität wurde - unter der Annahme einer zell- und gewebespezifischen Verteilung der ANT-Isoformen - immunhistologisch an Paraffinschnitten (s. III. 3.4) von humaner Leber und Skelettmuskel verifiziert.

2.4 Western Blot

2.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

- 2x PP (2x SDS-Probenpuffer): 25% Sammelgelpuffer
20% Glycerin
4% SDS
2% Mercaptoethanol
1% Bromphenolblau

4x Trenngelpuffer:	1,5M Tris-HCl, pH 8,8 0,4% SDS
4x Sammelgelpuffer:	0,5M Tris-HCl, pH 6,8 0,4% SDS
5x SDS-Elektrophorese-Puffer:	125mM Tris 960mM Glycin 0,5% SDS
Trenngel:	1,8ml ACA (ACA-Stocklösung, Quantum Appligene, Acrylamid-Bis-Acrylamid 29-1 Mixture) 1,5ml Trenngelpuffer 2,7ml H ₂ O 45µl 10% APS 7µl TEMED (Plusone, Pharmacia Biotech)
Sammelgel:	0,5ml ACA 1,25ml Sammelgelpuffer 3,3ml H ₂ O 25µl 10% APS 10µl TEMED

In der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteine im Trenngel nach ihrer Molekülgröße, also unabhängig von ihrer Tertiärstruktur oder ihrer Oberflächenladung aufgetrennt. Durch die Anwesenheit von Mercaptoethanol im Probenpuffer werden die Disulfidbrücken aufgebrochen. Das SDS, ein starkes Detergenz, sorgt durch seine Anlagerung an die Proteine für eine vollständige Linearisierung der Moleküle und gibt ihnen eine negative Nettoladung. Die Wanderungsgeschwindigkeit zur Anode wird so allein von der Molekülgröße bestimmt. Ein dem Trenngel vorgeschaltetes Sammelgel bewirkt zunächst eine Fokussierung der Proteine, um die anschließende Auftrennung zu verbessern.

Zuerst wurde ein 12%iges 17 x 20cm großes und 1mm dickes Acrylamid-Trenngel gegossen und während des Polymerisierens mit Isopropanol überschichtet. Nach 30 Minuten wurde das Isopropanol abgegossen und mit H₂O gespült. Danach wurde das Sammelgel auf das Trenngel pipettiert, der Probenkamm blasenfrei eingesetzt und zum Polymerisieren 30 Minuten stehengelassen.

Die Mitochondriensuspension wurde 1:1 mit 2x PP verdünnt, bei 95°C denaturiert und in die Geltaschen pipettiert. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurde 5µl eines Proteinstandards (Kaleidoscope Prestained Standards, Bio-Rad Laboratories) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit 1x Elektrophoresepuffer bei 140V für 1-2 Stunden in der Elektrophoresekammer (Fa. Biometra).

2.4.2 Elektroblob

Bjerrum-Schaefer-Nielsen-Blotpuffer:	48mM Tris 39mM Glycin 0,0375% SDS 20% Methanol pH 9,0-9,4
Ponceau S:	0,5% Ponceau S 1M Essigsäure
Coomassie-Blue:	130ml H ₂ O 60ml Methanol 10ml Essigsäure 0,5g Coomassie
Entfärber:	130ml H ₂ O 60ml Methanol 10ml Essigsäure

Die in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteine werden hierbei auf eine Membran übertragen. Dazu werden Gel und Membran direkt blasenfrei aufeinandergelegt. Durch Anlegen eines Stroms senkrecht zur Gelfläche wird der Proteintransfer vom Gel zur Membran im elektrischen Feld ermöglicht.

Drei in Blot-Puffer getränkte Filterpapiere (Chromatography Paper, 3mm, Fa. Whatman) wurden blasenfrei auf die untere Elektrode gelegt. Darüber wurde das in Blot-Puffer äquilibrierte Gel und darauf die in Puffer getränkte Nitrocellulosemembran sowie nochmals drei Blatt Filterpapier gelegt. Mit der oberen Elektrode wurde der Blotter (Fa. Phase) geschlossen und anschließend beschwert. Der Elektrotransfer erfolgte bei 80mA in 1 Stunde.

Nach dem Elektroblob wurden die auf die Membran transferierten Proteine mit Ponceau S angefärbt.

Zum Nachweis, daß auf alle Bahnen gleich viel Protein aufgetragen wurde, wurden die Gele nach dem Blot mit Coomassie-Blue 1 Stunde inkubiert und anschließend über Nacht entfärbt.

2.4.3 Immunprinting

10x PBS:	1,4M NaCl 27mM KCl 98mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 14,7mM KH ₂ PO ₄
----------	---

- TE-Puffer: 10mM Tris (pH 8,0)
1mM EDTA (pH 8,0)
- Dig3- Puffer: 100mM Tris
100mM NaCl
108mM MgCl₂
pH 9,5
- NBT/BCIP: 18,75mg/ml NBT und 9,4mg/ml BCIP in 67% DMSO (Roche Diagnostics)
1:50 in Dig3-Puffer

Zunächst wurde die Membran 1 Stunde in 5% Magermilch/PBS geschwenkt, um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu verhindern. Anschließend wurde die Membran in der entsprechenden Verdünnung der ANT-spezifischen Antikörper in 5% Magermilch/PBS über Nacht bei 4°C inkubiert.

Um die überschüssigen, nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran 3x 10 Minuten in PBS gewaschen. Danach wurde die Membran mit einem Kaninchen-IgG-spezifischen, mit alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörper (Alkaline Phosphatase-AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG, Fc, Dianova, Jackson Immunoresearch Laboratories) 1:5000 in Dig3-Puffer 2 Stunden inkubiert. Zum Entfernen des ungebundenen Überschusses wurde die Membran wieder 3x 10 Minuten in PBS und zusätzlich 1x 10 Minuten in Dig3-Puffer gewaschen.

Die Detektion der alkalischen Phosphatase erfolgte mit NBT/BCIP. Hier dient BCIP als AP-Substrat, das nach seiner Phosphorylierung in einen blauen Indigofarbstoff überführt wird. Als Oxidationsmittel dient NBT, das bei dieser Reaktion ebenfalls zu einem blauen Farbstoff reagiert. Die Bildung des Farbkomplexes wurde beobachtet und mit TE-Puffer gestoppt. Die Membran wurde an der Luft getrocknet.

Für die Detektion mit ECL erfolgte die Behandlung der Membran und die Inkubation mit dem ersten Antikörper wie bei der Detektion mit NBT/BCIP. Nach 3maligem Waschen der Membran mit PBS wurde der zweite, Peroxidase-konjugierte Anti-Rabbit-IgG-Antikörper (Jackson Immuno Research Laboratories, Dianova) für 1 Stunde inkubiert. Der ungebundene Überschuss des Antikörpers wurde durch 3x 15minütiges Waschen mit PBS entfernt. Die Membran wurde mit einem 1:1 Gemisch aus ECL1- und ECL2-Reagenz (Amersham Pharmacia Biotech) 1 Minute inkubiert. Peracid überführt die Peroxidase in seine oxidierte Form; die Anwesenheit von Luminol und einem Enhancer führt dann zur Lichtemission. Die Lichtemission schwärzt den exponierten Film (Kodak Scientific Imaging Film, X-OMAT bzw. Fuji medical X-Ray Film 100 NIF), der anschließend densitometrisch (TLC Scanner II. CAMAG TLC Evaluation software „cats“, Version 3.20) ausgewertet wurde.

2.5 RNA-Extraktion aus Zellen und humanem Herzewebe

RNAClean™ Solutions: guanidinium-thiocyanate (GTC) / phenol mixture (Hybaid)
H₂O/DEP: 0,1% DEP/H₂O, 1 Stunde inkubieren, autoklavieren

Die in Schalen kultivierten Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen und mit 1ml RNA-Clean (zur Inaktivierung der Nukleasen) abgeschabt. Für die RNA-Extraktion aus Gewebe wurden circa 0,2g mit RNA-Clean im Turrax zerkleinert.

Zur Denaturierung der Proteine wurde 1/10 Volumen Chloroform hinzupipettiert, 15 Sekunden gewirbelt und dann für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde dann 15 Minuten bei 9.000upm und 4°C zentrifugiert (Sorvall). Anschließend wurde die obere, wässrige Phase, circa 50% des Ausgangsvolumens, in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, 1 Volumen Isoprapanol dazugegeben und für weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde 30 Minuten bei 14.000upm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 70%igem Ethanol gewaschen, bei 9000upm 15 Minuten zentrifugiert, an der Luft getrocknet und in 50µl H₂O/DEP gelöst. Die RNA-Konzentration wurde durch Messung der Extinktion bei 260nm bestimmt (Biophotometer, Eppendorf).

2.6 Northern Blot

2.6.1 Gelelektrophorese

10x gel running buffer (grb): 200mM MOPS
50mM NaAcetat
5mM EDTA
pH 7,0

6x loading buffer (lb): 50% Glycerin
1mM EDTA, pH 8
0,4% Bromphenolblau
0,4% Xylene cyanole

Lösung 1:
500µl Formamid, deionisiert
162µl Formaldehyd, 37%, säurefrei
100µl 10x grb
50µl 6x lb

Agarosegel:
1% Agarose
1x grb
1,11% Formaldehyd
2µl Ethidiumbromidlösung (10mg/ml, plusone, Pharmacia Biotech)

Die Auftrennung der RNAs aus der RNA-Extraktion erfolgte entsprechend ihrer Molekülgröße in einem horizontalen 20 x 20cm großen und 1cm dicken Agarosegel.

Das Gel wurde in die Kammer gegossen, die Kämme blasenfrei eingesetzt und das Gel zum Auspolymerisieren für 45-60 Minuten stehen gelassen.

Das Volumen, das einer bestimmten RNA-Menge entspricht wurde mit H₂O auf 10µl aufgefüllt und 30µl Lösung 1 hinzugegeben. Die so vorbereiteten Proben wurden 15 Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde mit 1x grb bei 120V durchgeführt (Gel Electrophoresis Apparatus GNA-200, Pharmacia).

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 10 Minuten auf der UV-Lampe belassen, um die RNA zu fragmentieren (UV-Dunkelkammer und Photoaufsatz: Bachofer Laboriumsgeräte).

2.6.2 Kapillar- und Vakuumblot

Durch den Blot wird die im Gel befindliche RNA auf eine Membran transferiert.

Beim Kapillarblot wurde das Gel auf ein in 1x grb getränktes Filterpapier, dessen Enden über eine Glasplatte in eine Wanne mit 1x grb hingen, gelegt. Die in 1x grb getränkte Membran (Biodyne a transfer membrane, Pall) wurde auf das Gel gelegt, mit 6 trockenen Filterpapieren und einem Stapel saugfähiger Tücher bedeckt und beschwert. Über Nacht durchdringt der Puffer mittels Kapillarwirkung das Gel in Richtung Membran und ermöglicht so den Transfer der RNA.

Beim Vakuumblot wurde die in 2x SSC getränkte Membran in die Kammer (LKB BROMMA, 2016 Vacugene, Vacuum Blotting Unit) gelegt und mit der Maske bedeckt. Nach Verschließen der Kammer wurde das Gel blasenfrei in die Kammer auf die Membran gebracht. Zunächst wurde die Pumpe angestellt und erst dann wurde das Gel mit 20x SSC überschichtet. Der Vakuumtransfer erfolgte bei 40-50Val in 75 Minuten.

Die Membran wurde im UV-Stratalinker™ 2400 bei 120mJ fixiert.

2.6.3 Prehybridisierung, Hybridisierung und Entwicklung

50x Denhardt's:	1% Ficoll
	1% Polyvinylpyrrolidon
	1% BSA
20x SSPE:	3M NaCl
	0,23M NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
	0,04M EDTA
	pH 7,4, autoklavieren

20x SSC:	3M NaCl 0,3M Na ₃ Citrat x 2 H ₂ O pH 7,0
Pre-/Hybridisierungspuffer:	50% Formamid, deionisiert 5x SSPE 5x Denhardt's 0,1% SDS 200 µg/ml tRNA yeast in H ₂ O/DEP 30 Minuten bei 68°C inkubieren, in 50ml Aliquots einfrieren

Die Membran wurde mit dem Prehybridisierungspuffer über Nacht bei 42°C unter Bewegung inkubiert, um unspezifische Bindungen der Sonden an die Membran zu verhindern.

Für die Sonden wurde 25ng DNA (ANT1 - Exon2, ANT2 - Exon2 bzw. ANT3 - Exon 2 sowie 18S; alles RT-PCR-Produkte) in 47µl TE-Puffer 5 Minuten aufgekocht und danach für 5 Minuten auf Eis gestellt, um die DNA zu denaturieren. Diese Lösung wurde in ein Reaktionsröhrchen (rediprime II, Amersham Pharmacia Biotech), das ein Reaktionsgemisch aus 10µl ATP+GTP+TTP und 1µl DNA-Polymerase (Klenowfragment) enthält, pipettiert. Anschließend wurden 30µCi ³²PdCTP dazupipettiert und gemischt. Dieser Ansatz wurde bei 37°C inkubiert und nach 10-60 Minuten die Inkubation mit 450µl TE-Puffer gestoppt. Dann wurden die Sonden auf mit TE-Puffer äquilibrierte Säulen (Fa. Pharmacia Biotech, Nick Column) gegeben und mit 1ml TE-Puffer eluiert. Das Eluat wurde 5 Minuten bei 100°C inkubiert und anschließend für 5 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurde die Sonde in den Prehybridisierungspuffer gegeben und die Membran mit dieser Lösung bei 42°C über Nacht inkubiert.

Um eine ausreichende Markierung der Sonden zu gewährleisten, wurde die Aktivität der Probe nach Zugabe von 450µl TE-Puffer sowie des Eluats im Counter (Liquid Scintillation Counter, Wallac 1409, PerkinElmer™) gemessen. Die Probe (1µl) bzw. das Eluat (2µl) wurden zuvor mit 6ml High Flash-point universal LSC-Cocktail (Ultima Gold™, Packard) versetzt.

Um das ungebundene, radioaktiv-markierte CTP, zu entfernen, wurde zuerst 2x 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 1x SSC + 0,1% SDS und danach 2x 20 Minuten mit vorgewärmter 0,1x SSC + 0,1% SDS-Lösung bei 65°C gewaschen.

Die Membran wurde in Folie eingeschweißt und der Film (Kodak oder Fuji) in Entwicklungskassetten bei -80°C bzw. bei 4°C nach Markierung mit der 18S-Sonde exponiert. Nach Entwicklung des Films (Curix 60, Fa. Agfa) wurde dieser densitometrisch ausgewertet.

Bevor die Membran erneut hybridisiert werden konnte, mußte sie „gestrippt“ werden. Dazu wurde die Membran mit kochender 0,1%-SDS-Lösung übergossen und bis zum Erreichen der Raumtemperatur auf dem Schüttler stehen gelassen. Anschließend wurde mit der

Prähybridisierung fortgefahren. Dieselbe Membran wurde nacheinander mit allen drei ANT-Sonden sowie mit der 18S-Sonde hybridisiert.

3. HISTOLOGISCHE TECHNIKEN

3.1 Anfertigen von Gewebeschnitten

Damit die Gewebeschnitte besser an den Objektträgern (76 x 26 x 1mm, Marienfeld) haften, wurden die Objektträger silanisiert: Die Objektträger wurden nacheinander in verschiedenen Bädern eingestellt:

- 1 Minute in Aceton
- 10 Minuten in 4% 3-Triethoxysilylpropylamin/Aceton
- 1 Minute in Aceton
- 1 Minute in H₂O

Danach wurden die Objektträger über Nacht bei 50°C getrocknet.

Ein kleines Stück gefrorenes Gewebe wurde mittels Tissue-Tek (Fa. Sakura) auf einen Metallträger aufgeblockt. Der Träger wurde zum Gefrieren des Tissue-Teks in Stickstoff gestellt und anschließend in das Kryotom eingespannt. Die 5µm dicken Gewebescheiben wurden bei -22°C geschnitten und mit Objektträgern aufgenommen.

3.2 Chemikalien

Vectastain ^R ABC Kit: (Vector Laboratories)	Blocking Serum (Kaninchen) Biotinyliertes, affinitäts-gereinigtes Anti-Immunglobulin Reagenz A (Avidin Dehydrogenase) Reagenz B (biotinylierte Meerrettich-Peroxidase H)
PFA-Stocklösung:	10% PFA (Paraformaldehyd) 2mM NaOH unter Erwärmen lösen, pH 7,4, filtrieren
PFA-Fixierlösung:	4% PFA 120mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,2)
50mM Acetat-Puffer (pH 5):	0,14M CH ₃ COONa 0,06M Essigsäure
AEC-Stammlösung:	1 AEC-Tablette in 2,5ml Dimethylformamid lösen

AEC-Arbeitslösung:	0,2ml Stammlösung
	3,8ml 50mM Acetat-Puffer
	2 μ l H ₂ O ₂ (30%)
Hämalaun:	0,1% Hämatoxylin
	0,02% NaJO ₃
	5% Kalialaun
	5% Chloralhydrat
	0,1% Zitronensäure

Diese "ABC-Technik" verwendet einen ersten variablen Antikörper, gefolgt von einem zweiten biotinylierten Antikörper sowie einem vorgeformten „Avidin und Biotinylierten Meerrettich-Peroxidase makromolekularen Complex“. Eine Vielfalt von Chromogenen können zur Lokalisation der Peroxidase benutzt werden.

3.3 Immunhistologie an Zellen

HepG2-Zellen wurden auf Deckgläschen (\varnothing 12mm, Assistent) wachsen gelassen. Die Zellen wurden in PBS gewaschen und anschließend in 120mM KH₂PO₄-Puffer für 5 Minuten eingestellt. Die Fixierung erfolgte durch 20minütige Inkubation mit 4% PFA. Um die Zellen aufzuschließen, wurden sie 3x 10 Minuten mit 0,05% Saponin/PBS behandelt.

Die Färbung erfolgte in einer feuchten Kammer: Um die endogenen Peroxidasen der Zellen zu blockieren, wurden die Deckgläschen 10 Minuten mit 0,5% H₂O₂/PBS inkubiert. Danach wurden die Zellen 5 Minuten in PBS gewaschen und anschließend mit Blocking Serum abgesättigt. Nach 20 Minuten wurde das überschüssige Serum abgeschüttelt und der erste, spezifische Antikörper in der entsprechenden Verdünnung in PBS aufpipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Um den nichtgebundenen Antikörperüberschuß zu entfernen, wurden die Zellen 5 Minuten in PBS gewaschen. Nun wurden die Zellen 30 Minuten mit dem biotinylierten Anti-Rabbit-IgG-Antikörper inkubiert und danach 5 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 30 Minuten mit dem ABC-Reagenz inkubiert und 5 Minuten in PBS gewaschen.

Als Peroxydase-Substratlösung wurde AEC verwendet, welches durch die Peroxidase in einen roten Farbstoff überführt wird. Die Farbreaktion ist nach circa 5 Minuten abgeschlossen. Zur Entfernung der Substratlösung wurden die Zellen 5 Minuten in H₂O gewaschen.

Die Kernanfärbung erfolgte durch Inkubation der Zellen mit Hämalaun für 2 Minuten. Nach 10minütigem Spülen unter fließendem Leitungswasser wurden die auf den Deckgläschen befindlichen Zellen mit Glyceringelatine auf Objektträgern fixiert.

3.4 Immunhistologie am Gewebeschnitt

Die Paraffinschnitte mußten zunächst entparaffiniert werden: Dazu wurden die Schnitte 3x 5 Minuten in Xylol und dann in einer absteigenden Alkoholreihe (je 5 Minuten Isopropanol, Ethanol 96%, 90%, 80%, 70%, 50%, H₂O) eingestellt.

Die entparaffinierten Schnitte bzw. die Kryoschnitte wurden 5 Minuten in PBS gewaschen, 10 Minuten in 120mM KH₂PO₄-Puffer eingestellt, 20 Minuten mit 4% PFA fixiert und mit 0,1% Saponin/PBS in 3x 10 Minuten aufgeschlossen. Nach Blockierung der endogenen Peroxidasen durch Inkubation mit 1,2% H₂O₂/Methanol für 30 Minuten und 10 minütigem Waschen in PBS wurde der Gewebeschnitt 30 Minuten mit 5% Magermilch/PBS abgesättigt, um unspezifische Bindungen des ersten Antikörpers zu vermeiden. Die Inkubation mit dem Blocking Serum wurde auf 30 Minuten verlängert, die Waschschritte auf 3x 10 Minuten erhöht. Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte prinzipiell wie bei den HepG2-Zellen. Die Schnitte wurden mit Glyceringelatine fixiert und mit Deckgläschen (24 x 24mm, Marienfeld) abgedeckt.

IV. ERGEBNISSE

1. TESTUNG DER ANTISEREN

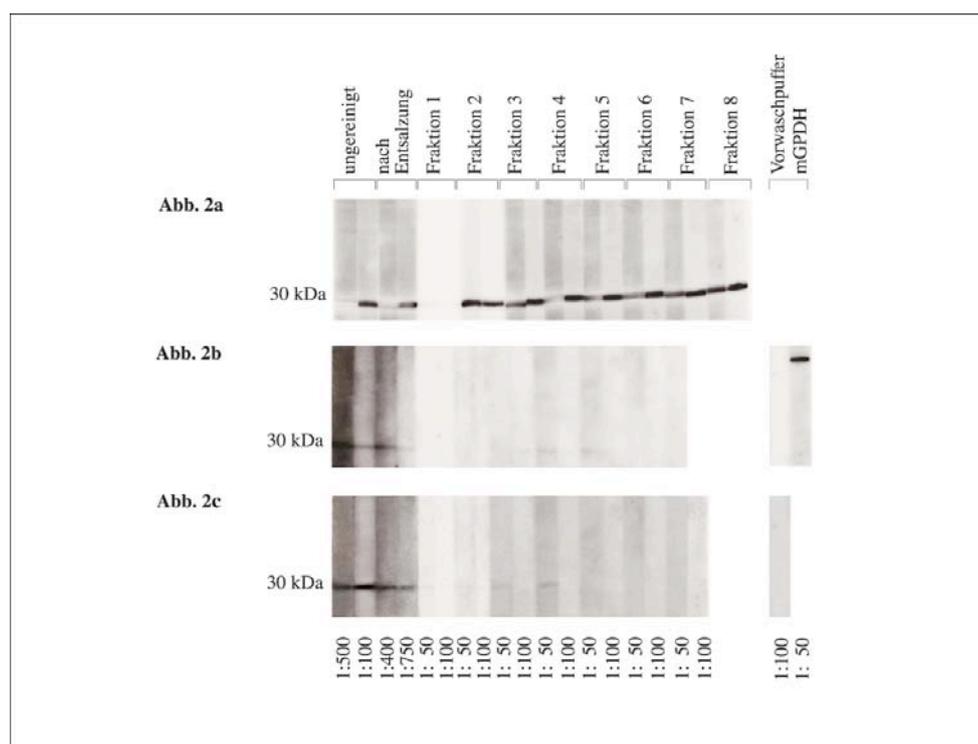
Für die Untersuchungen der ANT-Expression auf Proteinebene wurden isoformspezifische Antikörper gegen ANT1, 2 und 3 provoziert (s. III. 2.2).

Zunächst erfolgte die Testung der Seren aus den zwei Entnahmen sowie aus der Entblutung im Western Blot. Die besten Ergebnisse ließen sich für ANT1 und ANT3 mit den aus der Entblutung gewonnenen Seren, für ANT2 mit dem Serum der zweiten Entnahme (nach Immunisierung mit Peptid b) erzielen. Diese Seren wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet.

1.1 IgG-Reinigung der nativen Antiseren

Um den Hintergrund und die unspezifischen Banden im Western Blot mit den nativen Antiseren zu eliminieren, wurden die IgG-Fractionen der Antiseren mit Hilfe von Econo-Pac-Säulen (s. III. 2.3) aufgereinigt. Die einzeln aufgefangenen Fraktionen des Eluats wurden im Western Blot getestet.

Das Ergebnis dieses Western Blots ist in Abbildung 2 gezeigt. Die Testung des nativen ANT1-Antiserums sowie der Fraktionen aus der Aufreinigung zeigt in der Fraktion 2 bei deutlichen Banden kaum Hintergrund. Diese Fraktion wurde für die weiteren Western Blots verwendet. Bei Einsatz der ungereinigten ANT2-Proben stellen sich die Banden vor starkem Hintergrund gut dar. Die Aufreinigung des ANT2-Antiserums zeigt einen Verlust der 30kDa-Banden. Für die weiteren Western Blots wurde das native Serum verwendet. Im Western Blot mit dem nativen sowie dem entsalzten ANT3-Antiserum sind bei starker Anfärbung des Hintergrunds deutlich Banden zu detektieren. Im Western Blot mit dem aufgereinigtem ANT3-Antiserum stellen sich die ANT-Banden kaum dar. Auch für die ANT3-Western Blots kam das native Serum zur Anwendung.

**Abb. 2****IgG-Reinigung der nativen Antiseren**

Nach Entsalzung der nativen Antiseren erfolgte die fraktionierte Eluierung des IgG. In der Elektrophorese wurde das native ungereinigte, das entsalztes ungereinigte sowie die einzelnen Fraktionen der IgG-Aufreinigung aufgetragen. Die Banden bei 30kDa entsprechen dem mit ECL detektierten ANT-Protein. Die Antiseren wurden in den unten angegebenen Verdünnungen eingesetzt.

a) IgG-Reinigung des nativen ANT1-Antiserums

In den Western Blots mit dem nativen Antiserum sowie dem entsalzten Antiserum und den gereinigten Fraktionen 3-8 ist eine mehr oder weniger starke Anfärbung des Hintergrunds zu erkennen. Während der Western Blot mit der Fraktion 1 weder Hintergrund noch eine Bande zeigt, zeigt der Western Blot mit der 2. Fraktion deutliche Banden bei sauberem Hintergrund. Diese Fraktion wurde für die weiteren Versuche verwendet.

b) IgG-Reinigung des nativen ANT2-Antiserums

Während bei Verwendung des nativen Antiserums und des Antiserums nach Entsalzung der Hintergrund bei starken Signalen mehr oder weniger dunkel erscheint, zeigen die Western Blots mit den Fraktionen 1-7 nur sehr schwach dargestellte bzw. keine Banden. mGPDH dient als Kontrolle für das Funktionieren des Western Blots. Nach Inkubation mit dem Vorwaschpuffer, der keine Antikörper enthält, ist kein Signal zu detektieren. Für die weiteren Untersuchungen wurde das native Serum verwendet.

c) IgG-Reinigung des nativen ANT3-Antiserums

Die Detektion des ANT3-Antiserums zeigt nach Auftragung des nativen ungereinigten sowie des entsalzten ungereinigten Antiserums deutliche Banden bei starkem Hintergrund. Bei Verwendung der gereinigten Fraktionen sind hingegen kaum bzw. keine Banden zu erkennen. Der eingesetzte Vorwaschpuffer zeigt nach Inkubation mit dem Antiserum keine Reaktion. Für die weiteren Versuche wurde das native Antiserum verwendet.

1.2 Testung der Spezifität der Antiseren im Dot Blot

Die Spezifität dieser Antiseren (ANT1-Antiserum aus der Entblutung, 2. Fraktion der IgG-Reinigung; ANT2-Antiserum aus der 2. Entnahme, natives Serum; ANT3-Antiserum aus der Entblutung, natives Serum) wurde im Dot Blot getestet: Im Dot Blot (s. Abb. 3) wurden von den ANT1-, ANT2- und ANT3-Peptiden je 100ng, 10ng und 1ng auf die Nitrocellulosemembran aufgedotet. Nach Trocknung der Membran erfolgte die Inkubation mit 5% Magermilch/PBS, um unspezifische Bindungen an die Membran zu verhindern. Die Inkubation mit den Antiseren gegen ANT1, ANT2 und ANT3 wurde in verschiedenen Verdünnungen (s. Abb. 3) vorgenommen. Nach Inkubation mit der Alkalischen Phosphatase erfolgte die Detektion mit NBT/BCIP.

Bei Inkubation des ANT1-Peptids mit dem Antiserum gegen ANT1 war ein Signal zu sehen und die Stärke des Signals war proportional zur Peptidkonzentration sowie zur Verdünnung des Antiserums. Nach Inkubation des ANT1-Peptids mit den Antiseren gegen ANT2 bzw. ANT3 war kein Signal zu detektieren. Das ANT2-Peptid ließ sich nur mit dem Antiserum gegen ANT2, das ANT3-Peptid nur mit dem Antiserum gegen ANT3 detektieren. Es besteht also keine Kreuzreaktivität.

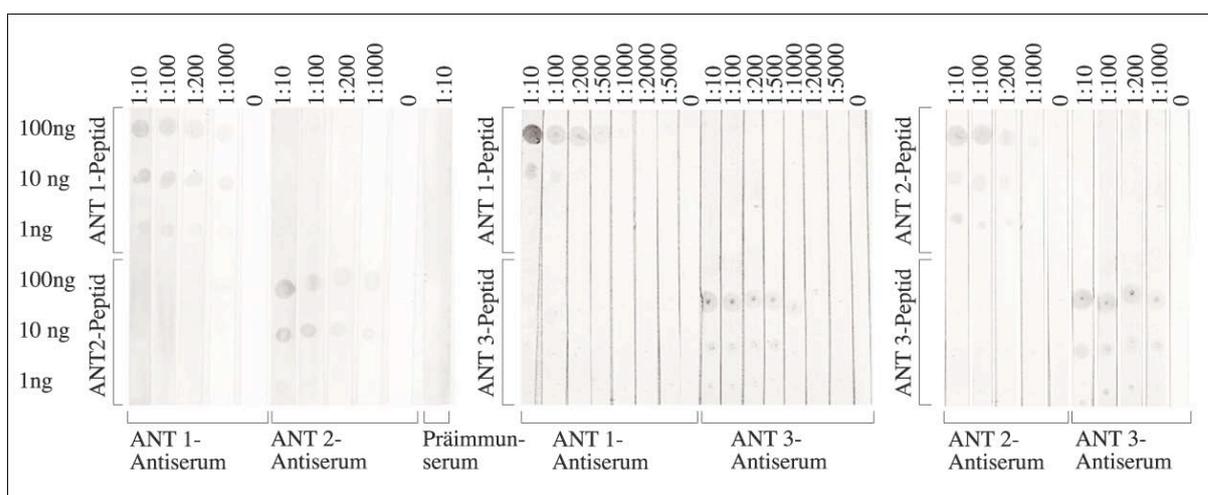


Abb. 3

Darstellung der Spezifität der Antiseren im Dot Blot

Prüfung der Kreuzreaktivität: von oben nach unten wurden abnehmende Peptidkonzentrationen aufgedotet. Von links nach rechts wurden die Membranstreifen mit abnehmenden Konzentrationen der Antiseren inkubiert. Bei Inkubation der Peptide mit demjenigen Antiserum, das gegen die zugehörige Isoform gerichtet ist, ist ein Signal zu detektieren. Dabei ist die Stärke des Signals proportional zur Peptidkonzentration sowie zur Verdünnung des Antiserums. Keine Detektion der Peptide nach Inkubation mit einem Antiserum, das gegen eine andere Isoform gerichtet ist. Das Präimmunserum dient als Negativkontrolle.

1.3 Darstellung der Spezifität der Antiseren mittels Immunhistologie

Die Spezifität der Antikörper konnte auch an Paraffinschnitten von humaner Leber und Skelettmuskulatur gezeigt werden:

Nach Entparaffinierung und Behandlung des Gewebes mit einem Detergenz, erfolgte die Inkubation mit dem ersten, spezifischen Antikörper (Antiserum gegen ANT1, ANT2 bzw. ANT3) jeweils in einer Verdünnung von 1:200 und 1:500. Danach wurden die Schnitte mit dem Biotinylierten Anti-Rabbit-IgG-Antikörper und anschließend mit dem ABC-Reagenz inkubiert. Für die Farbreaktion wurde AEC als Peroxidase-Substratlösung verwendet. Die Kerne wurden mit Hämalaun angefärbt (s. III. 3.4).

Bei Bindung des ersten, spezifischen Antikörpers fällt die Reaktion positiv aus, die Peroxidase überführt das AEC in einen roten Farbstoff. Die roten Signale zeigen also das Vorhandensein derjenigen ANT-Isoform, gegen die der erste Antikörper gerichtet war.

Während in der Leber kein ANT1 zu detektieren ist (s. Abb. 5a), was den Ergebnissen der Literatur entspricht, stellen sich ANT2 und 3 (s. Abb. 5b-d) vor allem um die Zentralvene konzentriert dar; es zeigt sich eine Zonierung mit einer Zunahme der ANT2- und 3-Konzentration von peripher nach zentral innerhalb eines Leberläppchens. Betrachtet man einen Leberazinus - als funktionelle Einheit der Leber -, so nimmt die ANT2- und 3-Konzentration von Zone 1 nach Zone 3 zu. Diese Zunahme ist negativ mit der Nährstoff- und O₂-Versorgung des Hepatozyten korreliert. In Abbildung 5c stellt sich die intrazelluläre Lokalisation des ANT2 besonders gut dar. Innerhalb der Hepatozyten findet sich ANT2, entsprechend der Verteilung der Mitochondrien, disseminiert im Zytoplasma.

ANT1 als Hauptisoform in Skelett- und Herzmuskulatur zeigt in Abbildung 5e eine zur Querstreifung des Muskels parallele Anordnung in Strängen; diese sind, entsprechend der Lage der Mitochondrien, in Höhe der I-Bande lokalisiert.

Abb. 5
Darstellung der Spezifität der Antiseren mittels Immunhistologie

Unter der Annahme einer gewebespezifischen ANT-Isoform-Verteilung wurden Paraffinschnitte von humaner Leber und Skelettmuskulatur mit den Antiseren gegen ANT1, 2 bzw. 3 inkubiert. Bei Bindung dieser ersten, spezifischen Antikörper wird AEC schließlich in einen roten Farbstoff überführt.



Abb. 5a
Immunhistochemischer Nachweis von ANT1 in humaner Leber

Auf der Abbildung ist die charakteristische Anordnung der Hepatozyten zu erkennen, welche radiär auf die Zentralvene zulaufen. Die Hepatozyten zeigen ein fein granuliertes Zytoplasma sowie einen Zellkern mit deutlichem Nukleolus. Die Farbreaktion ist negativ, übereinstimmend mit der Tatsache, daß Hepatozyten kein oder kaum ANT1 exprimieren.

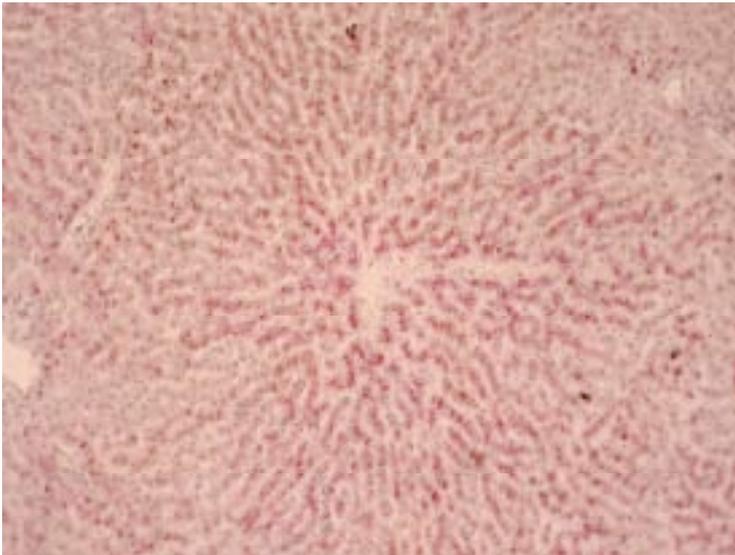


Abb. 5b
Immunohistochemischer Nachweis von ANT2 in humaner Leber

Es ist die morphologische Baueinheit der Leber, das polygonale Lebervenenläppchen, zentral dargestellt. Im Zentrum liegt die V. centralis, auf die die Hepatozyten in Balken geordnet, radiär zulaufen. Zwischen den Leberzellbalken befinden sich die Lebersinus. An den Ecken des Läppchens befinden sich die periportalen Felder mit einem Ast der V. portae, der A. hepatica und einem interlobulären Gallengang. Die kleinen, roten ANT2-Korrelate kommen verstärkt in den Hepatozyten um die Zentralvene zur Darstellung. Es zeigt sich eine Zonierung. Betrachtet man einen Leberazinus als funktionelle Einheit der Leber, so nimmt die ANT2-Konzentration von Zone 1 nach Zone 3 zu. Diese Zunahme ist negativ mit der Nährstoff- und O₂-Versorgung des Hepatozyten korreliert.

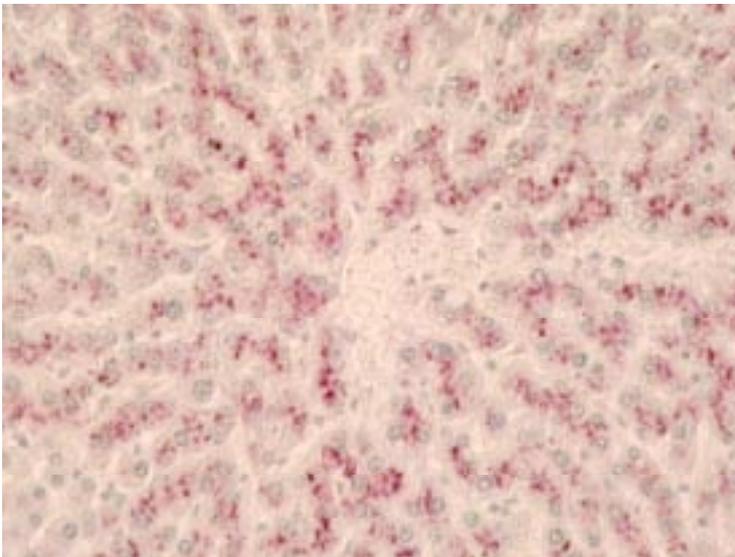


Abb. 5c
Immunohistochemischer Nachweis von ANT2 in humaner Leber, Ausschnittsvergrößerung

In Bildmitte kommt die Zentralvene zur Darstellung. Die Abbildung zeigt die intrazelluläre, disseminiert zytoplasmatische Verteilung des ANT2. Die Zellkerne mit deutlichem Nukleolus sind zart blau gefärbt.

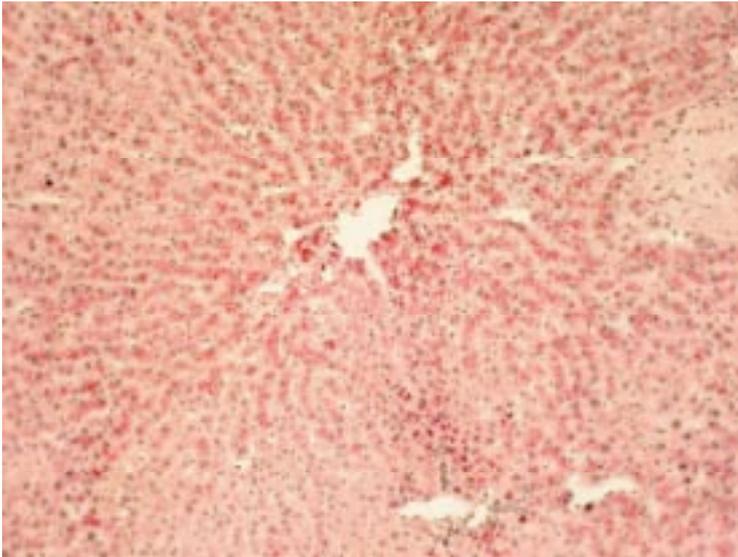


Abb. 5d
Immunohistochemischer Nachweis von ANT3 in humaner Leber

In Bildmitte ist die V. centralis getroffen, die radiär von Leberzellsträngen umgeben wird. Auch die Menge von ANT3 ist in den der Zentralvene nahe gelegenen Hepatozyten besonders hoch. Die Zonierung entspricht der der ANT2-Verteilung.



Abb. 5e
Immunohistochemischer Nachweis von ANT1 in humaner Skelettmuskulatur

Längsschnitt. Jede Muskelfaser enthält zahlreiche längsovale, randständige Kerne. Zwischen den Muskelfasern liegt das Endomysium, in dem Kapillaren und Nervenfasern verlaufen. Die kleinen, punktförmigen, roten ANT1-Korrelate liegen wie aufgereiht parallel zur Querstreifung des Muskels und entsprechen der Lokalisation der Mitochondrien in Höhe der I-Banden.

2. ANT1 IM HUMANEN HERZEN

2.1 ANT1-Protein-Quantifizierung

Um eine Aussage über die Menge der einzelnen ANT-Isoformen machen zu können, wurden im Western Blot abnehmende Proteinkonzentrationen aus den Mitochondrien-angereicherten Fraktionen der Herzlysate aufgetragen. Für die ANT1-Detektion wurde von jedem der 14 Herzen ein Gel mit $10\mu\text{g}$, $5\mu\text{g}$, $3\mu\text{g}$, $2\mu\text{g}$, $1\mu\text{g}$, $0,5\mu\text{g}$, $0,25\mu\text{g}$, und $0,125\mu\text{g}$ pro Bahn sowie einer

Negativkontrolle ohne Mitochondriensuspension beladen. Die Proteine wurden nach der elektrophoretischen Trennung auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Diese wurde mit dem ANT1-Antiserum in einer Verdünnung von 1:1000 inkubiert. Nach Inkubation mit der Alkalischen Phosphatase erfolgte die Detektion mit NBT/BCIP.

Bei der semiquantitativen Bestimmung des ANT1 (s. Abb. 6) kommen die Banden bei gleicher Proteinkonzentration bei DCM und ICM stärker zur Darstellung als bei den Kontrollen. Bei kleineren Proteinkonzentrationen ist im gesunden Herzen kein ANT1 mehr zu detektieren, während in DCM und ICM noch Banden zu erkennen sind. Die ANT1-Proteinkonzentration ist in DCM und ICM im Vergleich zu den gesunden Herzen leicht erhöht, wobei die Zunahme des ANT1 in ICM etwas stärker ausgeprägt ist als in DCM.

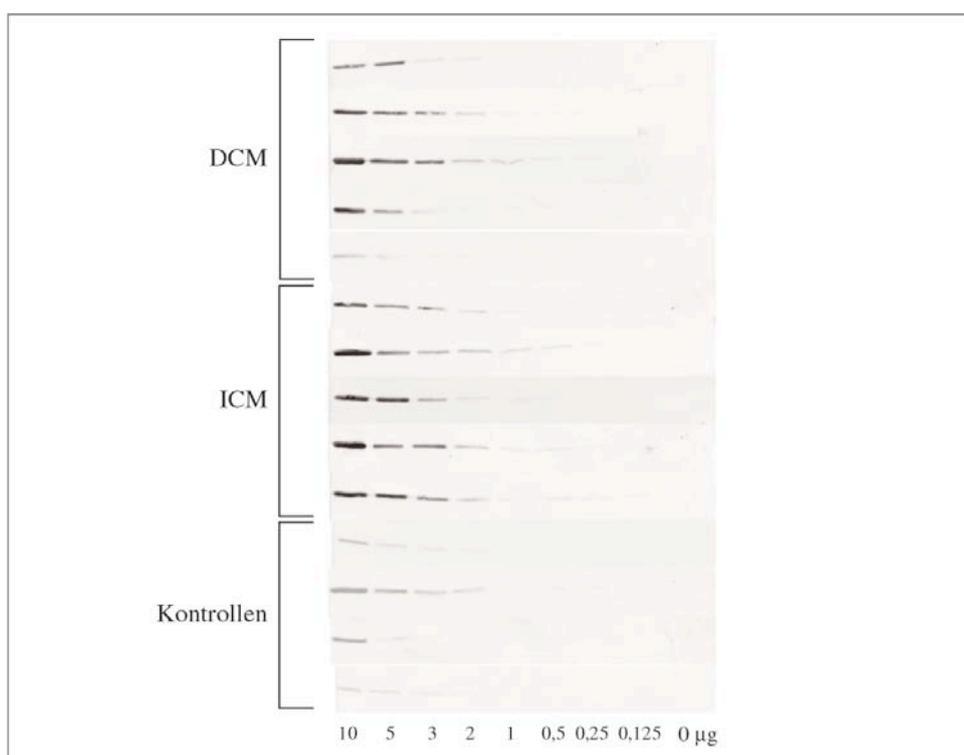


Abb. 6

Darstellung der ANT1-Proteinmengen im semiquantitativen Western Blot

Die repräsentativen Western Blots zeigen semiquantitativ den ANT1-Gehalt im linken Ventrikel von 5 DCM-, 5 ICM- und 4 gesunden Herzen. Jede Zeile repräsentiert ein anderes Herz und entstammt den Membranen in Höhe von 30kDa. Die Banden entsprechen den in abnehmender Konzentration aufgetragenen und mit NBT/BCIP detektierten Proben. Bei hohen Konzentrationen (in µg, s. Abb.) sind also entsprechend stärkere Anfärbungen zu beobachten. Je nach ANT1-Gehalt in den einzelnen Herzen sind diese Anfärbungen insgesamt stärker (DCM, ICM) oder schwächer (Kontrollen) ausgeprägt.

Um genauere Aussagen bezüglich der Quantität der Proteinkonzentration machen zu können, wurden für die ANT1-Detektion von jedem der 14 Herzen 2µg Protein aus der Mitochondrienangereicherten Fraktion auf ein Gel aufgetragen. Nach Auftrennung der Proteine in der Elektrophorese und ihrem Transfer auf die Membran erfolgte die Inkubation mit dem ANT1-Antiserum in einer Verdünnung von 1:1000. Nach Inkubation mit dem zweiten, Peroxidase-

konjugierten Anti-Rabbit-IgG-Antikörper wurde die Detektion mit ECL durchgeführt: Die auf dem Film durch Lichtemission entstandenen Signale wurden densitometrisch quantifiziert.

Die Quantifizierung (s. Abb. 7c) zeigt die Mittelwerte der ANTI1-Proteinmenge von 5 DCM-, 5 ICM- und 4 gesunden Herzen. Die dargestellten Konzentrationsunterschiede zwischen den DCM-, ICM- und gesunden Herzen, die den Unterschieden des semiquantitativen Western Blots gleichen, werden durch die Standardabweichungen relativiert. Es besteht kein signifikanter Unterschied bezüglich der ANTI1-Konzentration in DCM- und ICM- gegenüber der Konzentration in den Kontrollherzen.

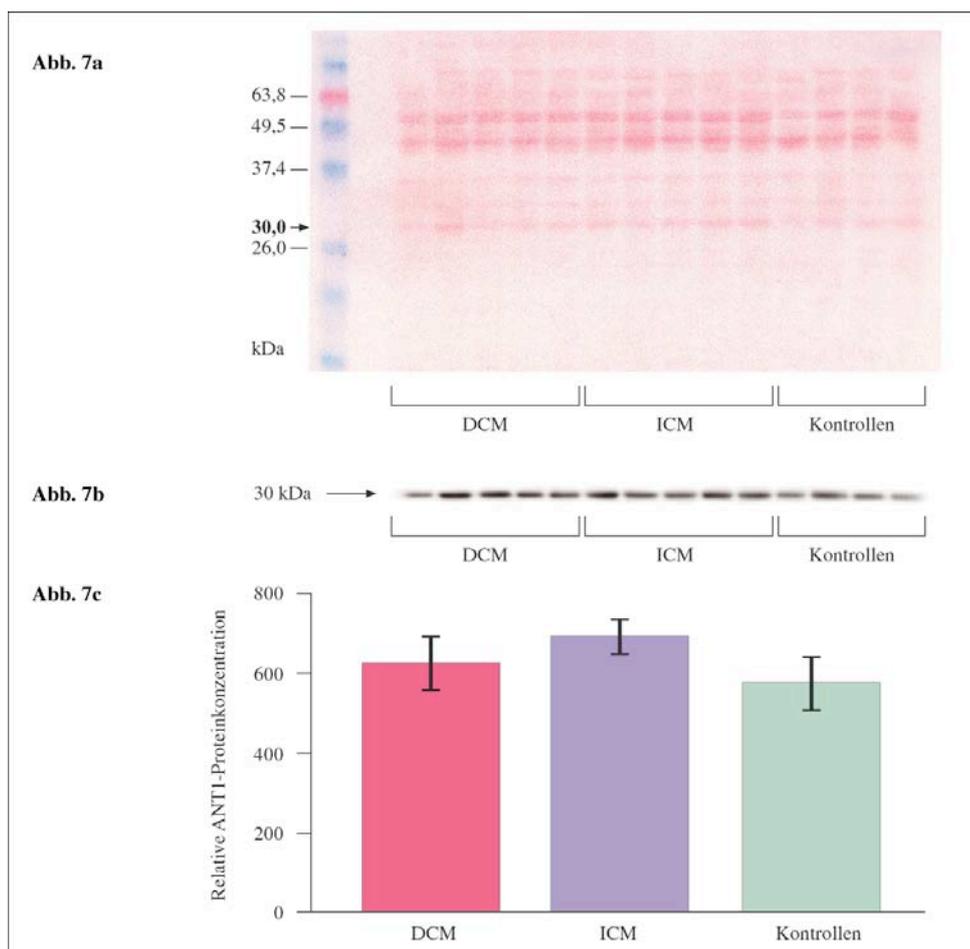


Abb. 7

Quantitative Darstellung der ANTI1-Proteinmengen im Western Blot

a) Ponceau S-Färbung

Ponceau S-Anfärbung der nach dem Blotten auf der Membran befindlichen Proteine. Die Spalten entsprechen den einzelnen Herzen. Aufgetragen wurden von jedem Herzen je 2 µg aus der Mitochondrien-angereicherten Fraktion. Die Ponceau S-gefärbte Membran zeigt gleichmäßig aufgetragene Proteinkonzentrationen und dient wie die Coomassie blue-Färbung des Gels der Sicherheit, daß das Ergebnis nicht durch ungleich große Proteinmengen zustande kommt.

b) Repräsentativer Western Blot

Der repräsentative Western Blot zeigt die relativen ANTI1-Proteinmengen im „ECL-Emission-geschwärzten“ Film. Jedes Signal repräsentiert ein anders Herz. Die Stärke des Signals korreliert mit der Proteinmenge. Die Banden entsprechen der 30kDa-Linie der Ponceau S-Abbildung.

c) Relative ANTI1-Proteinkonzentration

Densitometrisch gemessene Intensität der Proteinbanden aus Abb. 7b. Dargestellt sind die Mittelwerte der ANTI1-Konzentrationen für 5 DCM-Hezen, 5 ICM-Hezen und 4 Kontrollherzen. Die Einzelwerte wurden aus der densitometrischen Quantifizierung der einzelnen Banden des ECL-Films gewonnen. Die Fehlerbalken zeigen die Homogenität innerhalb der Gruppe: Mittelwerte ± SEM (n = 5 bzw. n = 4).

2.2 ANT1-mRNA-Quantifizierung

Um eine Aussage über eine Veränderung auf mRNA-Ebene machen zu können, erfolgte eine Quantifizierung der mRNA-Isoformen mittels Northern Blot.

Hierbei wurden von jedem Herzen sowie von HepG2-Zellen jeweils 15µg mRNA im Gel aufgetrennt. Nach Transferierung der mRNA auf eine Membran wurde diese mit der ANT1-Sonde inkubiert. Die radioaktiv-markierte Sonde schwärzte den Film über 14 Tage bei -80°C. Die Signale wurden densitometrisch ausgewertet. Dieselbe Membran wurde nacheinander zur Detektion aller 3 Isoformen sowie von 18S verwendet.

Für das Diagramm (s. Abb. 8b) wurde die Ratio ANT1/18S herangezogen, um den Fehler durch ungleich große mRNA-Mengen zu eliminieren. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der Rationes von 5 DCM- bzw. ICM- Herzen sowie von 3 Kontrollherzen.

Die ANT1-mRNA-Konzentration ist – unter Bezug der Standardabweichung - bei DCM und ICM im Vergleich zu den Kontrollen unverändert. Damit entsprechen die mRNA-Daten den auf Proteinebene beobachteten Ergebnissen.

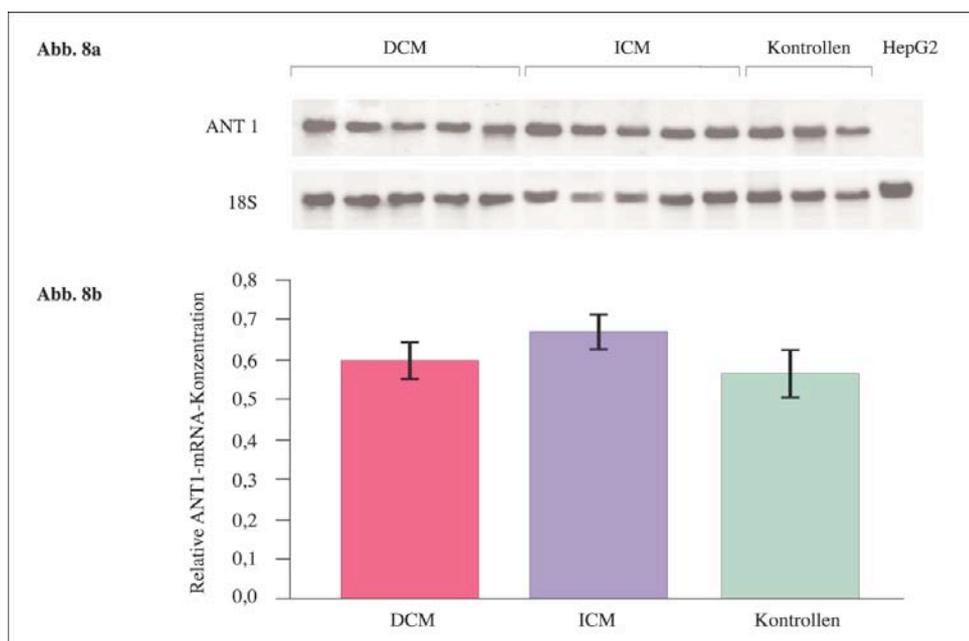


Abb. 8
Quantitative Darstellung der ANT1-mRNA-Mengen im Northern Blot

a) Repräsentativer Northern Blot

Repräsentativer Northern Blot nach Markierung mit der ANT1- bzw. der 18S-Sonde. HepG2 dient als Kontrolle: In Hepatozyten wird kein ANT1 exprimiert; dementsprechend ist auf der Bahn, die mit aus HepG2-Zellen isolierter mRNA beladen wurde, kein Signal nach Markierung mit der ANT1-Sonde zu beobachten. Nach Markierung mit der 18S-Sonde ist hingegen ein starkes Signal zu detektieren.

b) Relative ANT1-mRNA-Konzentration

Relative densitometrische, auf 18S-normalisierte Intensitäten der ANT1-mRNA-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte der ANT1-mRNA-Konzentrationen für 5 DCM-, 5 ICM- und 3 Kontrollherzen; die Einzelwerte entsprechen der Ratio ANT1/18S. Die Fehlerbalken zeigen die Homogenität innerhalb der Gruppe: Mittelwerte ± SEM (n = 5).

2.3 Immunhistochemischer Nachweis von ANT1

Von den im Western und Northern Blot verwendeten Herzen wurden mittels Kryotom $5\mu\text{m}$ dicke Gewebeschnitte hergestellt (s. III. 3.1).

Die Kryoschnitte wurden mit PFA fixiert und das Gewebe mit Saponin/PBS aufgeschlossen. Das ANT1-Antiserum wurde in einer Verdünnung von 1:200 und 1:300 eingesetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Biotinylierten Anti-Rabbit-IgG-Antikörper und dann mit dem vorgeformten Peroxidase-Komplex. Zur Lokalisation der Peroxidase wurde AEC verwendet.

Zusätzlich wurden Paraffinschnitte von humanem gesunden sowie insuffizienten linken Ventrikelmyokard gefärbt.

Abbildung 9 zeigt in allen Schnitten eine gleichmäßige ANT1-Protein-Verteilung im Myokard. Eine genaue Aussage bezüglich der Quantität ist leider nicht möglich, doch scheint kein auffälliger Unterschied zwischen DCM, ICM und den Kontrollen zu bestehen.

Besonders in Abbildung 9d ist die mitochondriale Verteilung des ANT1 innerhalb der Myozyten zu erkennen: Die Mitochondrien, die in ihrer Innenmembran das ANT beherbergen, laufen in Strängen zwischen den Myofilamenten und parallel zur Muskelfaserlängsrichtung.

Abb. 9

Immunhistochemischer Nachweis von ANT1 an Paraffin- und Kryoschnitten humaner Herzen

Das Myokard weist wie der Skelettmuskel eine Querstreifung auf, die jedoch auf den Abbildungen nicht zur Darstellung kommt. Im Gegensatz zur Skelettmuskulatur verzweigen sich die „Herzmuskelzellfasern“ und anastomosieren miteinander. Dadurch entsteht ein netzartiger Verband, dessen spaltförmige Maschen mit gefäßreichem Bindegewebe ausgefüllt werden. Der meist einzige Zellkern nimmt das Zentrum der Herzmuskelzellen ein.

Bei Vorhandensein von ANT1 führt die Bindung der ANT1-Antikörper schließlich zur Überführung des AEC in einen roten Farbstoff.



Abb. 9a

Immunhistochemischer Nachweis von ANT1 am Paraffinschnitt eines gesunden Herzens

Längsschnitt durch den linken Ventrikel. Die Myozyten scheinen diffus rötlich angefärbt, eine genaue Aussage bezüglich der intrazellulären Verteilung ist bei dieser Vergrößerung jedoch nicht möglich.

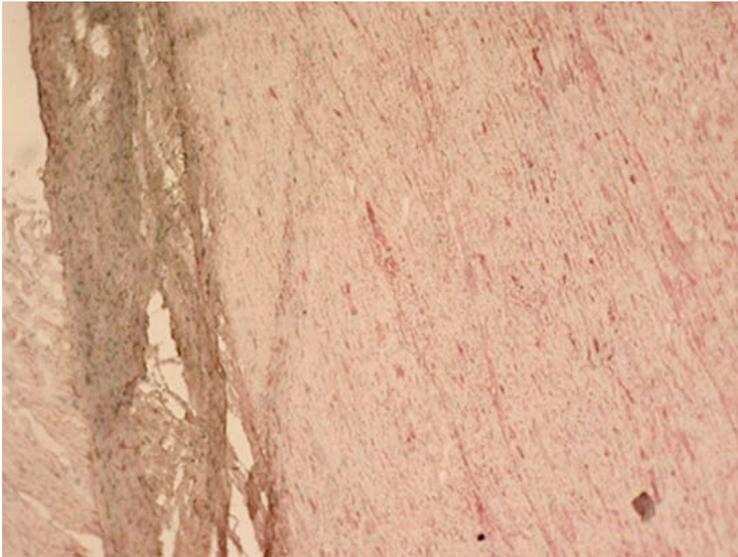


Abb. 9b
Immunohistochemischer Nachweis von ANTI in DCM

Längsschnitt durch den linken Ventrikel. Die rot gefärbten ANTI-Korrelate stellen sich in zu den Muskelfasern parallel geordneten, intrazellulären Bahnen dar. Links im Bild ist Bindegewebe getroffen, das sich farblich vom Myokard abhebt.

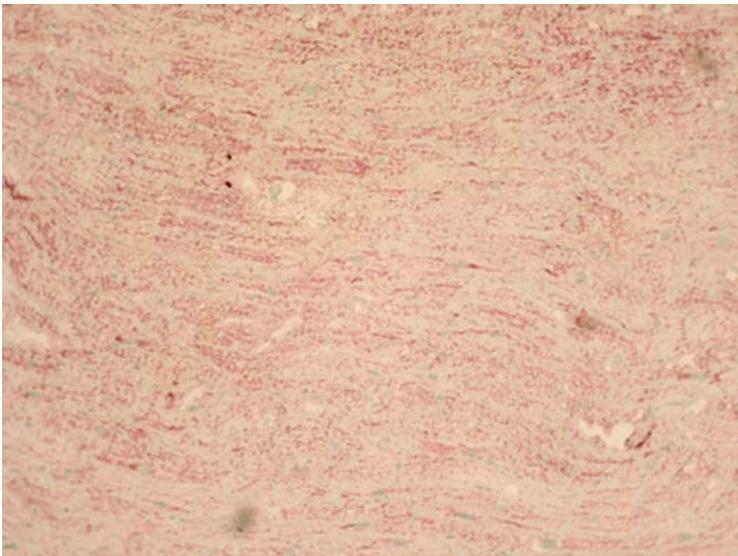


Abb. 9c
Immunohistochemischer Nachweis von ANTI in ICM

Längsschnitt durch den linken Ventrikel. Das Myokard wird gleichmäßig von perlschnurartig aufgereihten roten ANTI-Korrelaten durchzogen, die intrazellulär zwischen den Myofilamenten und parallel zu den Muskelfasern verlaufen.

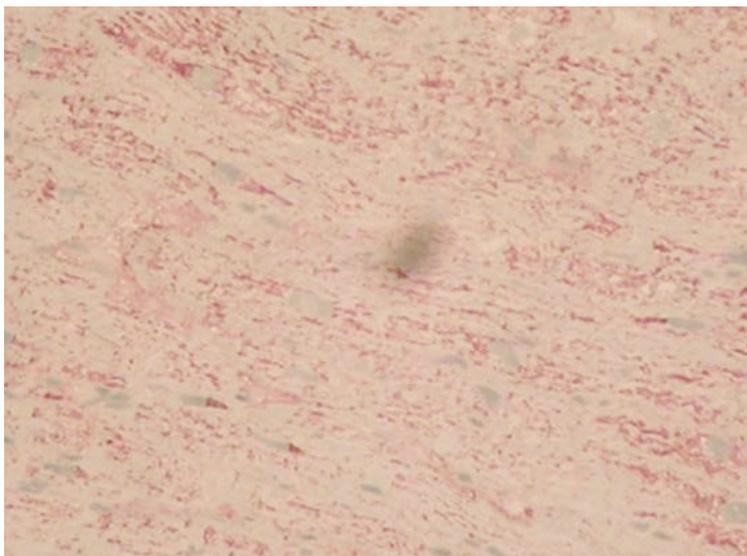


Abb. 9d
Immunohistochemischer Nachweis von ANTI1 in ICM, Ausschnittsvergrößerung

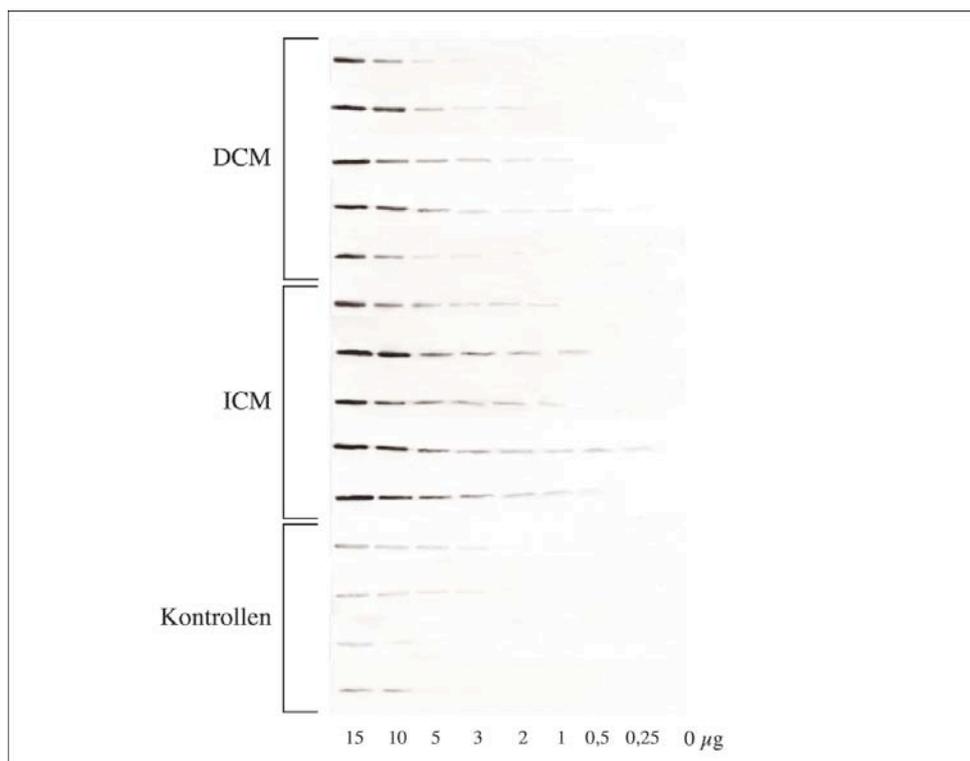
Die mitochondriale Verteilung des ANTI1 ist gut zu erkennen. Die kleinen, roten ANTI1-Korrelate sind zu Säulen geordnet, die zwischen den Myofilamenten liegen und parallel zur Muskelfaser verlaufen. Die blassen Kerne nehmen das Zentrum der Herzmuskelzellen ein.

3. ANT2 IM HUMANEN HERZEN

3.1 ANT2-Protein-Quantifizierung

Für die ANT2-Detektion wurden im semiquantitativen Western Blot jeweils $15\mu\text{g}$, $10\mu\text{g}$, $5\mu\text{g}$, $3\mu\text{g}$, $2\mu\text{g}$, $1\mu\text{g}$, $0,5\mu\text{g}$, und $0,25\mu\text{g}$ aus den Mitochondrien-angereicherten Fraktionen der Herzlysate sowie die Negativkontrolle in die Taschen pipettiert. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mit dem Antiserum gegen ANT2 in einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Die Detektion erfolgte mit NBT/BCIP.

Die semiquantitative Darstellung der ANT2-Proteinmengen (s. Abb. 10) zeigt bei gleicher Proteinkonzentration bei DCM und ICM stärker angefärbte Banden als bei den Kontrollen. Bei Einsatz von $2\mu\text{g}$ und weniger ist in den Kontrollherzen kein Protein mehr zu detektieren, während in DCM und ICM bei Einsatz von $1\mu\text{g}$ und zum Teil geringeren Mengen noch Banden detektiert werden können. Die ANT2-Konzentration ist in insuffizienten Herzen gegenüber der Konzentration in gesunden Herzen erhöht; dabei ist die Zunahme in ICM stärker ausgeprägt als in DCM.

**Abb. 10****Darstellung der ANT2-Proteinmengen im semiquantitativen Western Blot**

Die repräsentativen Western Blots zeigen semiquantitativ den ANT2-Gehalt im linken Ventrikel von 5 DCM-, 5 ICM- und 4 gesunden Herzen. Jede Zeile repräsentiert ein anderes Herz und entstammt den Membranen in Höhe von 30kDa. Die Banden entsprechen den in abnehmender Konzentration aufgetragenen und mit NBT/BCIP detektierten Proben. Bei hohen Konzentrationen (in μg , s. Abb.) sind also entsprechend stärkere Anfärbungen zu beobachten. Je nach ANT2-Gehalt in den einzelnen Herzen sind diese Anfärbungen insgesamt stärker (DCM, ICM) oder schwächer (Kontrollen) ausgeprägt.

Um die im semiquantitativen Western Blot beobachteten Konzentrationsunterschiede zwischen DCM, ICM und den Kontrollen näher zu charakterisieren, wurden von jedem Herzen je $10\mu\text{g}$ Protein aus der Mitochondrien-angereicherten Fraktion auf ein Gel aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine und ihrem Transfer auf eine Membran wurde das Antiserum gegen ANT2 in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Die Detektion wurde mit ECL durchgeführt und die nach Exposition eines Films entstandenen Signale densitometrisch quantifiziert.

Abbildung 11c zeigt die Quantifizierung. Dargestellt sind die Mittelwerte der densitometrischen Messung von 5 DCM-Herzen, 5 ICM-Herzen sowie von 4 Kontrollherzen. Es ist eine Zunahme der Proteinmenge in DCM und ICM im Vergleich mit den Kontrollherzen zu beobachten. Die Zunahme der ANT2-Proteinmenge im insuffizienten Herzen ist - die Standardabweichung berücksichtigend - signifikant. Auch zwischen DCM und ICM besteht ein signifikanter Unterschied bezüglich der Proteinmenge, nämlich eine Erhöhung in ICM im Vergleich zu DCM.

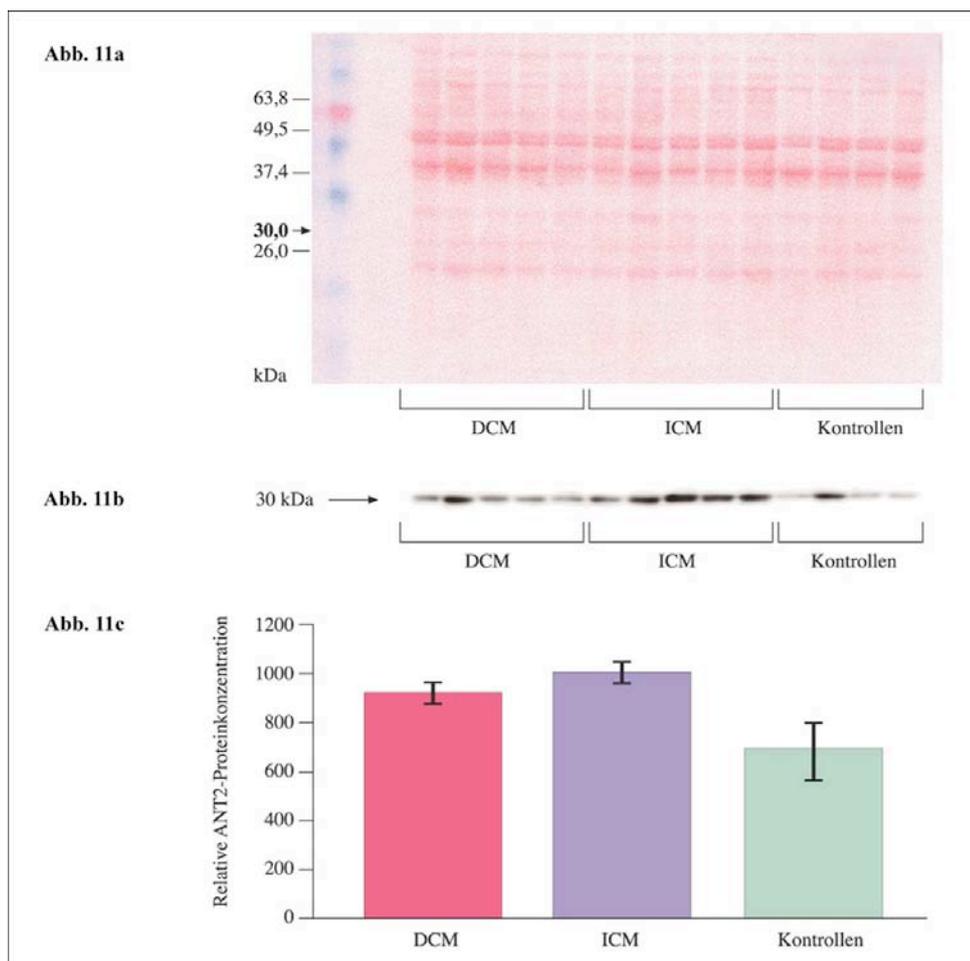


Abb. 11
Quantitative Darstellung der ANT2-Proteinmengen im Western Blot

a) Ponceau S-Färbung

Ponceau S-Anfärbung der nach dem Blotten auf der Membran befindlichen Proteine. Die Spalten entsprechen den einzelnen Herzen. Aufgetragen wurden von jedem Herzen je $2\mu\text{g}$ aus der Mitochondrien-angereicherten Fraktion. Die Ponceau S-gefärbte Membran zeigt gleichmäßig aufgetragene Proteinkonzentrationen und dient wie die Coomassie blue-Färbung des Gels der Sicherheit, daß das Ergebnis nicht durch ungleich große Proteinmengen zustande kommt.

b) Repräsentativer Western Blot

Der repräsentative Western Blot zeigt die relativen ANT2-Proteinmengen im „ECL-Emission-geschwärzten“ Film. Jedes Signal repräsentiert ein anderes Herz. Die Stärke des Signals korreliert mit der Proteinmenge. Die Banden entsprechen der 30kDa-Linie der Ponceau S-Abbildung.

c) Relative ANT2-Proteinkonzentration

Densitometrisch gemessene Intensität der Proteinbanden aus Abb. 11b. Dargestellt sind die Mittelwerte der ANT2-Konzentrationen für 5 DCM-Heuten, 5 ICM-Heuten und 4 Kontrollherzen. Die Einzelwerte wurden aus der densitometrischen Quantifizierung der einzelnen Banden des ECL-Films gewonnen. Die Fehlerbalken zeigen die Homogenität innerhalb der Gruppe: Mittelwerte \pm SEM (n = 5 bzw. n = 4).

3.2 ANT2-mRNA-Quantifizierung

Für die mRNA-Quantifizierung wurden von jedem Herzen sowie von HepG2-Zellen jeweils $15\mu\text{g}$ mRNA im Gel aufgetrennt. Nach Transferierung der mRNA auf eine Membran wurde diese mit der ANT2-Sonde inkubiert. Der Film war über 28 Tage bei -80°C exponiert. Die dabei entstandenen Signale wurden densitometrisch ausgewertet.

Für das Diagramm (s. Abb. 12b) wurde die Ratio ANT2/18S herangezogen, um den Fehler durch ungleich große mRNA-Mengen zu eliminieren. Dargestellt sind die Mittelwerte der Rationes von 5 DCM- bzw. ICM-Herzen sowie von 4 Kontrollherzen.

Die Quantifizierung zeigt eine Zunahme der ANT2-mRNA in DCM und ICM gegenüber den Kontrollen, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen DCM und ICM besteht.

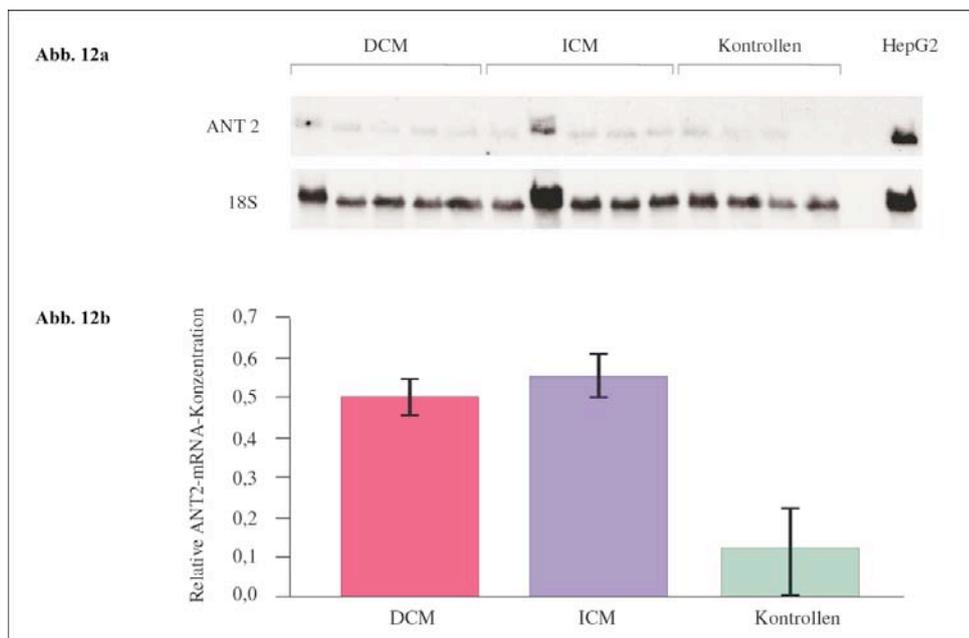


Abb. 12
Quantitative Darstellung der ANT2-mRNA-Mengen im Northern Blot

a) Repräsentativer Northern Blot

Repräsentativer Northern Blot nach Markierung mit der ANT2- bzw. der 18S-Sonde. HepG2 dient als Kontrolle: Da in Hepatozyten ANT2 exprimiert wird, ist sowohl nach Markierung mit der ANT2-Sonde als auch mit der 18S-Sonde ein Signal bei der mit aus HepG2-Zellen isolierten mRNA beladenen Bahn zu detektieren.

b) Relative ANT2-mRNA-Konzentration

Relative densitometrische, auf 18S-normalisierte Intensitäten der ANT2-mRNA-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte der ANT2-mRNA-Konzentrationen für 5 DCM-, 5 ICM- und 4 Kontrollherzen; die Einzelwerte entsprechen der Ratio ANT2/18S. Die Fehlerbalken zeigen die Homogenität innerhalb der Gruppe: Mittelwerte \pm SEM (n = 5 bzw. n = 4).

3.3 Immunhistochemischer Nachweis von ANT2

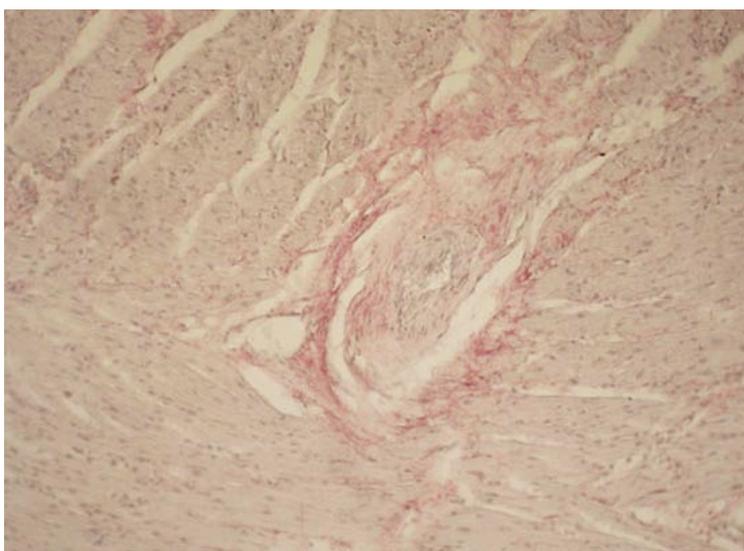
Für die Darstellung von ANT2 am Gewebeschnitt wurden Paraffinschnitte von insuffizienten und gesunden Herzen mit dem ANT2-Antiserum inkubiert.

Überraschenderweise ist ANT2 im Gegensatz zu ANT1 kaum innerhalb der Myozyten lokalisiert, sondern hauptsächlich mesenchymal. Diese Lokalisation wirft die Frage auf, ob die Zunahme der ANT2-Proteinkonzentration im Western Blot durch eine verstärkte Expression in den Fibroblasten zustande kommt, also nicht durch eine veränderte Expression in den Myozyten. Diese Möglichkeit wird dadurch gestützt, daß die eingesetzten Mitochondrien-angereicherten Fraktionen aus dem gesamten Gewebe extrahiert wurden, also keine Separation

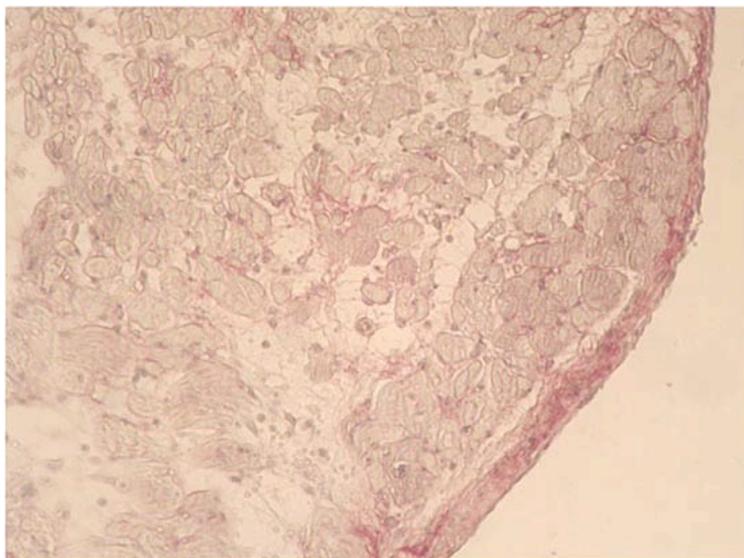
der Kardiomyozyten von den anderen Zellen des Herzgewebes stattfand. Da ANT2 physiologisch in Fibroblasten hoch exprimiert wird, könnte eine Zunahme der Fibroblasten im Rahmen der Kompensationsmechanismen bei Herzinsuffizienz die im Western Blot beobachtete Zunahme der ANT2-Proteinkonzentration erklären. Unklar ist allerdings, ob ausschließlich die Menge der Fibroblasten bei normalem ANT-Gehalt des einzelnen Fibroblasten verändert wird oder die Fibroblasten zusätzlich eine verstärkte ANT2-Expression zeigen.

Abb. 13**Immunhistochemischer Nachweis von ANT2 an Paraffinschnitten humaner Herzen**

Bei Vorhandensein von ANT2 führt die Bindung der ANT2-Antikörper schließlich zur Überführung des AEC in einen roten Farbstoff.

**Abb. 13a****Immunhistochemischer Nachweis von ANT2 im gesunden Herzen**

Längsschnitt durch den linken Ventrikel. In den Kardiomyozyten ist kaum eine Farbreaktion zu beobachten. Im Gegensatz dazu ist eine Rotfärbung zwischen den Herzmuskelzellen zu erkennen. In Bildmitte stellt sich das Bindegewebe, entsprechend der hohen ANT2-Expression in Fibroblasten, stark rot gefärbt dar.

**Abb. 13b****Immunhistochemischer Nachweis von ANT2 im insuffizienten Herzen**

Querschnitt durch den linken Ventrikel. Während die Myozyten so gut wie keine Anfärbung zeigen, ist das Interstitium rot angefärbt; die Kardiomyozyten scheinen von einem roten Kranz umgeben zu sein. Z.T. sind die zentralständigen Kerne getroffen.

4. ANT3 IM HUMANEN HERZEN

4.1 ANT3-Protein-Quantifizierung

Im semiquantitativen Western Blot wurden von jeder Mitochondrien-angereicherten Fraktion der Herzlysate jeweils $15\mu\text{g}$, $10\mu\text{g}$, $5\mu\text{g}$, $3\mu\text{g}$, $2\mu\text{g}$, $1\mu\text{g}$, $0,5\mu\text{g}$, und $0,25\mu\text{g}$ sowie die Negativkontrolle in die Taschen pipettiert. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine Membran überführt und diese mit dem Antiserum gegen ANT3 in einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Für die Detektion wurde NBT/BCIP verwendet.

Abbildung 14 zeigt, daß die ANT3-Proteinkonzentrationen in DCM geringer sind als in ICM und den Kontrollen und daß die Konzentrationen in ICM denen der gesunden Herzen gleichen.

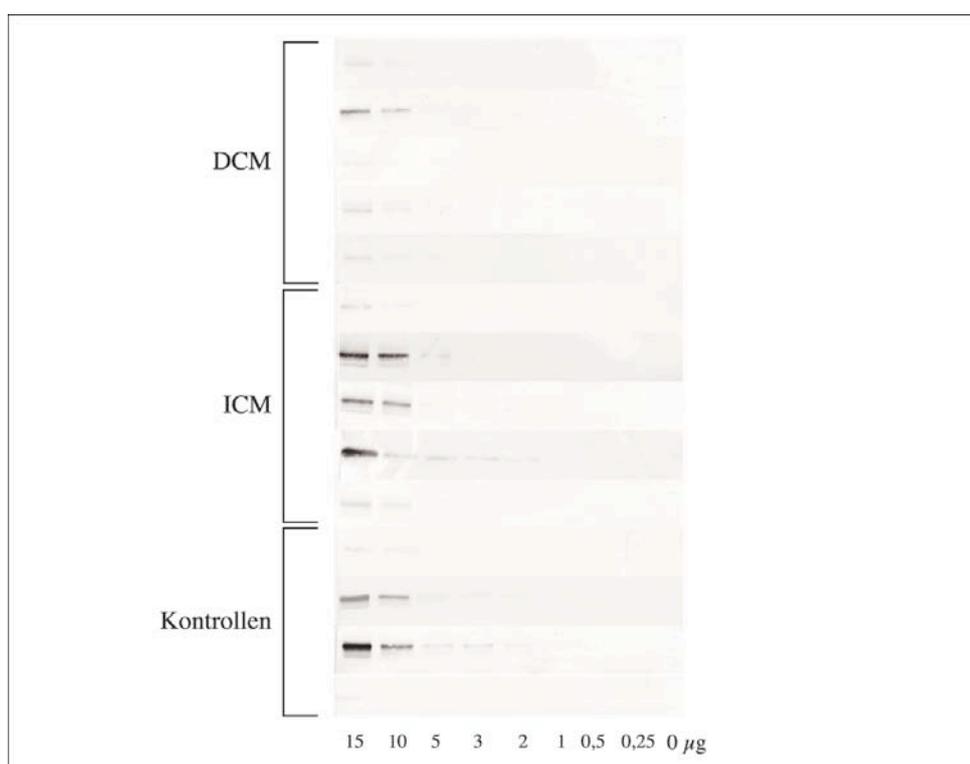


Abb. 14

Darstellung der ANT3-Proteinmengen im semiquantitativen Western Blot

Die repräsentativen Western Blots zeigen semiquantitativ den ANT3-Gehalt im linken Ventrikel von 5 DCM-, 5 ICM- und 4 gesunden Herzen. Jede Zeile repräsentiert ein anderes Herz und entstammt den Membranen in Höhe von 30kDa. Die Banden entsprechen den in abnehmender Konzentration aufgetragenen und mit NBT/BCIP detektierten Proben. Bei hohen Konzentrationen (in μg , s. Abb.) sind also entsprechend stärkere Anfärbungen zu beobachten. Je nach ANT3-Gehalt in den einzelnen Herzen sind diese Anfärbungen insgesamt stärker (ICM, Kontrollen) oder schwächer (DCM) ausgeprägt.

Im quantitativen Western Blot wurden von jedem Herzen je $10\mu\text{g}$ Protein aus der Mitochondrien-angereicherten Fraktion der Lysate auf ein Gel aufgetragen. Nach Elektrophorese und Elektroblot erfolgte die Inkubation mit dem ANT3-Antiserum in einer

Verdünnung von 1:200. Nach Inkubation mit dem zweiten, Peroxidase-konjugierten Anti-Rabbit-IgG-Antikörper wurde die Detektion mit ECL durchgeführt und die entstandenen Signale densitometrisch quantifiziert.

Die Quantifizierung (s. Abb. 15c) zeigt die Mittelwerte der ANT3-Proteinmengen von 5 DCM-, 5 ICM- und 4 gesunden Herzen. Die ANT3-Konzentrationen in DCM und ICM entsprechen den Konzentrationen in den gesunden Herzen.

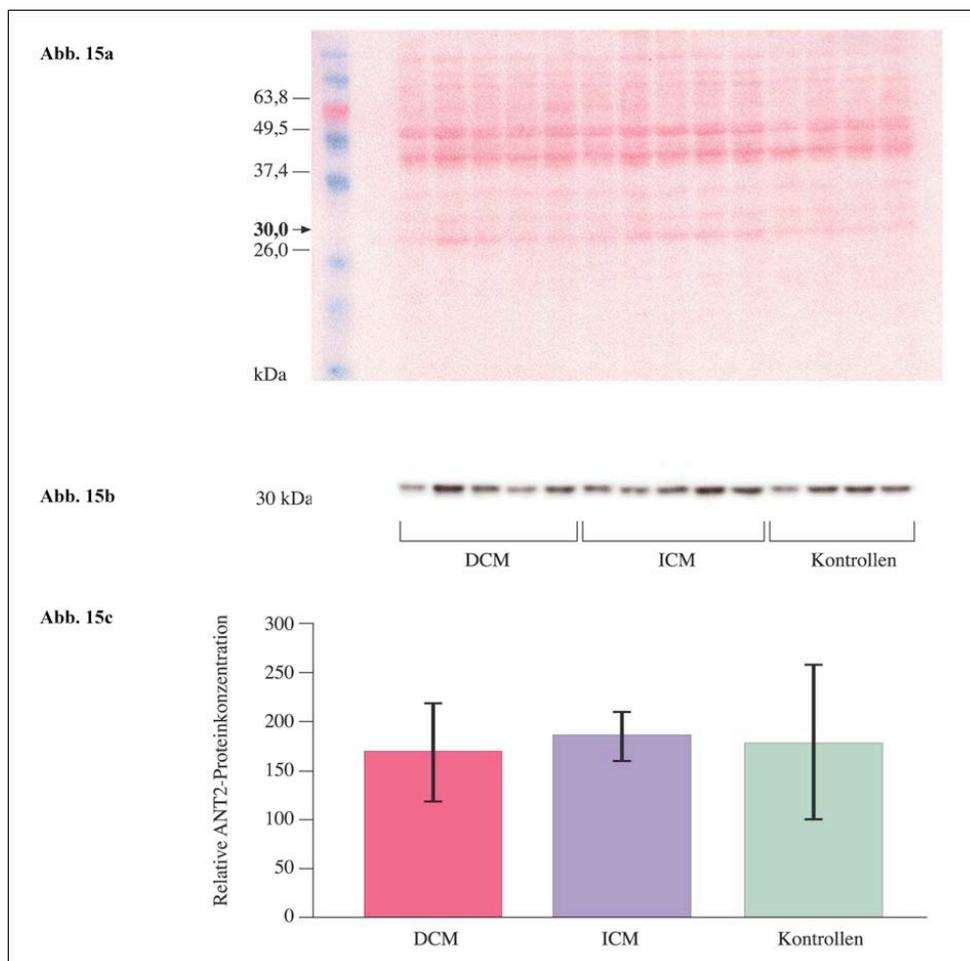


Abb. 15
Quantitative Darstellung der ANT3-Proteinmengen im Western Blot

a) Ponceau S-Färbung

Ponceau S-Anfärbung der nach dem Blotten auf der Membran befindlichen Proteine. Die Spalten entsprechen den einzelnen Herzen. Aufgetragen wurden von jedem Herzen je $10\mu\text{g}$ aus der Mitochondrien-angereicherten Fraktion. Die Ponceau S-gefärbte Membran zeigt gleichmäßig aufgetragene Proteinkonzentrationen und dient wie die Coomassie blue-Färbung des Gels der Sicherheit, daß das Ergebnis nicht durch ungleich große Proteinmengen zustande kommt.

b) Repräsentativer Western Blot

Der repräsentative Western Blot zeigt die relativen ANT3-Proteinmengen im „ECL-Emission-geschwärzten“ Film. Jedes Signal repräsentiert ein anders Herz. Die Stärke des Signals korreliert mit der Proteinmenge. Die Banden entsprechen der 30kDa-Linie der Ponceau S-Abbildung.

c) Relative ANT3-Proteinkonzentration

Densitometrisch gemessene Intensität der Proteinbanden aus Abb. 15b. Dargestellt sind die Mittelwerte der ANT3-Konzentrationen für 5 DCM-Hezen, 5 ICM-Hezen und 4 Kontrollherzen. Die Einzelwerte wurden aus der densitometrischen Quantifizierung der einzelnen Banden des ECL-Films gewonnen. Die Fehlerbalken zeigen die Homogenität innerhalb der Gruppe: Mittelwerte \pm SEM (n = 5 bzw. n = 4).

4.2 ANT3-mRNA-Quantifizierung

Abbildung 16 zeigt den Northern Blot nach Markierung mit der ANT3-Sonde. Die Quantifizierung zeigt, daß die Konzentrationen in DCM und ICM gegenüber den Kontrollen unverändert sind.

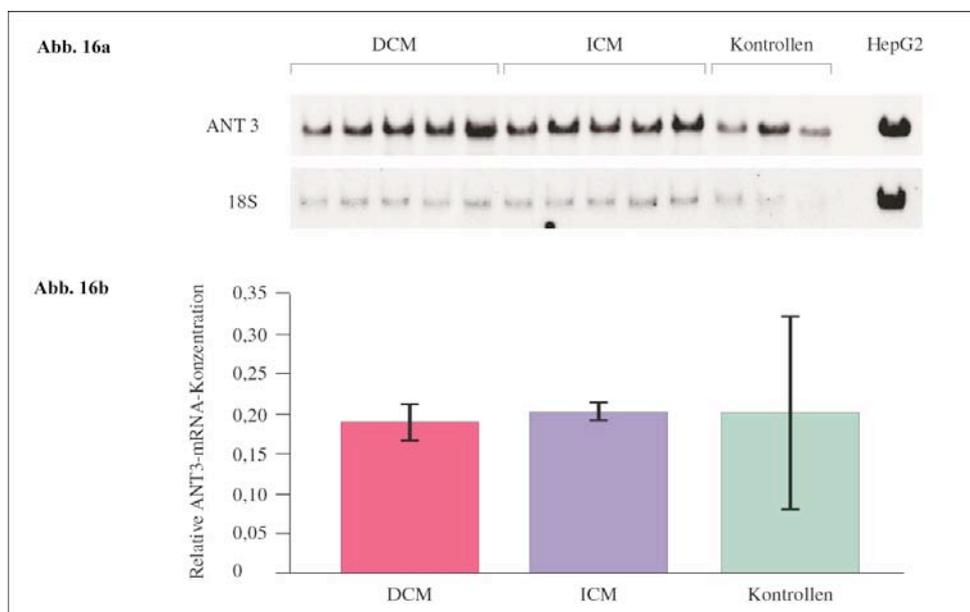


Abb. 16

Quantitative Darstellung der ANT3-mRNA-Mengen im Northern Blot

a) Repräsentativer Northern Blot

Repräsentativer Northern Blot nach Markierung mit der ANT3- bzw. der 18S-Sonde. Die aus Hepatozyten (HepG2) extrahierte mRNA dient als Kontrolle: Da in Hepatozyten ANT3 exprimiert wird, ist sowohl nach Markierung mit der ANT3-Sonde als auch mit der 18S-Sonde ein Signal bei der mit aus HepG2 isolierter mRNA beladenen Bahn zu detektieren.

b) Relative ANT3-mRNA-Konzentration

Relative densitometrische, auf 18S-normalisierte Intensitäten der ANT3-mRNA-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte der ANT3-mRNA-Konzentrationen für 5 DCM-, 5 ICM- und 3 Kontrollherzen; die Einzelwerte entsprechen der Ratio ANT3/18S. Die Fehlerbalken zeigen die Homogenität innerhalb der Gruppe: Mittelwerte \pm SEM (n = 5 bzw. n = 3).

4.3 Immunhistochemischer Nachweis von ANT3

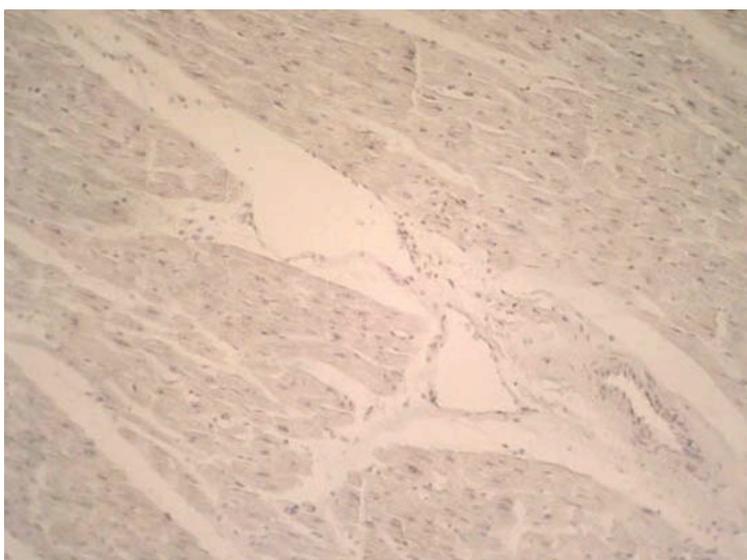
Nachdem die Kryoschnitte - hergestellt aus den Herzproben, die auch für die Western und Northern Blots verwendet wurden - fixiert und das Gewebe aufgeschlossen wurde, erfolgte die Inkubation mit dem ANT3-Antiserum in einer Verdünnung von 1:100 bzw. von 1:200. Danach wurde die Inkubation mit dem Biotinylierten Anti-Rabbit-IgG-Antikörper und anschließend mit dem vorgeformten Peroxidase-Komplex vorgenommen. Als Substrat für die Peroxidase diente AEC, welches in einen roten Farbstoff überführt wird. Die Kerne wurden mit Hämalaun angefärbt und die Schnitte mit Glycerin gelatine fixiert.

Zusätzlich wurden Paraffinschnitte humaner gesunder sowie insuffizienter Herzen angefärbt.

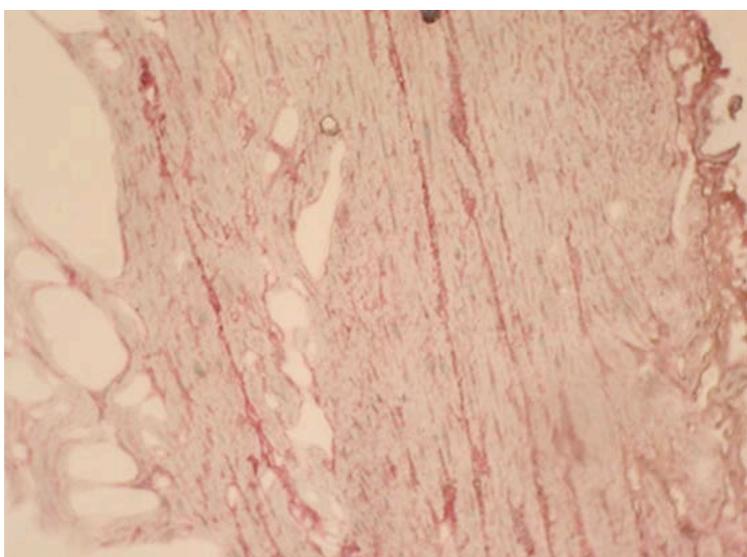
Quantitativ scheint eine ähnliche Verteilung in gesunden und insuffizienten Herzen vorzuliegen. ANT3 ist, wie ANT2 auch, vor allem zwischen den Muskelfasern im Bindegewebe der Herzen lokalisiert. Somit ist das hier dargestellte ANT3 vornehmlich ein Expressionsprodukt der Fibroblasten.

Abb. 17**Immunhistochemischer Nachweis von ANT3 an Paraffin- und Kryoschnitten humaner Herzen**

Bei Vorhandensein von ANT3 führt die Bindung der ANT3-Antikörper schließlich zur Überführung des AEC in einen roten Farbstoff.

**Abb. 17a****Immunhistochemischer Nachweis von ANT3 am Paraffinschnitt eines gesunden Herzens**

Längsschnitt durch den linken Ventrikel. Weder intrazellulär in den Kardiomyozyten noch interstitiell im Bindegewebe ist eine eindeutige positive Farbreaktion zu beobachten. Auffallend ist, daß der Raum zwischen den Myozyten leer erscheint, das Bindegewebe wie ausgewaschen wirkt.

**Abb. 17b****Immunhistochemischer Nachweis von ANT3 im gesunden Herzen**

Längsschnitt durch den linken Ventrikel. Die kleinen, roten ANT3-Korrelate sind vornehmlich im Mesenchym zwischen den Muskelfasern zu erkennen. Entsprechend des Gewebeaufbaus findet sich das Bindegewebe in den spaltförmigen Maschen, so daß die Anfärbung in Bahnen imponiert. Z.T. sind an den Kernpolen, also innerhalb der Kardiomyozyten positive Farbreaktionen zu beobachten.

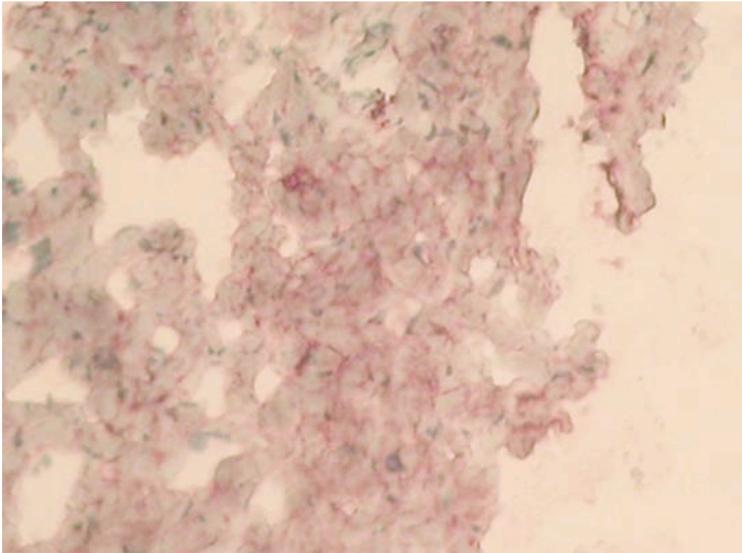


Abb. 17c
Immunhistochemischer Nachweis von ANT3 in DCM

Querschnitt durch den linken Ventrikel. Das rot angefärbte Interstitium umkleidet schlauchförmig die ungefärbten Myozyten. Z.T. ist der zentralständige Kern angeschnitten.

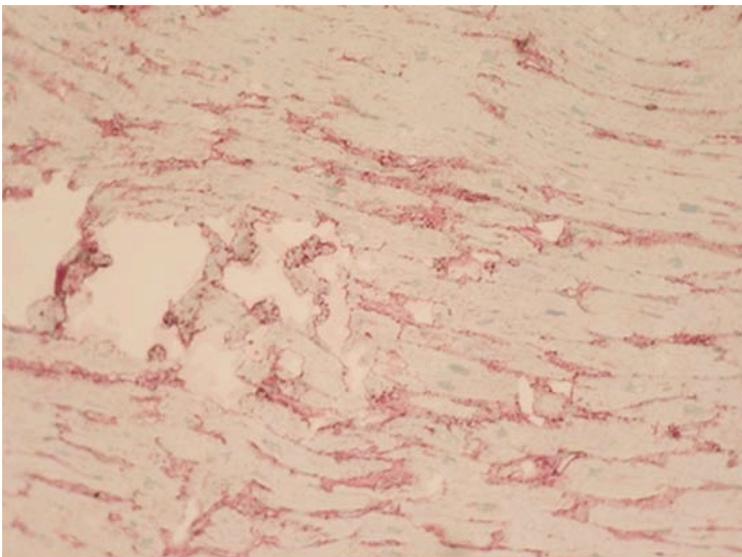


Abb. 17d
Immunhistochemischer Nachweis von ANT3 in ICM

Längsschnitt durch den Linken Ventrikel. Die Gewebestruktur des Myokards mit den sich verzweigenden und anastomosierenden Kardiomyozyten ist gut zu erkennen. In den daraus resultierenden spaltförmigen Lücken liegt das Bindegewebe, das durch das Vorhandensein von ANT3 granulär rot gefärbt erscheint.

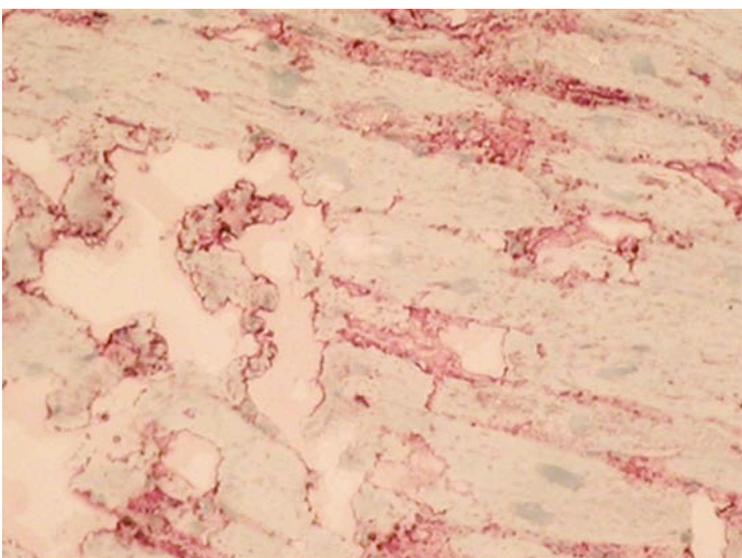


Abb. 17e
Immunhistochemischer Nachweis von ANT3 in ICM, Ausschnittsvergrößerung
Deutlich erkennbar ist die interstitielle Lokalisation des ANT3.

5. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Die in den Abbildungen dargestellten Mittelwerte für ANT1, 2 und 3 auf Protein- und mRNA-Ebene sind unabhängig voneinander und geben nicht das wahre Verhältnis der Isoformen zueinander wieder. Beurteilbar ist nur das Verhältnis der Protein- bzw. mRNA-Konzentration zwischen DCM, ICM und Kontrollen bezüglich einer Isoform.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen auf Protein- und mRNA-Ebene gleichsinnige Veränderungen: Die ANT2-Protein- und die ANT2-mRNA-Konzentration ist in DCM und ICM gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht, wobei die ANT2-Proteinkonzentration in ICM eine signifikante Zunahme gegenüber der ANT2-Proteinkonzentration in DCM zeigt. Die ANT1- und 3-Konzentrationen sind auf beiden Ebenen im Vergleich zu den Kontrollen unverändert.

Der immunhistochemische Nachweis der drei Isoformen zeigt, daß ANT2 und 3 – im Gegensatz zu ANT1 – kaum in den Kardiomyozyten, sondern hauptsächlich interstitiell im Bindegewebe des Herzens lokalisiert sind.

V. DISKUSSION

Bei Herzinsuffizienz ist das Herz nicht in der Lage, den Körper seinen Bedürfnissen entsprechend mit Blut zu versorgen. Das insuffiziente Herz zeigt makroskopische und mikroskopische sowie metabolische Veränderungen, die sich negativ auf die ventrikuläre Funktion auswirken. Gleichzeitig kommt es zu Alterationen der oxidativen Phosphorylierung und einer Reduktion der energiereichen Phosphate.

Die Adenin-Nukleotid-Translokase (ANT) ist der einzige Carrier, der den Antiport von ATP gegen ADP über die innere Mitochondrienmembran katalysiert und daher essentiell für die Bereitstellung energiereicher Phosphate im Zytosol ist. Damit spielt ANT eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel der Zelle.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Expression der ANT-Isoformen im insuffizienten Herzen im Vergleich zum suffizienten auf mRNA- und Proteinebene näher zu charakterisieren. Die Regulation der Expression kann auf jeder Ebene auf dem Weg vom Gen zum funktionsfähigen Protein stattfinden. Veränderungen der Transkriptionsraten, der mRNA-Halbwertszeiten, der Translationsraten sowie der Protein-Halbwertszeiten können Ursache unterschiedlicher Proteinkonzentrationen sein. Darüberhinaus kann die Aktivität des Antiporters, also die Rate des Nukleotidaustausches, bei Herzinsuffizienz verändert sein.

Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal, daß in insuffizienten Herzen die ANT2-Konzentration auf mRNA- und Proteinebene im Vergleich zum suffizienten Herzen erhöht ist. Eine Veränderung der ANT1- und 3-Konzentrationen ist weder auf mRNA- noch auf Proteinebene zu beobachten. Diese isoform-spezifische Expression ist sowohl bei Dilatativer als auch bei Ischämischer Kardiomyopathie nachzuweisen, wobei die ANT2-Proteinkonzentration in ICM gegenüber DCM signifikant erhöht ist. Die immunhistologischen Befunde zeigen überraschenderweise, daß ANT2 und 3 vor allem interstitiell im Bindegewebe des Herzens zu detektieren sind, während ANT1 hauptsächlich innerhalb der Myozyten lokalisiert ist.

Die Tatsache, daß die einzelnen ANT-Isoformen spezifisch bei Herzinsuffizienz exprimiert werden, könnte zum einem durch die unterschiedlichen Promotorsequenzen der drei ANT-Gene erklärt werden. Diese unterschiedlichen Promotoren legen nahe, daß die drei ANT-Gene verschiedenen regulatorischen Kontrollen unterstehen. Zum anderen könnten funktionelle Unterschiede der einzelnen Isoformen sowie isoform-spezifische Charakteristika für das hier gefundene Expressionsmuster verantwortlich sein. Als weiterer Erklärungsansatz für das insuffizienz-spezifische ANT-Isoformmuster könnte die unterschiedliche ANT-Isoform-Verteilung in den verschiedenen Zellpopulationen des Herzgewebes dienen.

Im folgendem sollen diese Ergebnisse im Einzelnen diskutiert werden.

1. ANT1-EXPRESSION IM HUMANEN HERZEN

1.1 ANT1-Quantifizierung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die ANT1-Konzentration auf mRNA- und Proteinebene bei DCM und ICM im Vergleich zu den Kontrollen nicht signifikant verändert ist (s. Abb. 7c, Abb. 8b).

Über die ANT1-Expression im insuffizienten Herzen finden sich in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse. Dörner et al. (1997) sowie Dörner und Schultheiss (2000) fanden in explantierten Herzen von DCM-Patienten sowie in Herzbiopsien von Patienten in frühen DCM-Stadien eine Zunahme der ANT1-mRNA. Diese Zunahme war in beiden Ventrikeln und im Septum zu beobachten. Die ANT1-mRNA-Konzentration bei ischämischer und valvulärer Kardiomyopathie entsprach der der Kontrollen.

Ning et al. (2000) untersuchten im Schwein die ANT1-mRNA- und Proteinkonzentration bei Infarkt-induzierter Herzinsuffizienz im linken Ventrikel. Während bei erfolgreicher linksventrikulärer Kompensation die ANT1-Expression unverändert erhalten war, zeigten die dekompenzierten Herzen eine Reduktion von ANT1 auf mRNA- und Proteinebene.

Während Dörner und Schultheiss davon ausgehen, daß die Änderung der ANT-Isoform-Expression beim Menschen ein stadienunabhängiges Charakteristikum der DCM ist, zeigten Ning et al. für das Schwein, daß die ANT1-Expression mit dem Grad der myokardialen Dysfunktion korreliert und daß die erfolgreiche myokardiale Adaptation von der Expression bestimmter Proteine, wie des ANT, abhängig ist.

Ein Erklärungsansatz von Dörner und Schultheiss stellt die Infektion mit Coxsackie B3-Virus dar, die dann zur DCM-spezifischen ANT-Isoform-Expression führt. In diesem Fall würde ein primär bestehendes ANT-Isoform-Muster sekundär zur myokardialen Dysfunktion führen. Geht man davon aus, daß die Dilatation der hier untersuchten Herzen eine andere Ätiologie aufweist, könnte die veränderte ANT-Isoform-Expression als sekundäre, kompensatorische Antwort auf einen zum Beispiel bestehenden Hypertonus oder eine KHK gewertet werden. Dies könnte den Unterschied zwischen den hier vorliegenden Ergebnissen und denen von Dörner und Schultheiss erklären. Auch Ning et al. untersuchten eine sekundäre ANT-Isoform-Expression infolge primärer Schädigung des Myokards. Eine mögliche Erklärung, warum die hier vorliegenden Befunde keine Abnahme der ANT1-Konzentration zeigen, könnte sein, daß sich die ICM-Hezen noch im Stadium der Kompensation befanden; aber warum sollten sie dann explantiert worden sein? Oder führt nur ein definitiver, großer Infarkt zur ANT1-Erniedrigung, eine chronische Ischämie aber nicht?

Da möglicherweise die Ätiologie der Herzinsuffizienz eine Rolle in der ANT-Isoform-Expression spielt, stellt sich die Frage, warum kein Unterschied im Isoform-Expressionsmuster zwischen DCM und ICM beobachtet werden konnte. Gegen einen Unterschied

zwischen DCM und ICM sprechen zum Beispiel die Ergebnisse von O'Brien und Gwathmey (1995). Sie zeigten einen gleichsinnig und gleichermaßen veränderten Energiestatus und Störungen der Calcium-Homöostase in beiden Formen der Kardiomyopathien im Vergleich zu den Kontrollen. Auch Kalsi et al. (1999) beschrieben, daß trotz unterschiedlicher Mechanismen der Herzinsuffizienz und Unterschiede in der Kontraktilität zwischen DCM und der hypertrophischen Form (HCM), die metabolischen Veränderungen sehr ähnlich sind. Die relativ monomorphen Veränderungen legen nahe, daß auch die ANT-Isoform-Expression monomorph erfolgen könnte. Für die differenzierte Betrachtung des ANT-Isoformmusters bei Herzinsuffizienz sollte künftig die Ätiologie sowie der Schweregrad der Insuffizienz berücksichtigt werden.

1.2 ANT1-Knock-out-Mäuse

ANT1 stellt die Hauptisoform in ausdifferenzierter Skelett- und Herzmuskulatur dar, während proliferierende Myoblasten vor allem ANT2 exprimieren (Stepien et al., 1992).

In ANT1-Knock-out-Mäusen konnte die Bedeutung des ANT1 in Skelett- und Herzmuskulatur gezeigt werden. In Abwesenheit von ANT wird das im Mitochondrium synthetisierte ATP nicht ins Zytoplasma transportiert. Die Zelle nimmt dieses ATP-Defizit wahr und sendet ein bisher nicht identifiziertes Signal zum Kern, um die Transkription mitochondrialer Gene zu steigern. Die meisten der in ANT1-Knock-out-Mäusen verstärkt exprimierten Gene kodieren für Produkte, die direkt in die ATP-Synthese involviert sind. Die Zunahme der Mitochondrien in Zahl und Volumen scheint also eine kompensatorische Antwort auf das Energiedefizit im Skelettmuskel zu sein und suggeriert, daß dort eine koordinierte Verstärkung der Expression dieser Gene stattfindet. Ein ANT1-Protein-Defizit limitiert die Protonen-Translokation durch die F₁-F₀-ATPase, was eine Verminderung der ADP-Phosphorylierung nach sich zieht. Die Elektronen akkumulieren und stehen für die Produktion reaktiver O₂-Spezies zur Verfügung (Murdock et al., 1999).

ANT1-Knock-out-Mäuse entwickeln eine mitochondriale Myopathie und Kardiomyopathie. Die Tiere zeigen Charakteristika humaner OXPHOS-Krankheiten, einschließlich einer dramatischen Proliferation muskuloskelettaler Mitochondrien. Es kommt zu einer Störung der oxidativen Phosphorylierung, einer Degeneration der kontraktilen Elemente im Skelettmuskel, einer progressiven Hypertrophie des Herzens mit linksventrikulärer Wandausdünnung, einer Intoleranz gegenüber körperlicher Belastung sowie zu einer Lactatacidose (Murdock et al., 1999).

In der Annahme, daß ein ATP-Defizit die Ursacher einer mitochondrialen Myopathie und Kardiomyopathie sein kann, müßte die ANT1-Inaktivierung und der daraus resultierende ATP-Mangel zur klinischen Manifestation führen. Um den Effekt der ANT1-Abwesenheit auf die oxidative Phosphorylierung zu klären, wurden Mitochondrien aus ANT1-Knock-out-Mäusen

isoliert. ANT1-defiziente Skelettmuskelmitochondrien zeigen einen Defekt der ADP-stimulierten Respiration. Dieser Defekt spiegelt die fehlende Nukleotidtranslokation über die innere Mitochondrienmembran wieder, was beweist, daß ANT1 die prädominante, wenn nicht einzige Isoform im Skelettmuskel ist. Im Gegensatz dazu zeigen ANT1-defiziente Herzmitochondrien nur einen partiellen Defekt. Auch die Zunahme der Mitochondriengröße ist hier nicht zu beobachten. Dieser Unterschied ist am ehesten auf eine ANT2-Expression im Kardiomyozyten zurückzuführen (Graham et al., 1997). Auch die Tatsache, daß ANT1-Knock-out-Mäuse lebensfähig sind, spricht für eine Expression von ANT2 oder 3 im Kardiomyozyten, da es unwahrscheinlich ist, daß das Herz ausschließlich mit anaerober Glykolyse überleben kann. Laut anderen Autoren wird ANT2 jedoch sowohl in Herz- als auch in Skelettmuskulatur exprimiert (u.a. Li et al., 1989). In isolierten Lebermitochondrien hat der Verlust der ANT1-Expression keinen Effekt auf die ADP/ATP-Permeabilität, übereinstimmend mit der Prädominanz von ANT2 in Hepatozyten (Graham et al., 1997).

Ist die Herzinsuffizienz durch die fehlende ANT1-Expression induziert, ergibt sich kompensatorisch nur die Möglichkeit, eine der anderen Isoformen verstärkt zu exprimieren. In diesem Fall könnte das in geringem Maße in den Myozyten vorhandene ANT2 verstärkt exprimiert werden. Da bei den hier untersuchten insuffizienten Herzen keine Reduktion der ANT1-Expression detektiert wurde, könnte jedoch ein bestehender relativer ANT1-Mangel zur Induktion der myozytären ANT2-Expression führen. Mit detaillierten Studien müßte geklärt werden, ob und unter welchen Bedingungen in Kardiomyozyten eine ANT2-Expression induziert wird.

1.3 Mutationen im ANT1-Gen

Kaukonen et al. (2000) fanden bei Patienten mit autosomal-dominanter progressiver externer Ophthalmoplegie (adPEO) eine heterozygote Missense-Mutation im ANT1-Gen: Die Änderung G → C im Exon 2 Codon 114 führt zu einem Austausch von Alanin gegen Prolin.

Die adPEO ist eine im Erwachsenenalter beginnende mitochondriale Störung mit multiplen mtDNA-Deletionen. Die Patienten zeigen neben der Ophthalmoplegie eine Ptosis sowie eine Übungsintoleranz. Im Skelettmuskel sind „ragged red fibers“ zu sehen und eine leicht reduzierte Aktivität der Enzyme der Atmungskette zu beobachten.

Die analoge Mutation in der Hefeisoform AAC2 (A128-Mutation) führt zu einer Störung der oxidativen Phosphorylierung und unterbricht die ADP/ATP-Translokation. Im Gegensatz zur Hefe führt der ANT1-Defekt im Menschen zur sekundären Akkumulation von mtDNA-Mutationen in postmitotischen Zellen durch einen bisher unbekanntem Mechanismus. ANT1 könnte also eine Rolle in der mtDNA-Erhaltung spielen, indem ANT1 die intramitochondriale dATP-Konzentration reguliert. Eine Simulationsanalyse der ANT1-Proteinsekundärstruktur zeigt, daß der Aminosäureaustausch eine zusätzliche Biegung des Polypeptids bewirkt und eine

Unterbrechung der lokalen α -Helix verursacht. Diese Mißfaltung könnte zum einem die PTP-Öffnung beeinflussen (s. V. 1.4) und zum anderem das Protein oxidativen Schädigungen aussetzen, die seine vorzeitige alters-bezogene Inaktivierung verursachen. Außerdem könnte die ANT1-Dysfunktion den oxidativen Stress innerhalb der Mitochondrien steigern.

Napoli et al. (2001) fanden in einer betroffenen griechischen Familie im ANT1 einen Austausch an Position 98 von Leucin gegen Prolin, der wie die A114P-Mutation zu einer drastischen Änderung der Proteinsekundärstruktur führt.

Zukünftige Genanalysen sollten klären, ob bei den verschiedenen Formen der Herzinsuffizienz eine Mutation im ANT1-Gen besteht. In einem nächsten Schritt müßte die Frage beantwortet werden, ob eine ggf. bestehende Mutation zur Expression eines dysfunktionellen Proteins führt und ob trotz bzw. wegen des bestehenden Defektes eine verstärkte Expression erfolgt oder es kompensatorisch zur verstärkten Expression einer anderen Isoform kommt.

1.4 ANT1 und Apoptose

ANT wird progressiv während der Zellalterung *in vitro* erniedrigt. Parallel nimmt die mitochondriale Funktion ab, was suggeriert, daß die veränderte Expression von ANT eine aktive Rolle im Prozess der Zellalterung spielen könnte (Fan et al., 1998).

Nach Untersuchungen von Yan und Sohal (1998) in den Flugmuskeln der Hausfliege ist ANT das einzige Protein der Mitochondrienmembran, das eine alters-bezogene Zunahme oxidativer Schädigungen zeigt, korreliert mit einem Verlust der funktionellen ANT-Aktivität. Die funktionelle Inaktivierung führt zu einer Abnahme der oxidativen Phosphorylierung in isolierten Mitochondrien trotz Angebot von ADP (state-III-Respiration), einer erniedrigten ATP-Translokation ins Zytosol und schließlich zum Verlust der Zellfunktion.

Künftige Studien könnten zeigen, ob eine oxidative Schädigung des ANT zur Entstehung der Herzinsuffizienz beiträgt oder sogar deren Ursache darstellt.

Die meisten apoptotischen Prozesse involvieren eine mitochondriale Dysfunktion und einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und der Membranintegrität, charakterisiert durch die Freisetzung von Cytochrom c ins Zytoplasma. Der PTPC (permeability transition pore complex) wird an der Kontaktstelle zwischen Innen- und Außenmembran durch ANT1, VDAC (voltage-dependent anion channel) der Außenmembran und Bax, einem proapoptotischen Modulator, gebildet. Bax und ANT1 kooperieren innerhalb des PTPC (Protein-Protein-Interaktion) und bewirken dessen Öffnung. Die Öffnungswahrscheinlichkeit der PTP wird außerdem durch das mitochondriale Membranpotential, Ca^{2+} und den Matrix-pH reguliert. Die PTP-Öffnung verursacht einen Ca^{2+} -abhängigen Anstieg der mitochondrialen Permeabilität, führt dadurch zur Matrixschwellung und schließlich zum Zelltod. Bcl-2, ein antiapoptotisches Protein, neutralisiert die Kooperation zwischen Bax und ANT1 und verhindert

dadurch die PTP-Öffnung. Da ANT1 normalerweise hoch exprimiert ist, wird die ANT1-induzierte Apoptose in „gesunden“ Zellen durch Cyclophilin D verhindert: durch Assoziation mit ANT1 reguliert Cyclophilin D die Öffnung der PTP und unterdrückt so die Apoptose. Die ANT1-Apoptose-Aktivität scheint nicht von der Funktion als ADP/ATP-Antiporter abhängig zu sein, da viele Transport-inaktive Mutanten zum Zelltod führen können (Bauer et al., 1999).

Diese Daten können helfen, die in DCM-beobachtete Apoptose zu erklären, da die idiopathische DCM durch einen dramatischen Anstieg der ANT1-Spiegel mit konsekutiver Apoptose-Induktion charakterisiert ist (Bauer et al., 1999).

Die erhöhten ANT1-Spiegel scheinen ein Charakteristikum der idiopathischen DCM zu sein; zu klären wäre aber noch, ob hier ein primär bestehendes ANT-Isoformmuster zur Einschränkung der Herzfunktion führt. Bei Herzinsuffizienz anderer Ätiologie wäre eine verstärkte ANT1-Expression mit daraus resultierender Apoptose-Induktion im Rahmen der Kompensationsmechanismen für die bereits eingeschränkte Herzfunktion jedoch fatal.

1.5 Auto-Antikörper gegen ANT1

Interessant ist die Frage, ob eine veränderte ANT-Expression bzw. eine eventuell veränderte ANT-Funktion der Grund oder die Folge der metabolischen Veränderungen bei Herzinsuffizienz ist. Aus einer Abnahme der ANT-Proteinkonzentration oder einer Erniedrigung der ANT-Aktivität könnte eine Verschlechterung des Energiehaushaltes des Myozyten resultieren. Andererseits könnte ein bestehendes Energiedefizit eine kompensatorische ANT-Konzentrationserhöhung bewirken.

Schultheiss et al. (1995) und Schulze et al. (1999a, b) fanden gegen ANT gerichtete Auto-Antikörper in Myokarditis und DCM, nicht aber in ischämischer, hypertrophischer oder alkohol-toxischer Form der Kardiomyopathie. Die Anti-ANT-Antikörper sind organ- und konformationsspezifisch und inhibieren den Nukleotidaustausch *in vitro* durch Blockierung der Substratbindungsstelle.

Schultheiss et al. (1995) und Schulze et al. (1999a) immunisierten Meerschweinchen mit aus Rinderherz isoliertem ANT. Schulze et al. (1999b) zeigten eine Kreuzreaktion zwischen homologen Aminosäuresequenzen von ANT und Coxsackie B3-Virus und induzierten in Mäusen eine Virusmyokarditis durch Coxsackie B3. Sowohl die Meerschweinchen als auch die Mäuse generierten spezifische Antikörper gegen ANT. Die isoliert schlagenden Herzen der Tiere zeigen Veränderungen, die denen herzinsuffizienter Patienten gleichen. Auch die metabolischen Veränderungen entsprechen denen bei Herzinsuffizienz gefundenen.

Die in den Tieren beobachtete hohe mitochondriale ATP-Konzentration spricht gegen eine reduzierte oxidative Phosphorylierung, aber sie könnte eine verschlechterte ANT-Funktion reflektieren. Es ist fraglich, ob die Antikörper für die Verschlechterung des

Energiemetabolismus und die kardiale Dysfunktion verantwortlich sind. Die Virusinfektion selber oder Immunreaktionen wie die Freisetzung von Zytokinen könnten metabolische und funktionelle Veränderungen (eventuell via Calcium-Homöostase) bewirken.

Obwohl eine direkte Inaktivierung von ANT durch Penetration von Antikörpern in lebende Zellen nicht ausgeschlossen werden kann, konnte eine Bindung der Antikörper an eine Untereinheit des Calciumkanals des Sarcolemmas gezeigt werden. Die Bindung an den Calciumkanal induziert eine Verstärkung des Calciuminfluxes. Die intrazellulär erhöhte Calciumkonzentration führt zur progressiven Myozytenschädigung und verursacht eine mitochondriale Calciumüberladung, woraus eine Erniedrigung des mitochondrialen transmembranären Potentials resultiert. Das erniedrigte transmembranäre Potential vermindert den elektrogenen Nukleotidaustausch via ANT, woraus eine erniedrigte zytosolisch-mitochondriale Phosphorylierungspotential-Differenz von ATP resultiert. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Antikörper unabhängig von einer direkten Bindung an ANT den kardialen Energiehaushalt und die kardiale Funktion verschlechtern können (Schulze et al., 1999a).

Diese Daten zeigen, daß die in Myokarditis und DCM gefundenen Anti-ANT-Antikörper nicht bloß ein Epiphänomen sind. Klinische Beobachtungen geben den Beweis, daß Antikörper gegen ANT eine pathophysiologische Rolle spielen:

1. Seren von Patienten mit Myokarditis und DCM inhibieren den Nukleotidaustausch in isolierten Mitochondrien.
2. Die Carrierfunktion in isolierten Mitochondrien aus explantierten DCM-Herzen ist reduziert.
3. Die Carrierkonzentration ist in endomyokardialen Biopsien und explantierten Herzen von DCM-Patienten erhöht, wahrscheinlich um die Antikörper-vermittelte Inaktivierung des Carriermoleküls zu kompensieren.
4. Die Präsenz der Carrier-inaktivierenden Antikörper in den Seren der Patienten mit Myokarditis determiniert die Prognose der Krankheit.

Hier scheint die Inhibition des ANT1 zur Verschlechterung der kardialen Situation zu führen und sekundär zur Erhöhung der ANT1-Konzentration. Sollte also bei DCM ein relativer ANT1-Mangel bestehen, stellt sich die Frage, warum im Herzen die Isoform verstärkt exprimiert wird, welche inhibiert wird. Warum sollte das Herz nicht mit einer erhöhten Expression einer nicht affektierten Isoform, wie des ANT2, reagieren?

1.6 Der ANT1-Promotor

Im Promotor des OXPHOS-Gens ANT1 wurden drei positiv transkriptionale Kontrollregionen identifiziert. Jede Region steigert die Transkription 2-3fach. Die OXBOX-Region besteht aus zwei einzelnen, sich überlappenden Elementen, der 13-bp langen OXBOX und einer 8-bp langen REBOX. Die OXBOX-Bindungsfaktoren sind muskelspezifisch, die REBOX-

Bindungsfaktoren ubiquitär und sensitiv zu NADH und Schilddrüsenhormon. Eine OXBOX wurde auch im Promotor der β -Subunit der ATP-Synthetase gefunden und ist das erste gewebespezifische Element, welches die Gene der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung koordiniert regulieren kann. Die mRNA-Expression beider Gene steigt während der Transition vom fetalen zum reifen Herzen an. Über den OXBOX/REBOX-Komplex wird der Energiemetabolismus an den entwicklungs- und umgebungs-bedingten Bedarf adaptiert (Chung et al., 1990; Li K et al., 1990). Es bleibt abzuwarten, inwieweit eine Regulation über den OXBOX/REBOX-Komplex bei Herzinsuffizienz im Rahmen der Kompensations- und Adaptationsmechanismen stattfindet.

Zusätzlich zeigt der Promotor um Exon1 und Intron1 eine C- und G-reiche Region. In dieser Region wurden 15 mögliche Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Sp1 gefunden. Durch Bindung des Sp1 an das Hexanukleotid GGGCGG kann die Transkription 10-50fach gesteigert werden. Nur eine dieser 15 Bindungsstellen liegt in Form des Decanukleotid-Motivs 5'G/TGGGCGGG/AG/AC/T3' vor, welches eine hohe Affinität für Sp1 besitzt (Cozens et al., 1989). Es bleibt abzuwarten, ob bei Herzinsuffizienz erhöhte Spiegel an Sp1 vorliegen und ob trotz erhöhter Sp1-Konzentration eine verstärkte ANT1-Expression durch noch zu untersuchende Mechanismen verhindert wird.

Detaillierte Promotorstudien könnten jedoch mit dem heute zur Verfügung stehendem Rüstzeug in geeigneten Zellmodellen zum Verständnis der Genregulation beitragen und eine klare Antwort ermöglichen.

2. ANT2-EXPRESSION IM HUMANEN HERZEN

2.1 ANT2-Quantifizierung

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine signifikante Zunahme der ANT2-Konzentration auf mRNA- und Proteinebene im insuffizienten Herzen im Vergleich zu gesunden (s. Abb. 11c, Abb. 12b). Diese Zunahme ist in den ICM-Herzen stärker ausgeprägt als in den DCM-Herzen.

Dörner et al. (1997) sowie Dörner und Schultheiss (2000) untersuchten die ANT-mRNA-Expression bei Herzinsuffizienz. Sie fanden eine Abnahme der ANT2-mRNA in explantierten Herzen von DCM-Patienten sowie in Herzbiopsien von Patienten in frühen DCM-Stadien, nicht aber bei ischämischer und valvulärer Kardiomyopathie. Sie beobachteten die Abnahme in beiden Ventrikeln und im Septum. Wodurch und mit welchen Folgen die ANT2-mRNA-Expression reduziert wird bleibt jedoch offen.

2.2 ANT2-Expression unter verschiedenen metabolischen Gegebenheiten

Die Erhöhung der ANT2-mRNA- und Proteinkonzentration im insuffizienten Herzen könnte mit dem metabolischen Status der Zelle im Zusammenhang stehen. Die insuffizienten Herzen arbeiten stärker anaerob als gesunde, die Kapazität der Glucoseoxidation ist verstärkt, die des Fettsäuremetabolismus vermindert (Klein et al., 1986; Schultheiss, 1992).

Die Regulation der Genexpression des ANT-Analogons der Hefezelle (AAC) ist unter verschiedenen metabolischen Gegebenheiten gut untersucht: Unter aeroben Konditionen bindet der spezifische ROX1-Faktor (regulation by oxygen 1) an den AAC3-Promotor und verhindert die AAC3-Expression. Während AAC1 und 2 den Hefezellen ermöglicht, aerob zu wachsen, ist AAC3 essentiell für das Wachstum unter anaeroben Bedingungen. Der Vergleich der drei humanen mit den drei Hefeproteinen zeigt, daß die Hefeisoform kodiert durch das AAC3-Gen und die humane Isoform kodiert durch das ANT2-Gen am stärksten miteinander verwandt sind. Der Vergleich der Promotoren von AAC3 und ANT2 zeigt ein ROX-ähnliches Bindungsmotiv inmitten der ANT2-Promotorsequenz. Diese 40bp lange DNA-Sequenz, welche nicht in den ANT1- und 3- bzw. AAC1- und 2-Promotoren gefunden worden ist, wurde als GRBOX (glycolysis-regulated box) bezeichnet. Die Expression von ANT2 in transformierten Zellen und Tumorzellkulturen ist korreliert mit der Freigabe eines Faktors, der an das GRBOX-Motiv bindet. Dieser Faktor induziert die ANT2-Expression beim Übergang vom oxidativen zum glycolytischen Metabolismus, um die mitochondrialen energieabhängigen Funktionen durch Import von glycolytischem, im Zytosol synthetisiertem ATP in die mitochondriale Matrix sicherzustellen. Die GRBOX determiniert somit den Weg des ADP/ATP-Austausches in Abhängigkeit vom metabolischen Status der Zelle. Schon 1980 beobachteten Krämer und Klingenberg, daß ANT den ADP/ATP-Austausch in beide Richtungen realisieren kann (Giraud et al., 1998).

Sokolikova et al. (2000) beschrieben eine weitere Promotorregion, die in die Metabolismus-abhängige Repression von AAC3 involviert ist. Die Kohlenstoff-abhängige URS1 (upstream repressing sequence 1) ist von der früher charakterisierten O₂-abhängigen ROX1-Repressor-Bindungsstelle (URS2) verschieden. Beide Repressoren verhindern die AAC3-Expression, wenn ATP durch oxidative Phosphorylierung produziert wird und steigern die Expression, wenn der Import von glycolytischem ATP ins Mitochondrium erforderlich wird.

Die ANT2-mRNA ist also in proliferativen Zellen mit hoher Glycolyserate (wie neoplastische Zellen oder stimulierte Fibroblasten) stark exprimiert, nicht aber in Zellen mit einem ausschließlich oxidativen Metabolismus oder in ruhenden Zellen mit niedrigem Energiebedarf (Giraud et al., 1998). Diese Ergebnisse passen zu der hier beobachteten Zunahme der ANT2-mRNA und des ANT2-Proteins im insuffizienten Herzen, da die insuffizienten Herzen eine verstärkte Glycolyse zeigen und es bei Herzinsuffizienz im Rahmen des ventrikulären

Remodelings zu einer Hypertrophie der Myozyten und einer Proliferation von Fibroblasten kommt.

Kinetisch-funktionelle Untersuchungen sollten klären, ob alle drei ANT-Isoformen den ADP/ATP-Austausch in beide Richtungen katalysieren können oder ob dieses ein Charakteristikum des ANT2 darstellt. Es bleibt abzuwarten, ob bei Herzinsuffizienz die Konzentration des Faktors, der an die GRBOX bindet erhöht ist und ob die verstärkte ANT2-Expression tatsächlich über diesen Mechanismus induziert wird.

2.3 ANT2-Expression in verschiedenen Zellpopulationen des Herzens und in der Leber

Die immunhistologische ANT2-Darstellung im humanen insuffizienten Herzen zeigt, daß ANT2 im Gegensatz zu ANT1 kaum in den Kardiomyozyten lokalisiert ist, sondern hauptsächlich interstitiell im Bindegewebe des Herzens. Diese Lokalisation wirft die Frage auf, ob die Zunahme des ANT2-Proteins im Western Blot durch eine verstärkte Expression in den Fibroblasten zustande kommt, also nicht durch eine veränderte Expression in den Kardiomyozyten. Diese Möglichkeit wird dadurch gestützt, daß die eingesetzten Mitochondrien-angereicherten Fraktionen aus dem gesamten Gewebe extrahiert wurden, also keine Separation der Kardiomyozyten von den anderen Zellen des Herzgewebes stattfand. Da ANT2 physiologisch in Fibroblasten hoch exprimiert wird, könnte eine Zunahme der Fibroblasten im Rahmen der Kompensationsmechanismen bei Herzinsuffizienz die im Western Blot beobachtete Zunahme des ANT2-Proteins erklären. Auch die hier gezeigte ANT2-Proteinkonzentrationserhöhung in ICM gegenüber DCM ließe sich mit einer stärkeren Fibrosierung bei ICM erklären. Unklar ist allerdings, ob ausschließlich die Menge der Fibroblasten bei normalem ANT-Gehalt des einzelnen Fibroblasten verändert wird oder die Fibroblasten zusätzlich eine verstärkte ANT2-Expression zeigen.

Da in den hier vorliegenden immunhistologischen Nachweisen keine sichere Aussage bezüglich der Quantität der einzelnen ANT-Isoformen möglich ist und eine geringe ANT2-Menge im Kardiomyozyten unter die Nachweisgrenze fallen könnte, sollte in weiteren Studien vor Extraktion der mRNA bzw. Mitochondrien-angereicherter Fraktionen eine Separation der Kardiomyozyten von den Bindegewebezellen des Herzens angestrebt werden, um eine Veränderung der ANT-Expression sicher den Kardiomyozyten zuordnen zu können.

Die immunhistologische ANT2-Darstellung in der Leber zeigt eine Zonalisierung mit einer Zunahme der ANT2-Konzentration von Zone 1 nach Zone 3 innerhalb eines Leberazinus, also von periportal nach perivenös. Diese Zunahme ist negativ mit der Nährstoff- und O₂-Versorgung des Hepatozyten korreliert.

Diese Beobachtung ließe sich mit den Ergebnissen von Giraud et al. (1998) erklären, die beim Übergang vom oxidativen zum glycolytischen Metabolismus eine Zunahme der ANT2-Expression zeigen konnten.

Tatsächlich zeigen die Hepatozyten der periportal (afferenten) und perivenösen (efferenten) Zone Unterschiede bezüglich ihres Enzymgehaltes und ihrer subzellulären Strukturen: Die Schlüsselenzyme der Gluconeogenese sind hauptsächlich in der periportal, die der Glycolyse in der perivenösen Zone lokalisiert. Diese heterogene Expression in den Hepatozyten soll unter anderem durch den von periportal nach perivenös bestehenden O_2 -Gradienten bedingt sein (Jungermann, 1983, 1985).

Die ANT-Verteilung stellt einen weiteren Baustein der „metabolischen Zonalisierung“ der Leber dar. Die unter verschiedenen O_2 -Konzentrationen verschieden schnell ablaufende Glycogenolyse bzw. Glykogensynthese in den einzelnen Zonen wirft die Frage auf, wie empfindlich die ANT-Expression in den einzelnen Zonen auf verschiedene O_2 -Konzentrationen reagiert. Mit weiteren Studien könnte geklärt werden, ob und über welche Mechanismen es zur Verstärkung oder Drosselung der ANT-Expression in den einzelnen Zonen bei verschiedenen O_2 -Konzentrationen kommt.

Die in der Leber vermutete O_2 -abhängige ANT2-Expression könnte die bei Herzinsuffizienz beobachtete ANT2-Konzentrationszunahme im Rahmen des veränderten Metabolismus erklären. In geeigneten Zellkulturen könnte die Frage, beantwortet werden, ob eine Drosselung der O_2 -Zufuhr zu einer ANT2-Expression im Kardiomyozyten führen kann.

2.4 Der ANT2-Promotor

Ein Merkmal des ANT2-Gens, das seine Expression beeinflussen könnte, sind CpG-reiche Inseln im Bereich des 5'-Endes. Außerdem zeigt der ANT2-Promotor zahlreiche potentielle Bindungstellen für den Transkriptionsfaktor Sp1. So besitzt das ANT2-Gen eine Anzahl von Merkmalen in Nähe des 5'-Endes, welche nahelegen, daß es sich um ein „housekeeping-Gen“ handelt, das in allen Geweben exprimiert wird (Cozens et al., 1989).

Sp1 gehört zu einer Familie von vier Zinkfinger-DNA-Bindungs-Proteinen und wird ubiquitär exprimiert. Obwohl Sp1 keine Repressions-Motive zeigt, sind Sp1-Proteine oder Sp1-Bindungselemente oft an der negativen Regulation beteiligt (Zaid et al., 2001). So wird die ANT2-Expression durch Sp1 sowohl aktiviert als auch supprimiert; diese duale Funktion des Sp1 könnte eine Rolle in der Modulation der ANT2-Expression während der Wachstumsaktivierung spielen.

Der Promotor enthält im Bereich der Nukleotide -87 bis +8 drei Sp1-cis-Elemente: A-, B- und C-Box; diese werden in anderen Wachstums-assoziierten Genen für die Regulation der Expression genutzt. Die A- und B-Box (Tandem-Sp1-Aktivierungselement), zentriert um die Nukleotide -79 und -68, funktionieren als synergistische Aktivatoren. Die neben dem

Transkriptionstart liegende C-Box ist für die Suppression des ANT2-Promotors verantwortlich (Li et al., 1999). Sp1 verhindert durch Bindung an die C-Box die Sp1-AB-Box-vermittelte Aktivierung, wobei die C-Box-vermittelte Repression durch die korrekte Organisation des Tandem-Sp1-Aktivierungselementes determiniert wird (Zaid et al., 2001). Nach Zaid et al. (2001) kann Sp1 durch Platzierung von Corepressoren, wie der Histon-Deacetylase, die Genexpression beeinflussen. So reprimiert hypoacetyliertes Chromatin das Sp1-AB-Aktivierungselement und suprimiert dadurch den Promotor, während Hyperacetylierung den Promotor aktiviert.

Die Histon-Acetylierung ist zeitlich eng mit der mRNA-Synthese gekoppelt und nimmt während der DNA-Synthese-Phase des Zellzyklus zu. Da bei Herzinsuffizienz eine allgemeine Wachstumsaktivierung zu beobachten ist, könnte es via Histon-Acetylierung zur Aktivierung des ANT2-Promotors kommen. Zu untersuchen wäre, ob bei Herzinsuffizienz die Sp1-Spiegel erhöht sind und ob die Bindung von Sp1 an das AB-Aktivierungselement zu einer Induktion der ANT2-Expression führt.

Li et al. (1999) fanden im proximalen Promotor zwei mutmaßliche AP2-Bindungsstellen. Eine exakt übereinstimmende Bindungsstelle liegt im Bereich -200/-179 und wird von zwei weiteren Sp1-Bindungsstellen flankiert. Eine AP2-ähnliche Bindungsstelle (-9/+12) überlappt die proximale Sp1-Suppressorstelle (C-Box). AP2 und Sp1 binden unabhängig voneinander an die C-Box, wobei AP2 eine 10-15fach höhere Affinität zur C-Box (-14/+6) zeigt. Ein direkter Effekt auf die ANT2-Promotor-Aktivität kann durch alleinige Bindung des AP2 in Höhe der C-Box nicht beobachtet werden. Vielmehr verstärkt AP2 die Sp1-abhängige Promotoraktivität mehrfach. Eine Erklärung, warum AP2 allein keinen Einfluß auf die Promotoraktivität hat, ist, daß die Konzentration von endogenem Sp1 bereits die maximale Aktivität des ANT2-Promotors sicherstellt. So verstärkt AP2 die Sp1-abhängige Transkription nur, wenn Sp1 limitiert ist, also unter Bedingungen, in welchen die zelluläre AP2/Sp1-Ratio hoch ist.

In geeigneten Studien müßte die zelluläre AP2/Sp1-Ratio bei Herzinsuffizienz erfaßt werden, um zum Verständnis der Genregulation beizutragen und die Frage zu beantworten, ob in Abhängigkeit der Ratio eine ANT2-Expression in insuffizienten Herzen induziert wird.

Laut Barath et al. (1999b) zeigt der ANT2-Promotor drei Suppressionsregionen, die verschiedene physiologische Rollen besitzen könnten. Die proximale Sp1-Suppressionsregion und die eine „upstream“ liegende Suppressionsregion beeinflussen die Promotoraktivität in exponentiell wachsenden Zellen, während der distale Suppressor in Zellen aktiv ist, die den Zellzyklus verlassen. In Zellkultur besteht eine hohe Korrelation zwischen der Zelldichte und der ANT2-Transkriptkonzentration; die Konzentrationen erreichen ein Maximum, wenn die Zellen der S-Phase näherkommen und ein Minimum bei Erreichen der Konfluenz. Der distale Suppressor ist für die Suppression der Transkription bei Erreichen der Konfluenz erforderlich.

Die Transkription wird ein- bzw. abgeschaltet während des Übergangs von bzw. zu G₀. Die ANT2-Expression reflektiert also vielmehr den Proliferationsstatus als ein zellzyklus-spezifisches Ereignis. So wird ANT2 bevorzugt in Geweben mit Proliferationskapazität exprimiert und vermindert exprimiert in Zellen, welche differenzieren. Die ANT2-Induktion scheint also ein generelles Merkmal der Wachstumsaktivierung zu sein.

Die proximale Suppressionsregion enthält ein Tandem-Sp1-AB-Element, daß die Promotoraktivität um 70-75% senkt. Die B-Region zeigt ein GTCCTG-Repeat ohne Zwischenraum. Das GTCCTG-Bindungsprotein scheint in vielen Säugetierzellen exprimiert zu sein und das Hexanukleotid (GTCCTG) ist in vielen Promotoren präsent, während das Hexanukleotid-Repeat (GTCCTGGTCCTG) rar ist. Die A-Region enthält putative AT-Strecken, welche für die Nucleosom-Formation wichtig sind (Barath et al., 1999a, b).

Die im Rahmen der Kompensationsmechanismen bei Herzinsuffizienz bestehende Wachstumsaktivierung könnte zu einer verstärkten ANT2-Expression führen. In künftigen Untersuchungen sollte geklärt werden, durch welche Mechanismen bzw. Faktoren es bei Wachstumsaktivierung zur Induktion der ANT2-Expression kommt.

2.5 Funktionelle Unterschiede der ANT-Isoformen

Auch mögliche unterschiedliche funktionelle und kinetische Charakteristika der Isoformen könnten für die isoform-spezifische Expression bei Herzinsuffizienz verantwortlich sein.

1997 zeigten Graham et al. die hohe Effizienz des Nukleotidtransports von ANT2 in ANT1-knock-out-Mäusen: ANT2 allein war fähig die ADP-stimulierte Respirationsrate in isolierten Herzmitochondrien auf 66% aufrechtzuerhalten, obwohl die myokardiale ANT2-mRNA-Konzentration in diesen Tieren unverändert war. So scheint die ANT2-Aktivität höher oder die Antiporter-Funktion effizienter zu sein als die des ANT1.

Bei einer kompensatorischen Erhöhung der ANT-Konzentration bei Herzinsuffizienz wäre es sinnvoll, die Isoform verstärkt zu exprimieren, welche die höchste Aktivität besitzt. Es stellt sich die Frage, ob unter verschiedenen Bedingungen konstante Nukleotid-Transportraten der einzelnen Isoformen zu verzeichnen sind oder ob unter bestimmten Voraussetzungen, die Transportaktivität gesteigert werden kann. Experimente mit isolierten Mitochondrien aus entsprechenden Knock-out-Mäuse sollten vorgenommen werden.

2.6 ANT-Expression im fetalen Herzen

Die verschiedenen Wachstumsfaktoren wie Katecholamine, AngiotensinII, Aldosteron und Endothelin1, deren kardiale und systemische Konzentrationen bei Herzinsuffizienz erhöht sind, führen möglicherweise zu einer Re-Expression von fetalen muskelspezifischen Genen. Diese

Phänokonversion erlaubt den Myozyten, sich an die neuen Gegebenheiten zu adaptieren (Swynghedauw und Baillard, 2000). Im fetalen Herzen, also während die Myoblasten proliferieren, ist vor allem ANT2 exprimiert. Im Stadium der Differenzierung kommt es zu einem Abfall der ANT2- und einem Anstieg der ANT1-Konzentration (Stepien et al., 1992).

Der hier beobachtete Anstieg der ANT2-Konzentration bei Herzinsuffizienz könnte dafür sprechen, daß sowohl DCM- als auch ICM- Herzen ein „fetales“ Expressionsmuster zeigen. Das fetale Expressionmuster könnte also ein generelles Merkmal der Herzinsuffizienz sein. Diese Beobachtung paßt zu den Daten von Ye et al. (2001), die zeigten, daß die hypertensive Kardiopathie durch ein fetales Expressionsmuster der myokardialen Keratinkinase determiniert ist. Yamashita et al. (1999) konnten zeigen, daß bei Hypertonie im Rahmen der Adaptation die ANT2-mRNA im Gehirn zunimmt. Nach Tan et al. (2002) ist bei Herzinsuffizienz, übereinstimmend mit der Rückkehr zu einem fetalen Genexpressionsmuster, β -Myosin-Heavy-Chain stärker exprimiert und das kardiale α -Actin durch skeletales α -Actin ersetzt.

Untersuchungen von Portman et al. (1997) zeigten, daß die Reifung vom fetalen zum erwachsenen Schaf mit einer 2,5-fachen Zunahme des Gesamt-ANT-Proteins einhergeht und mit einer ANT1-mRNA-Erhöhung koordiniert ist.

Portman et al. (2000) beobachtete, daß maladaptive Herzen, welche ein ANT-Defizit aufweisen, eine ADP-abhängige respiratorische Kinetik gleich der des neugeborenen Herzen zeigen. Die Signaltransduktionsmechanismen, welche die mitochondriale ATP-Synthese mit der zytosolischen ATP-Utilisation verbinden, ändern sich während der postnatalen Entwicklung. Während die zytosolischen ADP-Konzentrationen während erhöhter oxidativer Phosphorylierungsraten im reifen Herzen konstant bleiben, zeigt das Neugeborenenherz einen Anstieg der ADP-Spiegel. Die fetale- und neugeborenen mitochondriale Respiration kann durch die Phosphorylierungsaktivität, definiert durch die Membran-Komponenten ANT und F₀-F₁-ATPase, limitiert bzw. reguliert werden, da die fetalen Mitochondrien höhere ADP-Spiegel erfordern, um die Respiration anzutreiben. Der Übergang von ADP-vermittelter respiratorischer Kontrolle zum Kontrollflux via ANT wird durch T₃ reguliert. So zeigen thyreoektomierte Lämmer eine Erniedrigung des myokardialen Spitzen-Sauerstoffverbrauchs, eine verminderte Phosphokreatin/ATP-Ratio sowie eine koordinierte Zunahme des freien zytosolischen ADP und der oxidativen Phosphorylierungsrate. ANT-Defizite und Alterationen in der mitochondrialen respiratorischen Funktion könnten also zur Pathogenese des myokardialen Remodeling und der Herzinsuffizienz beisteuern (Portman, 2000; Portman et al., 2000).

2.7 ANT2-Expression und T3

Klein und Ojama (2001) fanden bei Patienten mit unkompliziertem, akutem Myokardinfarkt und bei Patienten mit Herzinsuffizienz proportional zum NYHA-Grad erniedrigte Spiegel des Schilddrüsenhormons T3. Die Abnahme der T3-Konzentration bei Patienten mit nicht-thyreoidalen Krankheiten kann die Herzfunktion und die Expression kardialer Gene im Sinne einer Hypothyreose verändern. So zeigten Kinugawa et al. (2001), daß die physiologische und pathologische kardiale Hypertrophie entgegengesetzte Änderungen bezüglich der Transkription Schilddrüsenhormon-responsiver Gene aufweisen, wobei in pathologischer Hypertrophie die Transkription im Sinne eines relativen Hypothyreoidismus verändert ist. Der in Hypertrophie-Modellen mit hypothyroid-ähnlichem-mRNA-Phänotyp vermindert exprimierte Schilddrüsenhormonrezeptor TR β 1 führt zur Erniedrigung der β -Myosin-Heavy-Chain und der Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums, der vermindert exprimierte TR α 1 zur erniedrigten Expression der α -Myosin-Heavy-Chain sowie zur Zunahme der Myozytengröße. T3 erhöht durch ADP-Ribosylierung die Stabilität der „externally-facing C-Konformation“ des ANT, welche durchlässiger für Kationen ist als die „matrix-facing M-Konformation“, was den ADP-Import verstärkt (Mowbray, Hardy, 1996). So könnte der bei Herzinsuffizienz erniedrigte T3-Spiegel zu einem eingeschränkten ADP-Import ins Mitochondrium via ANT führen, was für eine eingeschränkte Aktivität des ANT bei Herzinsuffizienz sprechen könnte.

Da bei Herzinsuffizienz die Expression Schilddrüsenhormon-responsiver Gene erniedrigt ist, könnte eine Einschränkung der ANT1-Expression via T3-sensitiver REBOX vermutet werden. Untersuchungen zeigten aber, daß ANT1 trotz T3-sensitiver REBOX nicht durch T3 reguliert wird, jedoch ANT2, das im Promotor keine REBOX aufweist. So zeigten Dümmler et al. (1996) nach T3-Applikation in eine hypothyreote Ratte eine 7-9fache Zunahme der ANT2-mRNA in Leber und Herz, jedoch nicht in Niere und Gehirn. Parallel beobachteten sie eine Zunahme des Gesamt-ANT-Proteins.

T3 führt zu einer mitochondrialen Membranexpansion durch Transkriptionsaktivierung spezifischer, kernkodierter Gene. Laut Portman et al. (2000) ist nach postnataler Thyreoektomie der Gesamt-ANT-Proteingehalt 4fach, die mRNA-Konzentration der einzelnen ANT-Isoformen jeweils 2fach niedriger als in den Kontrollen. Das Nichtvorhandensein einer Änderung des β F1-ATPase-Proteins zeigt, daß die T3-abhängige Zunahme des ANT nicht Teil einer ubiquitären mitochondrialen Membranprotein-Expansion ist. Das impliziert, daß T3 spezifisch die ANT-Expression durch Mechanismen reguliert, die nicht die „gemeinsame“ Promotorstelle involviert.

Der durch Thyreoektomie induzierte T3-Mangel führt zu quantitativen und qualitativen Änderungen: Es kommt zu einer Abnahme der ANT-Menge sowie zu einem Defizit im Adenin-Nukleotid-Transport und Alterationen in der respiratorischen Kontrolle durch ANT. Diese Defizite können durch T3 nicht schnell reversibel gemacht werden (Portman et al., 2000).

Die hier beobachtete Zunahme der ANT2-Konzentration bei Herzinsuffizienz passt nicht zu der Beobachtung, daß bei Herzinsuffizienz die T3-Spiegel erniedrigt sind. Die Zunahme der ANT2-Konzentration bei Herzinsuffizienz scheint also nicht T3-induziert zu sein und ist daher wohl auf andere, noch zu untersuchende Faktoren zurückzuführen.

3. ANT3-EXPRESSION IM HUMANEN HERZEN

3.1 ANT3-Quantifizierung

Die ANT3-Konzentration ist auf Protein- und mRNA-Ebene bei DCM und ICM gegenüber den Kontrollen unverändert (s. Abb. 16c, Abb. 17b).

Auch die Ergebnisse von Dörner et al. (1997) sowie Dörner und Schultheiss (2000) zeigen in DCM und ICM einen unveränderten Gehalt an ANT3-mRNA in beiden Ventrikeln und im Septum.

3.2 ANT3-Expression in verschiedenen Zellpopulationen des Herzens und in der Leber

Wie die immunhistologischen Befunde zeigen ist ANT3 wie ANT2 vor allem interstitiell im Bindegewebe des Herzens lokalisiert. Falls die ANT2-Zunahme durch die bei Herzinsuffizienz entstehende Fibrosierung bedingt ist, stellt sich die Frage, warum die ANT2-Konzentration, nicht aber die ANT3-Konzentration ansteigt. Zukünftige Untersuchungen müßten klären, ob die Erhöhung der Fibroblastenmenge mit einer Reduktion des ANT3-Gehalts des einzelnen Fibroblasten assoziiert ist.

3.3 Der ANT3-Promotor und die Bedeutung des ANT3

ANT3 wird ubiquitär in geringen Mengen exprimiert (Barath et al., 1999a). Über die ANT3-mRNA-Konzentration bei verschiedenen metabolischen Verhältnissen und den ANT3-Promotor liegen bisher wenig Ergebnisse vor. In geeigneten Tiermodellen (z.B. ANT3-Knock-out-Mäuse) könnte geklärt werden, inwieweit die ANT3-Expression für das gesunde Herz überhaupt relevant ist. Promotorstudien könnten klären, unter welchen Bedingungen es zu einer Induktion bzw. Suppression der ANT3-Expression kommt und ob diese Bedingungen im Status der Herzinsuffizienz zu beobachten sind.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Täglich werden ca. 75kg ATP aus ADP produziert und für energieabhängige Vorgänge wieder verbraucht. Die Adenin-Nukleotid-Translokase (ANT) ist der einzige Carrier, der den Antiport von mitochondrial regeneriertem ATP gegen zytosolisches ADP über die innere Mitochondrienmembran katalysiert. Damit stellt ANT eines der wichtigsten Proteine im Energiestoffwechsel der Zelle dar, insbesondere in Organen, die eine hohe Energieproduktion leisten wie Leber oder Herz.

ANT kommt in der Hefe sowie in allen Säugern vor. Im Menschen existieren drei Isoformen: ANT1 stellt die Hauptisoform in Herz- und Skelettmuskulatur dar, ANT2 wird vor allem in Leber, Niere und Gehirn exprimiert und ANT3 ist ubiquitär in geringen Mengen zu finden.

Die Herzinsuffizienz ist eine der am häufigsten gestellten internistischen Diagnosen. Die insuffizienten Herzen sind dadurch charakterisiert, daß sie trotz ausreichenden venösen Angebots nicht in der Lage sind, den gesamten Organismus seinen Bedürfnissen entsprechend mit Blut zu versorgen. Zur Kompensation der unzureichenden Pumpleistung wird das neurohumorale System aktiviert. Es kommt zu makroskopischen und mikroskopischen Veränderungen des Myokards. Gleichzeitig kommt es zu einer Störung der Calcium-Homöostase sowie zu Alterationen der oxidativen Phosphorylierung mit konsekutiver Reduktion der energiereichen Phosphate.

Da ANT essentiell für die Bereitstellung energiereicher Phosphate im Zytosol ist, stellt sich die Frage, ob und gegebenenfalls wie die Expression der ANT-Isoformen im insuffizienten Herzen verändert ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist, über vereinzelte, publizierte Daten auf mRNA-Ebene hinauszugehen und die drei ANT-Isoformen im linken Ventrikel humaner insuffizienter Herzen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene im Vergleich zu suffizient arbeitenden Herzen zu quantifizieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen in den insuffizienten Herzen auf mRNA- und Proteinebene eine Zunahme der ANT2-Konzentration bei unveränderten Konzentrationen an ANT1 und ANT3. Dieses Expressionsmuster ist sowohl in Dilatativer (DCM) als auch in Ischämischer Kardiomyopathie (ICM) zu beobachten. Darüber hinaus zeigen die immunhistologischen Befunde, daß ANT2 und ANT3 vornehmlich interstitiell im Bindegewebe des Herzens lokalisiert sind, während ANT1 hauptsächlich in den Kardiomyozyten zu finden ist.

Die Tatsache, daß die einzelnen ANT-Isoformen spezifisch bei Herzinsuffizienz exprimiert werden, könnte zum einen durch die unterschiedlichen Promotorsequenzen der drei ANT-Gene erklärt werden. Diese unterschiedlichen Promotoren legen nahe, daß die drei ANT-Gene verschiedenen regulatorischen Kontrollen unterstehen. Zum anderen könnten isoform-spezifische Charakteristika und die unterschiedliche ANT-Isoform-Verteilung in den verschiedenen Zellpopulationen des Herzgewebes für das hier gefundene Expressionsmuster verantwortlich sein.

Die ANT2-Expression wird zusätzlich im Hinblick auf den metabolischen Status des Myozyten und insbesondere auf eine bestehende partielle Hypoxie im Herzen diskutiert. Des Weiteren wird die Zunahme der ANT2-Menge vor dem Hintergrund einer möglichen Re-Expression eines fetalen Genmusters betrachtet.

Die ANT1-Expression wird im Hinblick auf quantitative und qualitative Veränderungen diskutiert. Auf der einen Seite führt ein absoluter bzw. relativer ANT1-Mangel zu Veränderungen, die denen bei Herzinsuffizienz beobachteten gleichen, auf der anderen Seite führt eine ANT1-Überexpression zur Apoptose. Außerdem werden die Ergebnisse in Bezug auf frühere Untersuchungen auf den Einfluß der Ätiologie und des Schweregrades der Insuffizienz betrachtet.

Über die ANT3-Expression und ihre Regulation ist wenig bekannt. Die Bedeutung des ANT3 im gesunden sowie im pathologisch veränderten Herzen ist noch unklar.

Für die differenzierte Betrachtung des ANT-Isoformmusters bei Herzinsuffizienz sollte die Ätiologie sowie der Schweregrad der Insuffizienz berücksichtigt werden. Die vorliegenden neuen Befunde auf Zellebene implizieren, daß in weiteren Studien vor Extraktion der mRNA bzw. Mitochondrien-angereicherter Fraktionen eine Separation der Kardiomyozyten von den Bindegewebszellen des Herzens angestrebt werden sollte, um eine Veränderung der ANT-Expression sicher den verschiedenen Zellpopulationen des Herzens zuordnen zu können.

Wo und wie die Signalwege in Physiologie und Pathophysiologie in Verbindung stehen und damit fein abgestimmt die ANT-Genexpression steuern ist noch unklar. Die Charakterisierung dieser Signalwege und ihrer Steuerung wird Erkenntnisse bringen, die zum Verständnis der Entstehung der Herzinsuffizienz beitragen und diagnostische sowie therapeutische Optionen eröffnen.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Barath P, Luciakova K, Hodny Z et al., 1999a, The growth-dependent expression of the adenine nucleotide translocase-2 (ANT2) gene is regulated at the level of transcription and is a marker of cell proliferation. *Exptl Cell Res* 248: 583-588
- Barath P, Albert-Fournier B, Luciakova K et al., 1999b, Characterization of a silencer element and purification of a silencer protein that negatively regulates the human adenine nucleotide translocator 2 promoter. *J Biol Chem* 274: 3378-3384
- Barbour RL, Chan SH, 1981, Characterization of the kinetics and mechanism of the mitochondrial ADP-ATP carrier. *J Biol Chem* 256: 1940-1948
- Battini R, Ferrari S, Kaczmarek L et al., 1987, Molecular cloning of a cDNA for a human ADP/ATP carrier which is growth-regulated. *J Biol Chem* 262: 4355-4359
- Bauer MKA, Schubert A, Rocks O et al., 1999, Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis. *J Cell Biol*; 147: 1493-1502
- Böhm M, 2000, Herzinsuffizienz. Thieme, Stuttgart
- Böhm M, 2001, Herzinsuffizienz. In: Schulz R, Pathophysiologie und Pharmakotherapie von Koronarer Herzkrankheit und Herzinsuffizienz. Uni-med Verlag, Bremen
- Bradford MM, 1976, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Braunwald E, 1980, Clinical manifestations of heart failure. In: Braunwald E, editor. *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*. Philadelphia: Saunders, 1988: 471-484
- Bucheler K, Adams V, Brdieszka D, 1991, Localisation of the ATP/ADP translocator in the inner membrane and regulation of contact sites between mitochondrial envelope membranes by ADP. A study on freeze-fractured isolated liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1056: 233-242
- Buchwald A, Till H, Unterberg C et al., 1990, Alterations of the mitochondrial respiratory chain in human dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 11: 509-516
- Chen ST, Chang CD, Huebner K et al., 1990, A human ADP/ATP translocase gene has seven pseudogenes and localizes to chromosome X. *Somat Cell Mol Genet* 16: 143-149
- Chung AB, Stepien G, Haraguchi Y et al., 1992, Transcriptional control of nuclear genes for the mitochondrial muscle ADP/ATP translocator and the ATP synthase beta subunit: multiple factors interact with the OXBOX/REBOX promoter sequences. *J Biol Chem* 267: 21154-21161
- Cowie MR, Mostered A, Wood DA et al., 1997, The epidemiology of heart failure. *Eur Heart J* 18: 208-225
- Cowie MR, Wood DA, Coats AJ et al., 1999, Incidence and aetiology of heart failure; a population-based study. *Eur Heart J* 20: 398-399
- Cozens AL, Runswick MJ, Walker JE, 1989, DNA sequences of two expressed nuclear genes for human mitochondrial ADP/ATP translocase. *J Mol Biol* 206: 261-280

- Dörner A, Schulze K, Rauch U et al., 1997, Adenine nucleotide translocator in dilated cardiomyopathy: pathophysiological alterations in expression and function. *Mol Cell Biochem* 174: 261-269
- Dörner A, Schultheiss HP, 2000, The myocardial expression of the adenine nucleotide translocator isoforms is specifically altered in dilated cardiomyopathy. *Herz* 25: 176-180
- Dümmler K, Müller S, Seitz HJ et al., 1996, Regulation of adenine nucleotide translocase and glycerol 3-phosphate dehydrogenase expression by thyroid hormones in different rat tissues. *Biochem J* 317: 913-918
- Endres M, Neupert W, Brunner M, 1999, Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex. *EMBO J* 18: 3214-3221
- The Task Force on Heart failure of the European Society of Cardiology, 1995, guidelines for the diagnosis of heart failure. *Eur Heart J* 16: 741-751
- Eyermann R, 2000, Herzinsuffizienz - chronische Erkrankung mit wachsender Bedeutung. Themenmonat des Jahres 2000 der Deutschen Herzstiftung als bundesweite Aktion aller Kardiologen und Kardiochirurgen
- Fan W, Kou H, Shen D et al., 1998, Identification of altered expression of ADP/ATP translocase during cellular senescence in vitro. *Exp Gerontol* 33: 457-465
- Gawaz M, Douglas MG, Klingenberg M, 1990, Structure-function studies of adenine nucleotide transport in mitochondria. II. Biochemical analysis of distinct AAC1 and AAC2 proteins in yeast. *J Biol Chem* 265: 14202-14208
- Giraud S, Bonod-Bidaud C, Wesolowski-Louvel M et al., 1998, Expression of human ANT2 gene in highly proliferative cells: GRBOX, a new transcriptional element, is involved in the regulation of glycolytic ATP import into mitochondria. *J Mol Biol* 281: 409-418
- Graham BH, Waymire KG, Cottrell B et al., 1997, A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nature Genetics* 16: 226-234
- Hellige G, 1999, Betablocker bei chronischer Herzinsuffizienz - Ein Paradigmenwechsel in Pathophysiologie und Therapie. Acris Verlag, München
- Houldsworth J, Attardi G, 1988, Two distinct genes for ADP/ATP translocase are expressed at the mRNA level in adult human liver. *Proc Natl Acad Sci* 85: 377-381
- Jungermann K, 1983, Functional significance of hepatocyte heterogeneity for glycolysis and gluconeogenesis. *Pharmacol Biochem Behav* 18: 409-414
- Jungermann K, 1985, Metabolic zonation of liver parenchyma. Regulation of the glucostat of the liver. *Naturwissenschaften* 72: 76-84
- Kalsi KK, Smolenski RT, Pntehard RD et al., 1999, Energetics and function of the failing human heart with dilated or hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Clin Invest* 29: 469-477
- Kaukonen J, Juselins JK, Tiranti V et al., 2000, Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science* 289: 782-785

- Kinugawa K, Yonekura K, Ribeiro RC et al., 2001, Regulation of thyroid hormone receptor isoforms in physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Circ Res* 89: 591-598
- Klein I, Ojama K, 2001, Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med* 344: 501-509
- Klein HH, Spaar U, Schleppe H et al., 1986, Comparative analysis of myocardial enzyme activities of the energy-supplying metabolism in patients with dilatative cardiomyopathies and valve diseases. *Clin Cardiol* 9: 197-202
- Klingenberg M, 1981, The ADP/ATP carrier in mitochondrial membranes. Martonosi AN, ed. *The enzymes of biological membranes*, Vol 4. New York: Plenum Press: 511-553
- Klingenberg M, 1992, Structure-function of the ADP/ATP carrier. *Biochem Soc Trans* 20: 547-550
- Klingenberg M, Nelson DR, 1994, Structure-function relationships of the ADP/ATP carrier. *Biochim Biophys Acta* 1187: 241-244
- Ku DH, Kagan J, Chen ST et al., 1990, The human fibroblast adenine nucleotide translocator gene. Molecular cloning and sequencing. *J Biol Chem* 265: 16060-16063
- Li K, Warner CK, Hodge JA et al., 1989, A human muscle adenine nucleotide translocator gene has four exons, is located on chromosome 4, and is differentially expressed. *J Biol Chem* 264: 13998-14004
- Li K, Hodge JA, Wallace DC, 1990, OXBOX, a positive transcriptional element of the heart-skeletal muscle ADP/ATP translocator gene. *J Biol Chem* 265: 20585-20588
- Li R, Hodny Z, Zaid A et al., 1999, AP-2 enhances Sp1-dependent activation of the growth-regulated human ATP/ADP translocator. *J Biochem* 126: 130-136
- Limas CJ, Olivari MT, Goldenberg IF et al., 1987, Calcium uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum in human dilated Cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 21: 601-605
- Mowbray J, Hardy DL, 1996, Direct thyroid hormone signalling via ADP-ribosylation controls mitochondrial nucleotide transport and membran leakiness by changing the conformation of the adenine nucleotide transporter. *FEBS Lett* 394: 61-65
- Murakami Y, Zhang J, Eijgelshoven MHJ et al., Myocardial creatine kinase kinetics in hearts with postinfarction left ventricular remodeling. *Am J Physiol* 276: 892-900
- Murdock DG, Boone BE, Esposito LA et al., 1999, Up-regulation of nuclear and mitochondrial genes in the skeletal muscle of mice lacking the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *J Biol Chem* 274: 14429-14433
- Napoli L, Bordoni A, Zeviani M et al., 2001, A novel missense adenine nucleotide translocator-1 gene mutation in a Greek adPEO family. *Neurology* 57: 2295-2298
- Neckelmann N, Li K, Wade RP et al., 1987, cDNA sequence of a human skeletal muscle ADP/ATP translocator: lack of a leader peptide, divergence from a fibroblast translocator cDNA, and coevolution with mitochondrial DNA genes. *Proc Natl Acad Sci* 84: 7580-7584

- Neubauer S, Krahe T, Schindler R et al., 31P magnetic resonance spectroscopy in dilated cardiomyopathy and coronary artery disease. Altered cardiac high-energy phosphate metabolism in heart failure. Circulation 86: 1810-1818
- Ning XH, Zhang J, Liu J et al., 2000, Signaling and expression for mitochondrial membrane proteins during left ventricular remodeling and contractile failure after myocardial infarction. J Amer College Cardiol 36: 282-287
- O'Brien PJ, Gwathmey JK, 1995, Myocardial Ca²⁺- and ATP-cycling imbalances in end-stage dilated and ischemic cardiomyopathies. Cardiovasc Res 30: 394-404
- Portman MA, Xiao Y, Song Y et al., 1997, Expression of adenine nucleotide translocator parallels maturation of respiratory control in vivo. Am J Physiol 273: H1977-H1983
- Portmann MA, 2000, Adenine nucleotide translocator in heart. Mol Genet Metab 71: 445-450
- Portmann MA, Xiao Y, Qian K et al., 2000, Thyroid hormone coordinates respiratory control maturation and adenine nucleotide translocator expression in heart in vivo. Circulation 102: 1323-1329
- Post WS, Larson MG, Myers RH et al., 1997, Heritability of left ventricular mass: the Framingham Heart Study. Hypertension 30: 1025-1028
- Ruck A, Dolder M, Wallimann T et al., 1998, Reconstituted adenine nucleotide translocase forms a channel for small molecules comparable to the mitochondrial permeability transition pore. FEBS Lett 426: 97-101
- Schultheiss HP, 1992, Dysfunction of the ADP/ATP carrier as a causative factor for the disturbance of the myocardial energy metabolism in dilated cardiomyopathy. Basic Res Cardiol 87: 311-320
- Schultheiss HP, Schulze K, Schauer R et al., 1995, Antibody-mediated imbalance of myocardial energy metabolism. Circulation Res 76:64-72
- Schulze K, Heinemann FW, Schultheiss HP et al., 1999a, Impairment of myocardial calcium homeostasis by antibodies against the adenine nucleotide translocator. Cell Calcium 25: 361-370
- Schulze K, Witzendichler B, Christmann C et al., 1999b, Disturbance of myocardial energy metabolism in experimental virus myocarditis by antibodies against the adenine nucleotide translocator. Cardiovasc Res 44: 91-100
- Sharpe N, Doughty R, 1998, Epidemiology of heart failure and ventricular dysfunction. Lancet 352: 3-7
- Slim R, Levilliers J, Ludecke HJ et al., 1993, A human pseudoautosomal gene encodes the ANT3 ADP/ATP translocase and escapes X-inactivation. Genomics 16: 26-33
- Sollner T, Pfaller R, Griffiths G et al., 1990, A mitochondrial import receptor for the ADP/ATP carrier. Cell 62: 107-115

- Sokolikova B, Sabova L, Kissova I et al., 2000, A carbon-source-responsive element is required for regulation of the hypoxic ADP/ATP carrier (AAC3) isoform in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 352: 893-898
- Steger HF, Söllner T, Kiebler M et al., 1990, Import of ADP/ATP carrier into mitochondria: two receptors act in parallel. *J Cell Biol* 111: 2353-2363
- Stepien G, Torroni A, Chung AB et al., 1992, Differential expressions of adenine nucleotide translocator in mammalian tissues and during muscle cell differentiation. *J Biol Chem* 267: 14592-14597
- Swynghedauw B, Baillard C, 2000, Biology of hypertensive cardiopathy. *Curr Opin Cardiol* 15: 247-253
- Tan FL, Moravec CS, Li J et al., 2002, The gene expression fingerprint of human heart failure. *Proc Natl Acad Sci* 99: 11387-11392
- Vieira HL, Haouzi D, Hamel C et al., 2000, Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator. *Cell Death Differ* 7: 1146-1154
- Vyssokikh MY, Katz A, Rueck A et al., 2001, Adenine nucleotide translocator isoforms 1 and 2 are differently distributed in the mitochondrial inner membrane and have distinct affinities to cyclophilin D. *Biochem J* 358: 349-358
- Wiedemann N, Pfanner N, Ryan MT, 2001, The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria. *EMBO J* 20: 951-960
- World Health Organisation (1996) Physician guidelines (for GPS) designed to be translated and distributed worldwide to primary care physicians
- Yamashita, Yamauchi A, Miyai A et al., 1999, Differential regulation of adenine nucleotide translocators by hypertonicity in the brain. *J Neurochem* 72: 1259-1265
- Yan LJ, Sohal RS, 1998, Mitochondrial adenine nucleotide translocator is modified oxidatively during aging. *Proc Natl Acad Sci* 95: 12896-12901
- Ye Y, Wang C, Zhang J et al., 2001, Myocardial creatine kinase kinetics and isoform expression in hearts with severe LV hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: 376-386
- Zaid A, Hodny Z, Li R et al., 2001, Sp1 acts as a repressor of the human adenine nucleotide translocase-2 (ANT2) promoter. *Eur J Biochem* 268: 5497-5503
- Zimmermann R, Neupert W, 1980, Transport of proteins into mitochondria. Posttranslational transfer of ADP/ATP carrier into mitochondria in vitro. *Eur J Biochem* 109: 217-229

VII. DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. Hans Joachim Seitz für die Überlassung des Themas und die stets unkomplizierte, motivierende Betreuung in der Abteilung für Biochemische Endokrinologie.

Frau Dr. Kerstin Pioch danke ich für die Unterstützung in sämtlichen Fragen der Versuchsplanung und -durchführung, sowie für die konstruktiven Auseinandersetzungen im Verlauf der wissenschaftlichen Ausarbeitung.

Ich bedanke mich bei Frau Angelika Harneit, der hervorragenden technischen Assistentin, die in allen Laborfragen unabkömmlich war und stets Erfolge und Rückschläge mit mir teilte.

Für die Hilfe bei den immunhistologischen Abbildungen danke ich Herrn Dr. Karim Sultan

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wieland, Herrn Pregla und Frau Prof. Dr. Lockemann für die Bereitstellung der Proben. Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Schäfer für die Paraffinschnitte sowie für die Benutzung des Kryotoms und der Einarbeitung durch die Diplom-Biochemikerin Frau Beate Warnke.

Dankbar bin ich Olli und Steve für die Hilfe bei den Abbildungen sowie meinem Opa für das Korrekturlesen. Außerdem danke ich allen, die mich während der Arbeit motiviert oder abgelenkt haben – jetzt bin ich endlich fertig!

VIII. LEBENS LAUF

Name	Tanja Glause
geboren	am 08. Juni 1979 in Hamburg
1985 – 1989	Besuch der Grundschule Neuburgerweg in Hamburg
1989 – 1998	Besuch des Gymnasiums Heidberg in Hamburg
Juni 1998	Abitur
Oktober 1998	Beginn des Medizinstudiums an der Universität Hamburg
September 2000	Ärztliche Vorprüfung
November 2000	Beginn der Dissertationsarbeit im Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie in der Abteilung für Biochemische Endokrinologie bei Prof. Dr. H.-J. Seitz
März 2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 2003 – September 2004	Praktisches Jahr
Dezember 2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Eidesstattliche Versicherung

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

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