

Aus dem DHZB in Kooperation mit dem Institut für Geschlechterforschung in  
der Medizin (GIM)  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Regulation der Calcineurin Gene im menschlichen Herzen bei  
Myokardhypertrophie, ischämischer und  
dilatativer Kardiomyopathie

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von

Jan Christopher Baß

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. V. Regitz-Zagrosek  
2. Prof. Dr. Theuring  
3. Prof. Dr. med. Ch. Hengstenberg

Datum der Promotion: 03.09.2010

# Inhaltsverzeichnis

<b>A</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Calcineurin: Struktur von Gen und Protein</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Der calcineurinabhängige Signalweg im Herzen</b>	<b>7</b>
2.1	Aktivierung des Calcineurins	7
2.2	Aktivierung der NFAT-Proteine	8
<b>3</b>	<b>Die Rolle des Calcineurins in der kardialen Hypertrophie</b>	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>Hintergrund dieser Arbeit</b>	<b>13</b>
<b>B</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>15</b>
<b>1</b>	<b>Probenherkunft</b>	<b>15</b>
1.1	Probengewinnung	15
1.2	Patienten	15
1.2.1	Klinische und hämodynamische Parameter der Patienten	15
<b>2</b>	<b>Messung der m-RNA-Expression der Zielgene</b>	<b>17</b>
2.1	Homogenisation des Ausgangsmaterials für die m-RNA-Extraktion	18
2.2	RNA-Extraktion	18
2.3	DNase-Verdau	19
2.4	Reverse Transkription	20
2.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	20
2.5.1	Primer	20
2.5.2	Optimierung einer PCR	22
2.6	DNA-Sequenzanalyse	24
2.7	Protokolle und Primersequenzen	24
2.7.1	Protokoll der reversen Transkription	24
2.7.2	Protokoll der PCR	25
2.7.3	Primersequenzen	26
<b>3</b>	<b>Messung der Proteinexpression von Calcineurin A</b>	<b>28</b>
3.1	Homogenisation des Ausgangsmaterials für die Proteinextraktion	28
3.2	Proteinextraktion	28
3.3	Proteinmessung	29
3.4	Western Blot	30
3.4.1	Optimierung eines Western Blot	30
3.4.2	Gelelektrophorese	31
3.4.3	Blotten des Gels	32
3.4.4	Färben der Membranen	33
3.4.5	Hybridisieren mit primärem und sekundärem Antikörper	33
3.4.6	Chemilumineszenz	34
3.5	Protokolle und Lösungsansätze	35
3.5.1	Protokoll der Gelelektrophorese	35
3.5.2	Protokoll des Western Blot	35
3.5.3	Protokoll der Antikörperinkubation	35
3.5.4	Lösungsansätze	36
<b>4</b>	<b>Auswertung</b>	<b>38</b>
4.1	Quantitative Auswertung	38
4.1.1	mRNA-Expression	38
4.2	Semiquantitative Auswertung	39
4.2.1	Proteinexpression	39
4.3	Statistische Auswertung	40
<b>C</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
<b>1</b>	<b>Calcineurin A m-RNA</b>	<b>41</b>
1.1	Calcineurin A $\alpha$ , Spleissvarianten 1 und 2	41
1.1.1	Heraufregulation der m-RNA-Expression bei AS	41

1.1.2	Altersabhängigkeit der m-RNA-Expression in der Gruppe der DKMP	42
1.2	Calcineurin A $\alpha$ , Spleissvarianten 1, 2 und 3	43
1.2.1	Heraufregulation der m-RNA-Expression bei DKMP	43
1.2.2	Geschlechtsabhängigkeit der m-RNA-Expression in der Gruppe der AS	44
1.3	Calcineurin A $\beta$ , Spleissvariante 1	45
1.3.1	Heraufregulation der m-RNA-Expression bei AS und DKMP	45
1.3.2	Altersabhängigkeit der m-RNA-Expression in der Gruppe der DKMP	47
1.4	Calcineurin A $\beta$ , Spleissvarianten 1 und 2	48
1.4.1	Heraufregulation der m-RNA-Expression bei AS und DKMP	48
1.4.2	Altersabhängigkeit der m-RNA-Expression in der Gruppe der DKMP	49
1.5	ANP	50
1.5.1	Heraufregulation der m-RNA-Expression bei AS und DKMP	50
1.6	BNP	51
1.6.1	Heraufregulation der m-RNA-Expression bei AS, DKMP und IKMP	51
1.7	Korrelation der m-RNA-Expressionsdaten	53
1.7.1	Positive Korrelationen zwischen den Calcineurin A Spleissvarianten	53
1.7.2	Positive Korrelation zwischen ANP und BNP	57
1.7.3	Keine Korrelation zwischen Calcineurin A und ANP/BNP	58
1.8	Korrelation der m-RNA-Expressionsdaten mit klinischen Parametern	58
1.8.1	Positive Korrelation zwischen Calcineurin A und LVEF in der Gesamtgruppe	60
1.8.2	Positive Korrelation zwischen Calcineurin A und FS in der Gesamtgruppe	61
1.8.3	Negative Korrelation zwischen Calcineurin A und LVESD in der Gesamtgruppe	62
1.8.4	Negative Korrelation zwischen Calcineurin A und LVEDD in der Gesamtgruppe	63
1.8.5	Positive Korrelation zwischen Calcineurin A und dem Patientenalter in der Gesamtgruppe	64
1.8.6	Negative Korrelation zwischen CnA und dem Patientenalter in der Gruppe der DKMP	65
1.8.7	Positive Korrelation zwischen BNP und LVEDD in der Gruppe der AS	66
<b>2</b>	<b>Calcineurin A Protein</b>	<b>66</b>
2.1	Calcineurin A Proteinexpression	66
2.1.1	Keine Regulation der Proteinexpression	66
2.1.2	Keine Alters- und Geschlechtsunterschiede in der Proteinexpression von Calcineurin A	67
<b>3</b>	<b>Patientenalter</b>	<b>68</b>
3.1	Medikamentöse Therapie	69
<b>D</b>	<b>Diskussion</b>	<b>70</b>
<b>1</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse – Regulation der Calcineurintranskription</b>	<b>71</b>
1.1	Calcineurin A alpha	71
1.2	Calcineurin A beta	73
1.3	Hypertrophiemarker	74
1.4	Beziehungen zwischen den Expressionen und klinischen Parametern	75
<b>2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse – Calcineurin A Protein</b>	<b>76</b>
2.1	Calcineurin A	76
<b>3</b>	<b>Abschliessende Überlegungen</b>	<b>78</b>
<b>E</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>80</b>
<b>F</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>82</b>

# Abkürzungen

$\alpha$	alpha	Kal.	Kalibrator
ANP	atriales natriuretisches Peptid	KON	Kontrollen
AS	Aortenstenose		
AT-B	Angiotensin-Rezeptorblocker	LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
		LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
		LVESD	linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser
$\beta$	beta		
BNP	Brain Natriuretic Peptide		
Bp	Basenpaare	$\mu$	mikro
bzw.	beziehungsweise	m	milli
		min	Minute
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	m-RNA	Boten-Ribonukleinsäure
CnA	Calcineurin A	MW	Mittelwert
CnB	Calcineurin B		
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure	NFAT	nuclear factor of activated T cells
		NLS	nukleare Lokalisationssequenz
$\gamma$	gamma	n.s.	nicht signifikant
DAG	Diazylglyzerol	OD	optische Dichte
DNA	Desoxyribonukleinsäure		
DKMP	dilatative Kardiomyopathie	Pat.	Patient
		PCR	Polymerase Ketten Reaktion
Echo	Echokardiographie	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure		
EGTA	Ethylenglykol-bis-tetraacetatsäure	r	Korrelationskoeffizient nach Pearson
EKG	Elektrokardiogramm	RNA	Ribonukleinsäure
eR	endoplasmatisches Retikulum	RP	Reverse Primer
		rT	reverse Transkription
DTT	Dithiothreitol	RT	Raumtemperatur
		RT-PCR	Real-Time PCR
FP	Forward Primer		
FS	Fractional Shortening	SD	Standardabweichung
		SDS	Natrium-dodecyl-sulfat
g	Gramm	SEM	standard error of the mean
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase		
		TBS-T	Tris-buffered saline-TWEEN
h	Stunde	THI	terminale Herzinsuffizienz
HI	Herzinsuffizienz	T(a)	Annealingtemperatur
HK-Gen	Housekeeping-Gen	T(m)	Schmelztemperatur
HTX	Herztransplantation		
		ZG	Zielgen
IKMP	ischämische Kardiomyopathie		
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat		

## A Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen bedingen in der Europäischen Union 2000 mit mehr als vier Mio. fast die Hälfte aller Todesfälle [1]. Herzinsuffizienz ist eine der häufigsten kardiovaskulären Erkrankungen in Europa, deren Prävalenz auf mehr als 10 Mio. Betroffene angestiegen ist. Mitverantwortlich für die steigende Prävalenz der Herzinsuffizienz sind das Älterwerden unserer Bevölkerung („Alterspyramide“) und die steigende Lebenserwartung [2, 3]. Herzinsuffizienz ist ein komplexes Syndrom, das durch verschiedene strukturelle und funktionelle kardiale Störungen, die die Ventrikelfüllung oder den Blutausswurf beeinträchtigen, hervorgerufen wird.

Um trotz dieser Störungen die Pumpfunktion zu erhalten, treten verschiedene Kompensationmechanismen in Kraft. Früh wird das sympathische Nervensystem und die Salz- und Wasserrestriktion aktiviert, so dass zusammen mit der Aktivierung des kardialen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems am Herzen eine Vielzahl von extrazellulären Effektoren wirken, die einen als *Remodeling* bezeichneten Umbauprozess in Gang setzen [4, 5]. Dieser geht einher mit metabolischen, funktionellen und strukturellen Veränderungen, wie Reaktivierung eines fötalen Genprogramms und interstitieller Fibrose, und führt zur Hypertrophie des Herzens [4, 6-8]. Definiert ist die Hypertrophie als Vergrößerung eines Organs aufgrund einer Größenzunahme seiner Zellen ohne numerische Zunahme. Kernpunkt im Myozyten ist eine Erhöhung der Anzahl der Kraft generierenden Einheiten, der Sarkomere.

Klinisch von großer Bedeutung ist die Hypertrophie, weil sie in direktem Zusammenhang mit einem erhöhtem Risiko für die Entwicklung der Herzinsuffizienz und einem erhöhten altersangepassten Risiko für Gesamtmortalität steht [9]. Den Nachweis dieser Assoziation lieferte die Framingham Studie [10]. In dieser Studie wurde zum einen die Hypertrophie im EKG bzw. Echokardiogramm nachgewiesen und zum anderen über die Zeit die Häufigkeit der Entwicklung von Herzinsuffizienz gemessen [3]. So nimmt die Hypertrophie eine prognostisch sehr wichtige Stellung ein [7] und ist sogar alleinig der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung der Herzinsuffizienz [11].

Die häufigste Ursache für die Entstehung einer Herzinsuffizienz ist die ischämische Kardiomyopathie (IKMP), gefolgt von den valvulären Kardiomyopathien, während die idiopathischen Kardiomyopathien weniger häufig hierfür verantwortlich sind [6, 12, 13]. Hypertonus ist ein Hauptrisikofaktor für die Entstehung der ischämischen Kardiomyopathie,

die häufig mit einer konzentrischen Hypertrophie des Herzens einhergeht. Konzentrische Hypertrophie ist ebenfalls Merkmal der zweithäufigsten Herzklappenerkrankung, der Aortenklappenstenose. Die häufigste der idiopathischen Kardiomyopathien ist die dilatative Kardiomyopathie, die sich durch eine exzentrische Hypertrophie auszeichnet [14].

Neben den morphologischen Unterschieden zeigen diese drei kardialen Erkrankungen auch unterschiedliche Ausprägungen hinsichtlich ihrer Geschlechts- und Altersverteilung. Denn Geschlecht und Alter haben einen erheblichen Einfluss auf die Ventrikelfunktion und auf die Hypertrophie. Herzinsuffizienz mit normaler Ejektionsfraktion ist häufiger bei Frauen als bei Männern. Im Gegensatz zu Männern lassen sich bei Frauen auch häufiger nichtischämische Erkrankungen als Ursache ihrer Herzinsuffizienz nachweisen [12, 15, 16]. Arterielle Hypertonie kommt häufiger bei Frauen vor als bei Männern, und zusammen mit Adipositas und Diabetes mellitus führt dies zu unterschiedlichen Formen der Hypertrophie zwischen Männern und Frauen [17-19]. Weiterhin imponieren signifikante Geschlechtsunterschiede unter Patienten mit Herzinsuffizienz bezüglich der Epidemiologie, der Risikofaktoren, der klinischen Symptomatik und auch der Prognose [20-25].

Eine Gemeinsamkeit liegt darin, dass sie nach einer Phase der Kompensation in den Zustand der klinisch erkennbaren Dekompensation übergehen, der ohne ein adäquates pharmakologisches Kombinationsregime oder operative Intervention zum Tod durch terminale Herzinsuffizienz (THI) führt. Da neben diesen palliativen Maßnahmen als ultima ratio nur die Herztransplantation als Langzeittherapie zur Verfügung steht, wird durch die Erforschung der zugrundeliegenden molekularbiologischen Mechanismen untersucht, ob Therapieoptionen bestehen, die durch Beeinflussung dieser Mechanismen sogar die Entstehung von Herzinsuffizienz unterbinden können. So richtet sich seit der Arbeit von Molkentin et al. das Augenmerk auf die Proteinphosphatase Calcineurin [26]. Von Calcineurin ist seine Wirkungsweise in B- und T-Zellen bekannt [27, 28], und durch pharmakologische Inhibition im Tiermodell wurde erstmals ein Zusammenhang mit der Entstehung von Hypertrophie und Herzinsuffizienz hergestellt [26].

## **1 Calcineurin: Struktur von Gen und Protein**

Um die Wirkungsweise von Calcineurin und den molekularbiologischen Hintergrund für die folgenden Experimente nach zu vollziehen, ist es nötig, auf die Struktur und den Aufbau von Calcineurin als Gen und als Protein einzugehen.

Fast alle Aspekte des Zellebens sind reguliert durch reversible Proteinphosphorylierung, also durch Proteinkinasen und Proteinphosphatasen. Proteinphosphatasen sind definiert durch drei Genfamilien: die PPP-Familie (dazu gehören PP1, PP2A, PP2B), die PPM-Familie (dazu gehört PP2C) und die PTP-Familie, zwischen denen beträchtliche strukturelle Unterschiede durch die Anbindung spezifischer regulatorischer Untereinheiten an die jeweilige katalytische Untereinheit entstehen. Während die PTP-Familie für die Protein-Tyrosin-Phosphatasen kodiert, kodieren die PPP- und die PPM-Familie für die Serin-Threonin-Phosphatasen, zu denen auch Calcineurin gehört [29].

Je nachdem, ob sie die  $\beta$  oder die  $\alpha$  Untereinheit der Phosphorylasekinase dephosphorylieren, kann man die Serin/Threonin Proteinphosphatasen auch in Klasse 1 (PP1) oder Klasse 2 (PP2) einteilen. Die zur zweiten Klasse gehörenden Phosphatasen, die sich des Weiteren in ihrer Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen unterscheiden, sind die Proteinphosphatasen 2A (PP2A), 2B (PP2B oder Calcineurin) und 2C (PP2C). Sie alle sind essentiell für verschiedene Signaltransduktionswege in eukaryoten Zellen. Calcineurin ist als einzige der Serin/Threonin Phosphatasen charakterisiert durch seine Abhängigkeit von Kalzium und Calmodulin. Trotz der genannten Unterschiede gehören PP1, PP2A und PP2B (weiter oben als PPP-Familie bezeichnet) mit zu den am höchsten konservierten bekannten Enzymfamilien [30].

Calcineurin ist ein Heterodimer, bestehend aus den zwei Untereinheiten Calcineurin A und Calcineurin B. Die 19 kDa große, Kalzium bindende Untereinheit B wird auch regulatorische Untereinheit genannt, während die 58-59 kDa große A Untereinheit als katalytische Untereinheit bezeichnet wird. Diese Struktur aus 2 Untereinheiten ist einzigartig unter den Proteinphosphatasen. Alle der weiter unten aufgeführten Calcineurin A Gene kodieren für ein Polypeptid, das neben der n-terminalen katalytischen Domäne mit dem aktiven Zentrum c-terminal drei regulatorische Domänen enthält (Abbildung 1). Zu denen zählt die autoinhibitorische Domäne, die sich am weitesten c-terminal befindet und rapide abgetrennt wird durch limitierte Proteolyse. Die ebenfalls regulatorisch wirkende Calmodulin bindende Domäne befindet sich direkt daran angrenzend. Die dritte regulatorisch wirkende Calcineurin B bindende Domäne befindet sich zusammen mit der katalytischen Domäne auf einem 40 kDa großen Protease-resistenten Kern, der den Rest des Moleküls umfaßt [29, 30]. Hierbei herrscht strikte Konservierung von der Hefe bis zum Menschen, sowohl was den Aufbau aus katalytischer A und regulatorischer B Untereinheit als auch was die Calcineurin A Struktur aus einer katalytischen und drei regulatorischen Domänen angeht [31].

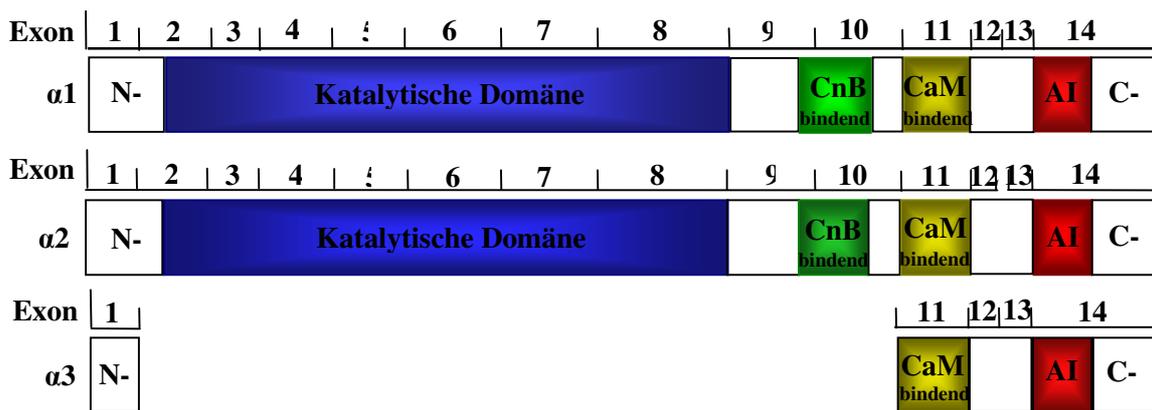


**Abbildung 1: STRUKTURELLE DOMÄNEN VON CALCINEURIN A:** schematische Darstellung der funktionellen Domänen der katalytischen Untereinheit von Calcineurin A; die katalytische Domäne von Calcineurin A wird inhibiert durch die autoinhibitorische Domäne (AI) nahe dem c-Terminus (C-); Regionen, die mit modulatorischen Proteinen assoziieren, sind die Calcineurin B (CnB) und die Calmodulin (CaM) bindende Domäne; n-Terminus (N-); die Numerierung entspricht der Anzahl an Aminosäuren (100-500).

Calcineurin A kommt in sehr vielen Geweben vor, wobei das Gehirn die höchste Konzentration enthält [32]. Im Herzen ist das Level der Calcineurinexpression höher als in Zellen des Immunsystems [5], während seine spezifische Aktivität in der Reihenfolge Gehirn, Milz, Hoden, Niere, Herz und Leber abnimmt [33]. Innerhalb der Zelle kann Calcineurin A sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern nachgewiesen werden.

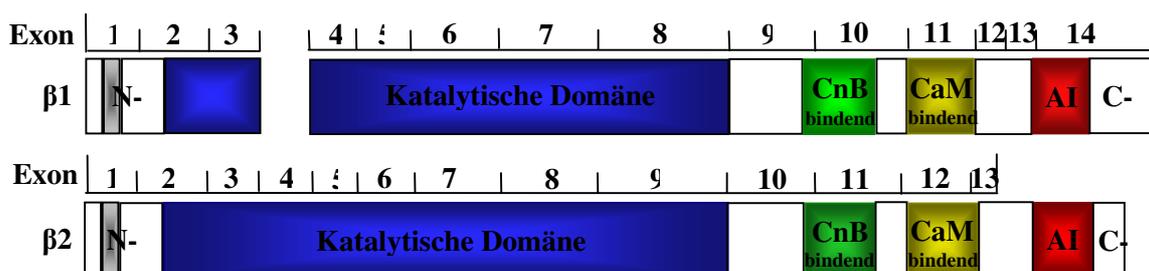
In Säugetieren kodieren drei unabhängige Genloci auf den Chromosomen 4q21-q24<sup>j</sup>, 10q21-q22<sup>j</sup> und 8<sup>l</sup> für Calcineurin A [30, 34]. Aus jeder dieser drei Isoformen ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ , alternativ auch PPP3CA, PPP3CB und PPP3CC genannt) können zusätzliche Varianten durch alternatives Spleissen entstehen. Bevor die mRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma gelangt, werden durch das Spleissen die Introns, die für das Protein nicht kodierende Sequenzen darstellen, entfernt und die verbleibenden Exons miteinander verbunden. Durch alternatives Spleissen können jedoch aus derselben mRNA unterschiedliche reife RNA-Versionen entstehen, die in der Translation zu unterschiedlichen Proteinen führen. Das Calcineurin A Gen enthält ungewöhnlich viele Introns. Eine bemerkenswerte Eigenschaft der Intron-Exon-Grenzen des Calcineurin A Gens ist deren Lokalisation an den Grenzen der funktionellen Domänen des Calcineurin Proteins und die Konservierung dieser Struktur von der Drosophila bis zum Menschen [35].

Von Calcineurin A  $\alpha$  sind mindestens drei Spleissvarianten bekannt (Abbildung 2) (Genbank Accession No NM\_000944). Calcineurin A  $\alpha$  1 und 2 bestehen aus 14 Exons und kommen fast ubiquitär vor [36]. Spleissvariante  $\alpha$  1 und  $\alpha$  2 sind 1.6 kB groß und unterscheiden sich in 30 Basenpaaren im Exon 13. Calcineurin A  $\alpha$  3 ist eine 450 Bp umfassende Spleissvariante, die die Exons 1 und 11 bis 14 des Gesamtgens repräsentiert [37].



**Abbildung 2: EXONSTRUKTUR DER SPLEISSVARIANTEN VON CALCINEURIN A ALPHA:** schematische Darstellung der funktionellen Domänen und der Exonstruktur der drei Spleissvarianten  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$  von Calcineurin A;  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  unterscheiden sich im Exon 13;  $\alpha 3$  besteht nur aus den Exonen 1 und 11 bis 14; die Numerierung entspricht der Anzahl an Exons.

Calcineurin A  $\beta 1$  besteht aus 14 Exons, und mindestens zwei Spleissvarianten sind bekannt (Genbank Accession No NM\_021132). Calcineurin A beta kommt fast ubiquitär vor und überwiegt gegenüber alpha im Herzmuskel [36, 38]. Calcineurin A  $\beta 2$  entsteht durch alternatives Spleissen mit dem Verlust sowohl des Exons, welches das 3'Ende von  $\beta 1$  beinhaltet, als auch des nächsten Introns, wodurch sich zum einen der c-Terminus verändert und eine komplett unterschiedliche 3'nichtkodierende Region entsteht. Gegenüber Calcineurin A  $\beta 1$  zeichnet sich Calcineurin A  $\beta 2$  zum anderen durch ein 54 Bp Insert aus, welches für 18 zusätzliche AS kodiert nahe dem n-Terminus (Abbildung 3) [39, 40].



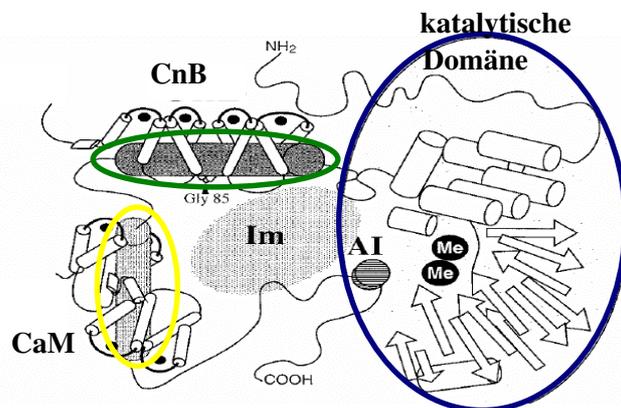
**Abbildung 3: EXONSTRUKTUR DER SPLEISSVARIANTEN VON CALCINEURIN A BETA:** schematische Darstellung der funktionellen Domänen und der Exonstruktur der beiden Spleissvarianten  $\beta 1$  und  $\beta 2$  von Calcineurin A; sie zeichnen sich durch unterschiedliche c-Termini aus und durch ein Insert von 18 Aminosäuren in der katalytischen Domäne von  $\beta 2$ ; die grau gekennzeichnete Region nahe dem n-Terminus steht für eine Polyprolinsequenz, die bei keiner der Calcineurin A  $\alpha$  Spleissvarianten vorhanden ist.

Calcineurin A  $\gamma$  ist die hodenspezifische Isoform, von der ebenfalls mindestens zwei Spleissvarianten bekannt sind [36, 41].

Die Homologie zwischen den Aminosäuresequenzen, für die die beiden Spleissvarianten  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  kodieren, liegt bei 100 %. Dem hypothetischen Protein, für das die Spleissvariante  $\alpha 3$  kodiert, fehlt die katalytische und die Calcineurin B bindende Domäne. Es besteht aus 145 Aminosäuren und enthält somit nur einen Teil der n-terminalen Domäne und der Calmodulin bindenden Domäne sowie die autoinhibitorische Domäne. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von  $\beta 1$  und  $\beta 2$  zeigt zwei Unterschiede: Zum einen ist  $\beta 1$  etwas kleiner als  $\beta 2$  (58 und 59 kDa respektive) durch ein Insert von 18 Aminosäuren in  $\beta 2$ , und zum anderen besitzen sie unterschiedliche c-Termini. Eine charakteristische Eigenschaft der beiden  $\beta$  Spleissvarianten ist eine Polyprolinsequenz nahe dem n-Terminus, welche bei  $\alpha$  fehlt [39]. Neben den genannten Unterschieden bestehen entlang der funktionellen Domänen sehr hohe Ähnlichkeiten zwischen den Proteinen der drei Isoformen. So herrscht bei der katalytischen Domäne eine Sequenzhomologie von 81% [36]. Zwischen Maus und Menschenspezies weisen Calcineurin A  $\alpha$  und A  $\beta$  eine Sequenzhomologie der Aminosäuren von 99 % auf, was eine enge evolutionäre Selektion vermuten läßt [36].

Die Tertiärstruktur von Calcineurin A (Abbildung 4) besteht aus einer Mischung von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblattstrukturen [30, 42]. Die katalytische Domäne liegt in einer Falte aus  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Dadurch befindet sich das katalytische Zentrum in einem flachen Kanal. Aminosäurereste an den Windungen sind verantwortlich für die Koordination des Metallionenpaares, so dass dieses ein binukleäres Metallzentrum aus  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  formt. Die c-terminale Region von Calcineurin

A scheint besonders wichtig zu sein für die Kommunikation von regulatorischen Signalen an das aktive Zentrum. Calcineurin B bindet an die Calcineurin B bindende Helix von Calcineurin A, direkt c-terminal von der katalytischen Phosphatase Region. Die autoinhibitorische Domäne liegt über dem Substrat bindenden Kanal der katalytischen Domäne, so daß sie räumlich die Substratbindung behindert [29, 31, 43].



**Abbildung 4: TERTIÄRE STRUKTUR VON CALCINEURIN:** vereinfachte Darstellung der tertiären Struktur von CnA; die katalytische Domäne ist blau, die Calcineurin B bindende Domäne, umgeben von CnB, grün und die Calmodulin (CaM) bindende Domäne, umgeben von CaM, gelb umrandet; in der Mitte die autoinhibitorische Domäne (AI) und Cyclosporin A (Im); die beiden Metallionen (Me) Zink und Eisen sind im aktiven Zentrum lokalisiert; vier schwarze Punkte als Kalziumionen; Zylinder stellen  $\alpha$ -Helices und Pfeile  $\beta$ -Faltblattstrukturen dar.

## 2 Der calcineurinabhängige Signalweg im Herzen

Im folgenden sollen die einzelnen Schritte der Calcineurinaktivierung im Kardiomyozyten dargestellt werden, die mit einer rezeptorvermittelten Kalziumerhöhung beginnt und sich über die Calcineurinaktivierung und die Aktivierung der nuklearen Faktoren von aktivierten T-Zellen (NFAT-Proteine) verändernd auf die Genexpression auswirkt.

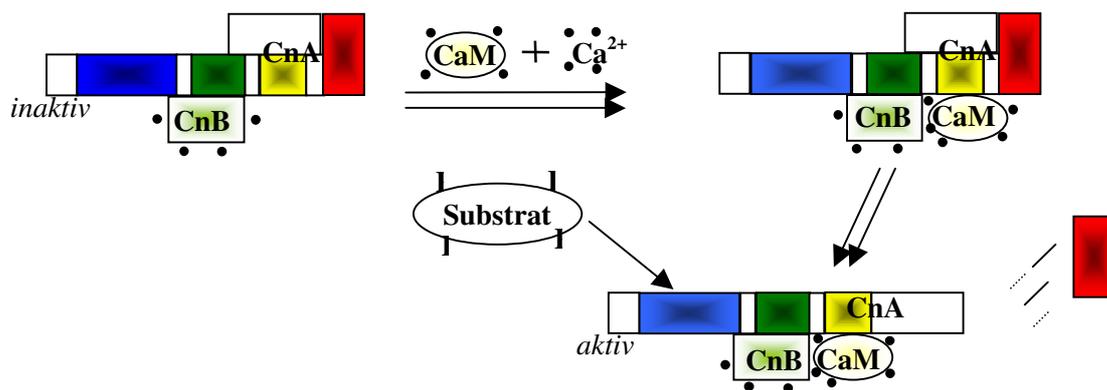
### 2.1 Aktivierung des Calcineurins

Verschiedene hypertrophe Stimuli und Agonisten wie Angiotensin II, Phenylephrin, Endothelin I und biomechanischer Stress wirken sich auf den intrazellulären Kalziumhaushalt aus (Abbildung 6). An der Zelloberfläche lokalisierte Rezeptortyrosinkinasen vermitteln diese Signale und aktivieren die Phospholipase C gamma, während G-Protein gekoppelte Rezeptoren die Phospholipase C beta aktivieren. Die Phospholipase generiert Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>), wonach sich der Signalweg zweiteilt. Einerseits bindet das IP<sub>3</sub> an entsprechende Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums (eR) und bewirkt durch eine Speicherentleerung eine kurze Kalziumerhöhung. Durch einen noch ungeklärten Zusammenhang triggert diese Speicherentleerung einen anhaltenden Prozess des „Speicher gesteuerten“ Kalzium Eintritts durch CRAC Kanäle (calcium release-activated calcium channel) in der Plasmamembran. Dieser Kalziumanstieg aktiviert mehrere Calmodulin abhängige Enzyme, wie auch die Phosphatase Calcineurin [44, 45].

Calcineurin ist vor allem durch seine spezifische Ansprechbarkeit auf anhaltende, niedrig frequentierte Kalziumsignale charakterisiert [11, 46, 47], und es bedarf eines kontinuierlichen Kalziumanstiegs, damit der Komplex aus Calcineurin und seinem Substrat aktiviert bleibt [48]. Calcineurin A alleine hat nur eine sehr niedrige Aktivität, und die enge Bindung von Calcineurin B und Calmodulin, beides kalziumbindende Proteine, ist essentiell für die hochspezifische Aktivität der Phosphatase [49].

Bei submikromolaren Kalziumkonzentrationen ist das zum einen benötigte Calcineurin B schon fest an Calcineurin A gebunden. Hierdurch kommt es zu einem Konformationswechsel, so dass die Calmodulin bindende Domäne freigelegt wird. Das zum anderen benötigte Calmodulin ist bei sehr niedrigen Kalziumkonzentrationen noch nicht an den Komplex gebunden, und das aktive Zentrum wird durch die autoinhibitorische Domäne blockiert. Bei einer Erhöhung der Kalziumkonzentration bindet Kalzium ebenfalls an Calmodulin, wodurch die Interaktion mit Calcineurin A erleichtert wird und reversibel die autoinhibitorische

Domäne proteolytisch abgespalten wird und nicht länger das aktive Zentrum blockiert (Abbildung 5). Die kalziumabhängige Calmodulinbindung ist der Auslöser eines weiteren Konformationswechsels von Calcineurin, wodurch nicht nur seine Phosphataseaktivität sondern auch seine Affinität zu den NFAT-Proteinen verstärkt wird [50, 51]. Mit steigender Calmodulinkonzentration sinkt die benötigte Kalziumkonzentration und umgekehrt [31]. Beendet wird die intrazelluläre Kalziumerhöhung durch kalziumbindende Proteine und durch Kalzium ATP-asen im eR und in der Plasmamembran, die Kalzium sowohl in die Speicher des eR als auch aus der Zelle heraus pumpen [44].



**Abbildung 5: CALCINEURINAKTIVIERUNG:** Darstellung der Konformationsänderung von Calcineurin A (CnA) bei Aktivierung durch Calcineurin B (CnB), Calmodulin (CaM) und Kalzium ( $Ca^{2+}$ ); in unstimulierten Zellen bildet Calcineurin ein Heterodimer aus CnA und CnB in einer stabilen aber inaktiven Konformation; ein Anstieg des intrazellulären Kalziumlevels aktiviert Calmodulin, welches dann an Calcineurin A bindet; dadurch wird die Abspaltung der autoinhibitorischen Domäne induziert, so dass Calcineurin A Zugang zu seinem Substrat bekommt; Kalzium als schwarze Punkte; Phosphat (P).

## 2.2 Aktivierung der NFAT-Proteine

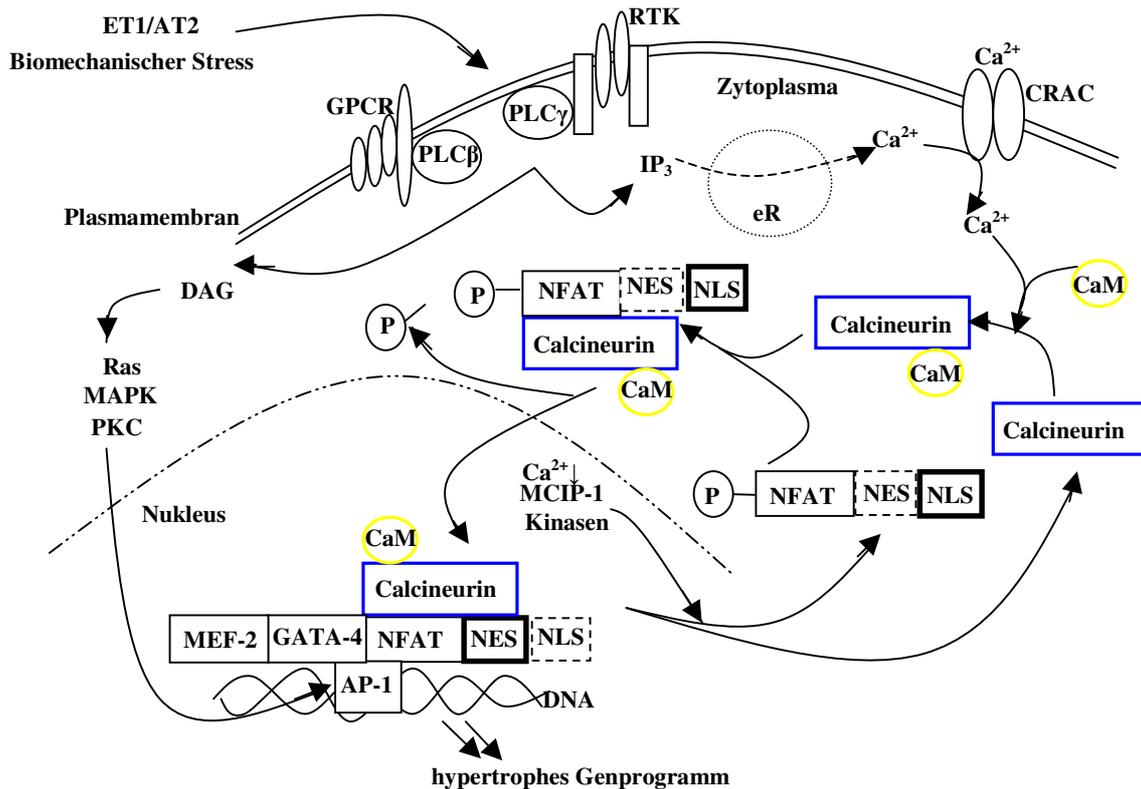
Die am besten charakterisierten Ziele von Calcineurin sind die NFAT-Proteine. Fünf NFAT-Proteine wurden bislang beschrieben, von denen vier (c1 bis c4) durch calcineurinvermittelte Dephosphorylierung reguliert sind, während NFATc5 konstitutiv nuklear ist und nicht unter der Kontrolle von Calcineurin steht [36, 44, 52, 53]. Proteine, die zur Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren gehören, spielen eine zentrale Rolle in der induzierbaren Gentranskription. Trotz ihres Namens kommen sie nicht nur in T-Zellen sondern in sehr vielen Geweben vor. Die NFAT-Aktivierung, die präzise der Calcineurinaktivierung folgt, gliedert sich in drei Schritte: 1) Dephosphorylierung 2) nukleare Translokation und 3) erhöhte Affinität zur DNA. Mechanistisch gesehen bleiben die NFAT-Proteine unstimulierter Zellen im Zytoplasma in einem hyperphosphorylierten Stadium und zeigen eine niedrige Affinität zur DNA. NFAT-Proteine sind eng assoziiert mit Calcineurin, und diese Assoziation scheint unabhängig vom Phosphorylationsstatus der NFAT-Proteine zu sein. Die Dephosphorylierung

durch Calcineurin erlaubt es NFAT, in den Nukleus zu translozieren, immer noch im Komplex mit Calcineurin (Abbildung 6) [54, 55].

1) Aktiviertes Calcineurin bindet phosphorylierte NFAT-Proteine n-terminal ihrer DNA-bindenden Sequenz an einer hochkonservierten Region des Proteins, die als calcineurinaktivierte, regulatorische Domäne fungiert. Die dort vorhandenen Serinreste werden direkt durch Calcineurin dephosphoryliert. Diese direkte und unkonventionelle Interaktion zwischen der Phosphatase und seinem Substrat außerhalb des enzymatischen Zentrums hat eine erstaunlich spezifische Bindung zur Folge.

2) Durch die Dephosphorylierung wird die nukleare Lokalisationssequenz (NLS) der NFAT-Proteine freigelegt und die NFAT-Proteine translozieren mit Calcineurin in den Nukleus, wo sie aufgrund der persistierenden Erhöhung des intrazellulären Kalziums und der kontinuierlichen Calcineurinaktivität verbleiben [46, 54, 56]. Für Calcineurin selber gibt es kein nukleares Translokationssignal [49]. Die persistierende Calcineurinaktivität wird benötigt, weil andernfalls die NFAT-Proteine durch Kinasen rapide rephosphoryliert und wieder aus dem Nukleus entfernt würden. Die Aktivierung der NFAT-Proteine ist somit ein dynamisches und kontinuierliches Spiel zwischen Calcineurin und konstitutiv aktiven Kinasen.

3) Die Dephosphorylierung ist Bedingung für den nuklearen Import und wahrscheinlich auch für die optimale DNA-Bindung. Im Vergleich zu den phosphorylierten zeigen die dephosphorylierten NFAT-Proteine eine erhöhte Affinität zur DNA [56]. Zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren bewirken die NFAT-Proteine dann im Nukleus eine Umprogrammierung der Genexpression mit einem deutlichen Anstieg von hypertrophie-assoziierten Genen wie  $\beta$ -Myosin schwere Kette ( $\beta$ -MHC) und den natriuretisch wirkenden Peptiden ANP und BNP [26, 57].



**Abbildung 6: DER CALCINEURIN-SIGNALWEG: theoretisches Modell der Kaskade mit Kalzium, Calcineurin und dem NFAT-Aktivierungszyklus in der Myokardzelle: Rezeptoren an der Zelloberfläche vermitteln hypertrophe Signale; über einen Kalzium getriggerten Kalziumanstieg wird Calcineurin aktiviert; Calcineurin bindet NFAT, dephosphoryliert es und beide translozieren in den Nukleus, wo sie zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren durch Bindung an die Zielgene ein hypertrophes Genprogramm induzieren; durch ein Absinken des Kalziumspiegels, die Wirkung von rephosphorylierenden Kinasen und die Wirkung des endogenen Calcineurininhibitors MCIP-1 (myocyte-enriched calcineurin interacting protein) kommt es zum nuklearen Export des Calcineurin-NFAT-Komplexes; Endothelin-1 (ET-1); Angiotensin-2 (AT2); G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR); Rezeptortyrosinkinase (RTK); Phospholipase C  $\beta/\gamma$  (PLC  $\beta/\gamma$ ); Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>); endoplasmatisches Retikulum (eR); calcium release-activated calcium channel (CRAC); nukleares Exportsignal (NES); nukleare Lokalisationssequenz (NLS); Phosphat (P); Diazylglycerin (DAG); MAP-Kinasen (MAPK); Proteinkinase C (PKC); myocyte enhancer factor 2 (MEF-2); activation protein-1 (AP-1).**

Calcineurin scheint nicht nur den nuklearen Import der NFAT-Proteine zu induzieren, sondern auch deren Export zu blockieren, wofür Calcineurins Bindung und nicht seine Phosphataseaktivität verantwortlich sein soll [55]. Damit steht auch der nukleare Export der NFAT-Proteine unter calcineurinvermittelter Kalziumkontrolle, indem Calcineurin die nuklearen Exportsignale auf den NFAT-Proteinen maskiert. Aktiviertes Calcineurin fördert so die transkriptionale Aktivität der NFAT-Proteine nicht durch die Induktion ihres nuklearen Imports, sondern durch die Unterdrückung des Exports. Das bedeutet, dass diese Unterdrückung durch die Calcineurinbindung Vorbedingung ist für die Formation eines effektiven NFAT-Transkriptionskomplexes. Die NFAT-Proteine entgehen so einem nutzlosen Zyklus, indem sie die Aktivierung des Importsignals mit der Unterdrückung des

Exportsignals verkoppeln. Im Falle einer Calcineurininhibition z. B. durch Zyklosporin werden die NFAT-Proteine rephosphoryliert und verlassen rasch den Nukleus, was auch das Ende für die NFAT-abhängige Genexpression bedeutet. Als ein Resultat dieser absoluten Abhängigkeit vom  $\text{Ca}^{2+}$ /Calcineurin-Signal haben die NFAT-Proteine eine erstaunliche Fähigkeit, dynamische Wechsel der intrazellulären Kalzium-Level und Frequenzen der Kalzium-Oszillationen in Zellen wahrzunehmen [44]. Die transkriptionale Aktivität der NFAT-Proteine kann hierbei entweder aktivierend oder deaktivierend sein, abhängig von ihren Bindungspartnern, wie AP-1 (activation protein-1), MEF-2 (myocyte enhancer factor 2) oder GATA-4 [58].

Denn andererseits führt die oben erwähnte  $\text{IP}_3$ -Generierung auch zur Bildung von Diazylglyzerol (DAG), welches wiederum Ras, MAP-Kinasen und die Proteinkinase C aktiviert. Die Aktivierung der MAPKinasen führt zur Bildung und Aktivierung von Fos und Jun, den beiden Komponenten des Transkriptionsfaktors AP-1. Um die Bindung der NFAT-Proteine an die DNA zu stärken, interagieren sie dabei sowohl mit AP-1 als auch mit GATA-4 und MEF-2. Dieser Komplex aus NFAT und AP-1 dient somit als Integrator zweier diametral unterschiedlicher Signalwege: dem Kalzium-Calcineurin-Signalweg, der NFAT aktiviert, und dem MAPKinase-Signalweg, der die Synthese und Aktivierung von Fos und Jun Proteinen fördert [11, 43, 44, 59]. Zusätzlich existiert ein negativer Rückkopplungsmechanismus, demzufolge aktiviertes Calcineurin die Transkription für das MCIP-1 Gen (myocyte-enriched calcineurin interacting protein), einem endogenen Calcineurininhibitor, induziert, um Zellen vor den zerstörerischen Konsequenzen ungehinderter Calcineurinaktivität zu schützen [60-62].

### **3 Die Rolle des Calcineurins in der kardialen Hypertrophie**

Aufbauend auf der These von Molkenkin et al. und dem postulierten Signalweg, der über mehrere Stufen mit Calcineurin als Mittelpunkt zu kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz führt [26], ergeben sich zahlreiche neue Ansatzmöglichkeiten. Es wurden Patienten in verschiedenen Krankheitsstadien der Herzinsuffizienz auf Calcineurin untersucht und im Tiermodell unterschiedliche Calcineurininhibitoren eingesetzt bei Hypertrophie, die operativ, medikamentös oder durch Genmanipulation induziert war, um die vielversprechende neue Rolle Calcineurins zu bestätigen und weiter zu evaluieren. Eine Zusammenstellung dieser Studien lieferten Wilkins et al. [43].

So untersuchten Lim et al. in einigen aufgearbeiteten linksventrikulären Proben von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz (THI) unterschiedlicher Ätiologie aktiviertes, also mit Calmodulin koimmunpräzipitiertes Calcineurin im Western Blot und maßen im Vergleich zu Kontrollproben eine Heraufregulation auf 400 % [63]. Eine ähnliche Versuchsreihe von Tsao et al. mit Myokardproben von Patienten mit THI deutete ebenfalls auf eine Heraufregulation von aktiviertem Calcineurinprotein im Vergleich zu Kontrollproben hin [38]. Die mittels eines Phosphatase-Essays gemessene Calcineurinaktivität in Proben von Patienten mit THI zeigte im Vergleich zu Kontrollproben ebenfalls eine signifikante Heraufregulation [64, 65]. Bei einer Gruppe von acht Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie wurde nicht nur die Heraufregulation der Calcineurinaktivität auf 180% sondern auch die unterschiedliche subzelluläre Verteilung der Transkriptionsfaktoren NFAT3 und GATA4 nachgewiesen [66], während Burkard et al. sogar eine deutliche nukleare Anreicherung von Calcineurin sowohl bei Patienten mit kompensierter Herzinsuffizienz als auch bei Patienten mit (THI) entdecken konnten [67]. Später wurden in Proben von Patienten mit Hypertrophie aufgrund von Aortenklappenstenose signifikant erhöhte Werte sowohl für die Calcineurinaktivität als auch für den Proteingehalt gemessen [68].

Durch verschiedene Nagetiermodelle wurden weitere Hinweise geliefert, die Calcineurins Rolle in der Entstehung kardialer Hypertrophie unterstreichen. Nach Hypertrophieinduktion durch Abbinden der abdominalen Aorta wurden erhöhte Werte gemessen für die Calcineurinaktivität und -proteinmenge, und durch Calcineurininhibition mit Zyklosporin A wurde die Hypertrophieentwicklung aufgehalten und zum Teil sogar zurückgebildet [69-73]. In einem anderen Modell mit hämodynamisch überlasteten Mäusen mit konsekutiver Hypertrophie wurden erhöhte mRNA-Werte für die beiden Hypertrophiemarker ANP und BNP und das Calcineurin A  $\beta$  Gen gemessen [74].

Genmanipulationen am Nager erzeugten konstitutiv aktive Formen von Calcineurin, Calmodulin und NFAT3. Bei allen Varianten konnte durch Ausbildung einer Hypertrophie in vivo die Bedeutung erhöhter Aktivität einzelner Faktoren des Calcineurin-NFAT-Signalwegs in kardialer Hypertrophie weiter hervorgehoben werden [11, 26, 75-77]. Ebenso wurden Nager mit einer konstitutiv inaktiven Form von Calcineurin oder gezielter Störung des Calcineurin- oder NFAT-Gens generiert, die trotz Hypertrophieinduktion durch Abbinden der abdominalen Aorta oder eines konstitutiv aktiven Calcineurins keine oder nur eine abgeschwächte kardiale Hypertrophie entwickelten [78-83].

Diese Versuchsergebnisse bekräftigen Molzentins These von der Wirkungsweise des Calcineurins in der Entstehung kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz. Durch Betonung oder Inhibition der Calcineurinaktivität konnte Hypertrophie induziert oder abgeschwächt werden. Durch die Möglichkeit des Eingriffs auf verschiedenen Ebenen der Signaltransduktion kamen immer mehr richtungsweisende Beweise für die Richtigkeit dieser Signalkette zusammen, aber auch Hinweise dafür, dass sie nicht alleinig verantwortlich sein kann, sondern parallel und in Vernetzung mit anderen Signalketten und anderen Transkriptionsfaktoren wirkt [84-86].

Für die noch nicht erwähnten Versuchsreihen anderer Labore, deren Ergebnisse an der Richtigkeit des Calcineurin-NFAT-Signalwegs Zweifel aufkommen lassen [70, 87, 88], gibt es bislang Erklärungsversuche, die den Versuchsaufbau und die Konzentrationen der eingesetzten Reagentien und deren unerwünschte Nebenwirkungen am Tier verantwortlich machen [89]. Dadurch wurde nicht etwa die Hoffnung auf neue Therapiemöglichkeiten von Herzkrankheiten zerstört, sondern viel mehr ist in dem Widerspruch von Forschungsergebnissen die Notwendigkeit zu erkennen, keine voreiligen Schlüsse zu ziehen, bevor nicht alle Gegenargumente entkräftet und eine möglichst lückenlose Beweisführung vorliegt.

## 4 Hintergrund dieser Arbeit

Zahlreiche Aspekte verdeutlichen die aktuelle medizinische und gesundheitspolitische Bedeutung von Herzkreislauferkrankungen. Herzkreislauferkrankungen führen nicht nur die Todesursachen-, sondern auch die Krankheitskostenstatistik an [90]. Einem Mangel an Spenderherzen für eine steigende Anzahl bedürftiger terminal herzinsuffizienter Patienten und einer weiter sinkenden Anzahl jährlich durchgeführter Herztransplantationen in Deutschland (355 im Jahr 2004) steht ein vermehrter Einsatz sog. Kunstherzen gegenüber [91]. Die Schlüsselrolle der kardialen Hypertrophie in der Pathogenese der Herzkrankheit unterstreicht den Nutzen der Identifizierung der zellulären und molekularen Mechanismen, die für die kardiale Hypertrophie und das Voranschreiten zur Herzinsuffizienz verantwortlich sind [92]. Somit rücken nicht nur die Prävention und Früherkennung der Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz, sondern auch die Suche nach neuen Therapiemethoden weiter in den Vordergrund. Ihre Entstehung beruht auf einem Zusammenspiel verschiedener Faktoren, die zum Beispiel über Kalzium und Transkriptionsfaktoren Einfluß nehmen auf die kardiale Genexpression. Die Entdeckung, dass Calcineurin eine zentrale Rolle in einem dieser Signalwege spielt, gibt Impulse für neue Therapiansätze.

Bisher konnten in geringem Umfang Proben von menschlichem Myokard im Hinblick auf Calcineurin untersucht werden. Diese untersuchten die Proteinaktivität von Calcineurin, und mit einer Ausnahme wurden Proben von Patienten im Endstadium mit Herzversagen gemessen. Daher gewähren die vorliegenden Ergebnisse noch keinen mechanistischen Einblick in die Regulation von Calcineurin und in Calcineurins Rolle beim Übergang von kompensierter kardialer Hypertrophie zur terminalen Herzinsuffizienz. Findet die Regulation von Calcineurin auf Ebene der mRNA, auf Proteinebene oder als Aktivitätskontrolle statt? Welche Rolle spielen die unterschiedlichen Spleissvarianten von Calcineurin A  $\alpha$  und  $\beta$  in Gruppen von Patienten, die sich in verschiedenen Entwicklungsstadien der Herzinsuffizienz befinden? Besteht eine Beziehung zwischen der Expression von Calcineurin zu der Expression der Hypertrophiemarker? Besteht eine Beziehung zwischen der Gen- und Proteinexpression von Calcineurin und den Hypertrophiemarkern zu den klinischen Parametern, insbesondere auch zu Alter und Geschlecht?

Um signifikante Regulationen von Calcineurin und den beiden Hypertrophiemarkern ANP und BNP zu reproduzieren, sollten die Proben der Patienten verglichen werden mit solchen von Herzen mit normaler Pumpfunktion. Auf den Ebenen der Gen- und Proteinexpression konzentrierten sich die Nachforschungen darauf, Korrelationen aufzudecken zwischen der Calcineurinexpression und der Expression der beiden Hypertrophiemarker ANP und BNP, als auch unter den Spleissvarianten selber. Ebenso sollten mit Kenntnis der klinischen Parameter der Patienten mögliche Korrelationen festgestellt werden zu den gemessenen Expressionsdaten vor allem mit der Frage nach Alters- und Geschlechtsunterschieden.

## B Material und Methoden

### 1 Probenherkunft

Die Proben stammten entweder von Herzen von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz oder Aortenklappenstenose oder von den Herzen potentieller Spender, die als Donor aus technischen Gründen abgelehnt wurden. Bei den Herzen potentieller Spender lagen normale systolische Funktion, keine kardiale Anamnese und nach der Explantation eine unauffällige Histologie vor. Die Probenentnahme erfolgte nach ausführlicher mündlicher und schriftlicher Aufklärung der Patienten. Die Studie befolgte die ethischen Grundsätze für die medizinische Forschung am Menschen, wie sie in der Deklaration des Weltärzteverbandes von Helsinki verabschiedet wurden.

#### 1.1 Probengewinnung

Herzmuskelgewebe des linken Ventrikels wurde bei orthotopen Herztransplantationen von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz aufgrund dilatativer und ischämischer Kardiomyopathie gewonnen. Den Patienten mit Aortenstenose wurden im Rahmen ihrer elektiven Aortenklappenersatz-OP mittels Biopsie kleine Gewebeproben des linksventrikulären Septums entnommen. Das Gewebe der nicht transplantierten Herzen wurde ebenfalls dem linken Ventrikel entnommen. Demgegenüber wurden von den transplantierten Herzen keine Proben entnommen. Direkt nach der Probengewinnung wurden die Proben jeweils auf bis zu sechs Kryoröhrchen verteilt und bis zu ihrer Aufarbeitung in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### 1.2 Patienten

Die Patienten wurden in drei Gruppen aufgeteilt. Zur ersten Gruppe gehörten Patienten mit Aortenklappenstenose, die zweite Gruppe setzte sich zusammen aus Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz aufgrund von dilatativer Kardiomyopathie, und zur dritten Gruppe gehörten Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz aufgrund von ischämischer Kardiomyopathie. Als Kontrollen dienten die gesunden Herzen potentieller Spender, die tödlich verunfallt oder an intrakraniellen Blutungen verstorben waren (Tabelle 1).

##### 1.2.1 Klinische und hämodynamische Parameter der Patienten

Anhand der Patientendokumentation wurden die klinischen und hämodynamischen Parameter für jeden untersuchten Patienten zusammen getragen und für jede Gruppe bzw. Untergruppe

zusammengefaßt und ausgewertet. Um die Gruppe der Aortenstenosen geschlechtsspezifisch und die Gruppe der dilatativen Kardiomyopathie altersspezifisch zu analysieren, erfolgte hier die Darstellung weiter unterteilt nach Männern und Frauen bzw. nach Patienten jünger und älter als 40 Jahre (Tabelle 2). Die hämodynamischen Daten stammten aus der letzten echokardiographischen Untersuchung vor der Transplantation bzw. vor der Aortenklappenersatz-OP.

	KON	AS	DKMP	IKMP
<b>n</b>	15	14	27	7
<b>Alter</b> (Jahren)	47 ± 4	67 ± 3	45 ± 2	60 ± 2
<b>RR syst.</b> (mmHg)	124 ± 6	126 ± 7	127 ± 4	112 ± 6
<b>LVEF</b> (%)	-	43 ± 6	17 ± 2	21 ± 1
<b>FS</b> (%)	-	26 ± 3	11 ± 1	14 ± 3
<b>LVESD</b> (mm)	-	43 ± 4	67 ± 2	59 ± 5
<b>LVEDD</b> (mm)	-	58 ± 3	75 ± 2	71 ± 4
<b>RVEF</b> (%)	-	53 ± 2	35 ± 2	47 ± 4
<b>δp<sub>mean</sub></b> (mmHg)	-	48 ± 3	-	-
<b>Septum</b> (mm)	-	12 ± 1	9 ± 1	7 ± 1
<b>Diuretika</b>	-	79 %	96 %	100 %
<b>ACE-H/AT-B</b>	-	57 %	93	71 %
<b>BB</b>	-	43 %	89 %	57 %
<b>DM/HT</b>	0/2	5/7	3/6	2/3
<b>Tu: SHT/ICB/S</b>	4/8/1	-	-	-

**Tabelle 1: KLINISCHE UND HÄMODYNAMISCHE DATEN DER PATIENTEN:** die Daten (in MW ± SEM) sind für die vier Gruppen einzeln dargestellt: Kontrollen (KON); Aortenstenose (AS); dilatative Kardiomyopathie (DKMP); ischämische Kardiomyopathie (IKMP); systolischer Blutdruck (RR syst.); linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF); rechtsventrikuläre Ejektionsfraktion (RVEF); linksventrikulärer enddiastolischer Diameter (LVEDD); linksventrikulärer endsystolischer Diameter (LVESD); fractional shortening (FS); mittlerer Druckgradient über der Aortenklappe (δp<sub>mean</sub>); ACE-Hemmer (ACE-H); Angiotensin-Rezeptorblocker (AT-B); Diabetes mellitus (DM); Hypertonus (HT); Todesursache (Tu); Schädel-Hirn-Trauma (SHT); intrakranielle Blutung (ICB); Suizid (S).

	AS		DKMP	
weiblich	W	M	< 40 J	>40 J
<b>n</b>	7	7	7	20
<b>Alter</b> (Jahren)	66 ± 5	68 ± 2	33 ± 3	50 ± 1
<b>RR syst.</b> (mmHg)	118 ± 11	135 ± 7	134 ± 4	124 ± 6
<b>LVEF</b> (%)	57 ± 6	27 ± 2	13 ± 1	19 ± 2
<b>FS</b> (%)	33 ± 4	19 ± 3	9 ± 2	12 ± 2
<b>LVESD</b> (mm)	35 ± 4	51 ± 5	72 ± 4	65 ± 3
<b>LVEDD</b> (mm)	52 ± 3	64 ± 4	78 ± 4	73 ± 2
<b>RVEF</b> (%)	54 ± 3	50 ± 0	30 ± 5	37 ± 3
<b>δp<sub>mean</sub></b> (mmHg)	50 ± 3	45 ± 6	-	-
<b>Septum</b> (mm)	13 ± 1	12 ± 1	8 ± 1	9 ± 1
<b>Diuretika</b>	71 %	86 %	86 %	100 %
<b>ACE-H/AT-B</b>	43 %	71 %	100 %	90 %
<b>BB</b>	43 %	43 %	86 %	90 %
<b>DM/HT</b>	4/4	1/3	0/3	3/3

**Tabelle 2: KLINISCHE UND HÄMODYNAMISCHE DATEN DER PATIENTEN IN ALTERS- UND GESCHLECHTSSPEZIFISCHER AUFTEILUNG der Gruppe mit Aortenstenose (AS) und in der Gruppe mit dilatativer Kardiomyopathie (DKMP) respektive (in MW ± SEM); weiblich (W); männlich (M); systolischer Blutdruck (RR syst.); linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF); rechtsventrikuläre Ejektionsfraktion (RVEF); linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (LVEDD); linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser (LVESD); fractional shortening (FS); mittlerer Druckgradient über der Aortenklappe ( $\delta p_{\text{mean}}$ ); ACE-Hemmer (ACE-H); Angiotensin-Rezeptorblocker (AT-B); Diabetes mellitus (DM); Hypertonus (HT).**

## 2 Messung der m-RNA-Expression der Zielgene

Die m-RNA dient als Vorlage für die Herstellung von Proteinen in einem als Translation bezeichneten Vorgang. Nicht alle Gene in einer Zelle sind gleichzeitig aktiv und führen zur Herstellung von Proteinen. Die Regulation der Genaktivität bestimmt damit zum großen Teil die Eigenschaften einer Zelle. Durch die Messung der mRNA wiederum erhält man Rückschlüsse auf die Aktivität eines Gens.

## **2.1 Homogenisation des Ausgangsmaterials für die m-RNA-Extraktion**

Alle Arbeiten mit RNA-Material wie Aufarbeitung der Gewebeproben, RNA-Messung, rT-Reaktion (reverse Transkriptions-Reaktion) erfolgten in strikter räumlicher Trennung von den Laboren der PCR-Amplifizierung und den DNA-Experimenten. Um Verunreinigungen und Abbau der RNA durch ubiquitär vorkommende RNAsen zu vermeiden, wurden nur Gerätschaften und Hilfsmittel (Eppendorfgefäße, Pipetten, Pistillen, etc.) verwendet, die zuvor mit 0,1%-iger DEPC-Lösung behandelt und anschließend 30 Min. bei 1 atü und 121°C autoklaviert worden waren. Zu Beginn der Homogenisation wurden die jeweiligen Kryoröhrchen (Nunc, 2,5ml) aus dem Lagerungskontainer (Typ Chronos 100, Messer-Griesheim) herausgesucht und in einem transportablen Stickstoffbehälter (Dewar) zum Abzugsarbeitsplatz getragen. Dort wurde die jeweilige Probe zunächst aus dem Kryoröhrchen zügig mit einer gekühlten Pinzette herausgenommen, in eine ebenfalls vorgekühlte, vorher beschriftete Aluminiumfolie gewickelt und wieder in flüssigen Stickstoff getaucht. Im Anschluß wurde die in Alufolie gewickelte Probe mit einem Hammer zerklopft und nochmals das gesamte Alupäckchen in flüssigen Stickstoff getaucht. Mit einem vorgekühlten Metallspatel wurden 10-40 mg Stücke von der Myokardprobe entnommen, in ein leeres, beschriftetes, abgekühltes und vorher abgewogenes Eppendorfgefäß überführt und auf einer Präzisionswaage (Sartorius, Göttingen) abgewogen, um das jeweilige Probengewicht zu errechnen. Zur Homogenisation mit einer geschliffenen, der Größe des Eppendorfgefäßes angepassten Metallpistille, wurden 160 µl RNazol™ B-Reagenz (Wako Chemie Medical, Neuss) auf die Probe gegeben. Die Rotationsgeschwindigkeit des Homogenisators (Ultraturrax® T 25, IKA, Staufen) betrug 500 U/min. Die Dauer der Homogenisation betrug 30 Sek. Noch an der Pistille befindliches Restgewebe wurde mit RNazol abgespült, so dass insgesamt 1 ml RNazol/Probe eingesetzt wurden. Die Suspension wurde nun in einem zweiten gleichartigen Durchgang homogenisiert. Es folgten kurze Abkühlphasen auf Eis, um einer RNA-Degradation durch Überhitzung vorzubeugen. Anschließend wurde das Homogenisat durchmischt, wiederholt gekühlt und zur vollständigen Extraktion für 20 Min. im Kühlraum bei 4°C auf einem Eppendorf-Schüttler inkubiert.

## **2.2 RNA-Extraktion**

In der folgenden Chloroformextraktion wurden alle Ansätze mit 200 µl Chloroform versetzt, für 2 Min. geschüttelt und anschließend für 10 Min. bei 14000 rpm und 4°C in einer Kühlzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues

Reaktionsgefäß überführt, 1:1 mit Isopropanol versetzt und durchmischt. Nach einer Tiefkühlphase von 12 h bei  $-80^{\circ}\text{C}$  und anschließendem Auftauen auf Eis wurde die Lösung für 30 Min. bei 14000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert und ihr wässriger Überstand dekantiert.

Zweimal in Folge wurde die nun als Pellet vorliegende RNA mit 80%igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert und luftgetrocknet. Das reine RNA-Pellet wurde mit 40  $\mu\text{l}$  bzw. einer der Größe entsprechenden Menge DEPC-Wasser gelöst und für weitere 12h bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Am Folgetag fand der Verdau mitextrahierter DNA statt. Davor und danach wurde die RNA-Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260\text{nm}$  in einer Verdünnung 1:20 mit  $\text{H}_2\text{O}$  bestimmt (Gerät LKB-Biochrom 4060, Pharmacia, mit Quarzglasküvetten). Die DNA- bzw. RNA-Konzentration wurde durch das im Spektrophotometer bestimmte Absorptionsmaximum bei  $A_{260}$  nach folgender Formel berechnet:  $C = A_{260} \times E \times V$

Dabei ist C die Konzentration der RNA in  $\text{ng}/\mu\text{l}$

$A_{260}$  Absorption bei 260 nm

E Extinktionskoeffizient: 40  $\text{ng}/\mu\text{l}$  RNA, 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$  doppelsträngige DNA

V Verdünnung des Meßansatzes.

Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm gemessen. Das Verhältnis zwischen den Ergebnissen bei 260 und 280 nm gab einen Anhalt auf die Reinheit der Nukleinsäure. Saubere Präparationen von DNA oder RNA hatten ein Verhältnis von 1,8 bzw 2,0.

### **2.3 DNase-Verdau**

Der DNase-Verdau-Reaktionsansatz beinhaltete 35  $\mu\text{l}$  der RNA Probe, 2,94  $\mu\text{l}$  DNase (10U/ $\mu\text{l}$ ), 8,75  $\mu\text{l}$   $\text{MnCl}_2$  (8mM), 1  $\mu\text{l}$  RNAsin (40 U/ $\mu\text{l}$ ) und wurde mit DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  auf ein Gesamtvolumen von 60  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 10 Min. bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert und die DNase Reaktion durch Zusatz von RNazol gestoppt. Durch erneute Chloroformextraktion und einen Ethanolwaschvorgang (Vorgehen s. oben) wurde die RNA isoliert und in DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert. Es folgte die 2. photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung, aus deren Ergebniss die Ausbeute der RNA-Extraktion in  $\mu\text{gRNA}/\text{mg}$  Feuchtgewicht berechnet wurde.

## **2.4 Reverse Transkription**

Damit in der PCR-Reaktion die Polymerase enzymatisch aktiv werden konnte, war es notwendig, die RNA mit Hilfe der Reversen Transkriptionsreaktion (rT) in die Form der copy DNA umzuschreiben.

## **2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Das allgemeine Prinzip der PCR bestand in der zyklischen Amplifikation von DNA-Molekülen durch eine hitzebeständige DNA-Polymerase (Taq-Polymerase). Jeder Zyklus beinhaltete eine Denaturierung der doppelsträngigen DNA, das Anlagern (Annealing) zweier jeweils komplementärer Oligonukleotide (Primer) an jeweils einen DNA-Strang bzw. ein Amplifikatende in gegenläufiger Richtung und schließlich die Synthese eines komplementären DNA-Moleküls an der Matritze (Extension) durch die Taq-DNA-Polymerase.

### **2.5.1 Primer**

Grundvoraussetzungen für eine erfolgreiche PCR waren das Design von optimalen Primerpaaren, die Verwendung der bestmöglichen Primerkonzentration und die korrekte Lagerung der Primerlösungen.

#### **2.5.1.1 Primerdesign**

Zunächst wurden die Zielsequenzen der zu untersuchenden Gene über die „GenBank“ des NIH der USA (Internet) gesucht und heruntergeladen. Entworfenen Primer wurden über Blast-Search ebenfalls im Internet auf homologe Sequenzen überprüft, um eine falsche Amplifikation möglichst von vornherein auszuschließen. Für das Design der Primer selbst wurde das Programm „Primer-Express“ der Firma Perkin-Elmer verwendet. Auch bei der Verwendung kommerzieller Software war die Kenntnis folgender Konstruktionsprinzipien für gut funktionierende Primer wichtig:

*Primerlänge:* Die Primer sollten 18-30 Nukleotide lang sein.

*GC-Gehalt:* Der GC-Gehalt eines Primers sollte zwischen 45-55% liegen. Darüber hinaus war es günstig, Primer so zu legen, dass durch mehrere konsekutive G/C-Basenpaarungen die Bildung von G/C-Klammern mit der Template-DNA ermöglicht wurde. Dies war am 3' Ende des Primers besonders vorteilhaft, da der Transkriptionsbeginn dann sicherer war.

*Primerschmelztemperatur ( $T_m$ ):* Idealerweise hatten beide Primer möglichst ähnliche  $T_m$ -Werte (zwischen 55 und 65°C). Je höher ihre Schmelztemperatur war, desto höher war ihre Spezifität. Die drei wichtigsten Komponenten, die die Primerschmelztemperatur beeinflussten, waren die Primerkonzentration, ihr GC-Gehalt und die Salzkonzentration, wobei eine Erhöhung einer oder mehrerer Komponenten mit einer Erhöhung der Primerschmelztemperatur einherging.

*Amplifikatlänge:* Idealerweise war das Amplifikat zwischen 100 und 600 Basenpaaren lang. Für die quantitative PCR galt jedoch der Grundsatz: Je kürzer, desto besser, da dadurch eine längere Linearität der Reaktion erreicht wurde, die für die quantitative Analyse Voraussetzung war.

*Sequenz:* Vermieden werden sollten:

1. Komplementaritäten von zwei oder mehr Basen an den 3'-Enden der Primerpaare, um die Bildung von Primer-Dimeren zu reduzieren,
2. Fehlpaarungen zwischen dem 3'-Ende des Primers und der Template-Zielsequenz,
3. Wiederholungen von drei oder mehr G's oder C's am 3'Ende,
4. Ein T am 3'-Ende, da Primer mit endständigem T am 3'-Ende anfälliger sind für Basenfehlpaarungen,
5. Komplementaritäten innerhalb eines Primers und zwischen den Primern eines Primerpaares.

*Kontaminationsschutz:* Günstigerweise wurden die Primer so gewählt, daß die eine Hälfte des Primers mit dem 3'-Ende eines Exons und die andere Hälfte mit dem 5'-Ende des benachbarten Exons hybridisiert (intronüberspannender Primer). Das überspannte Intron sollte dabei möglichst groß sein (mindestens 3000 bis 5000 Basenpaare). Damit wurde garantiert, dass die Primer an cDNA binden, die aus gespleißter m-RNA als Template synthetisiert wurde, jedoch nicht an genomische DNA. Somit wurde die Amplifikation von DNA-Kontaminanten vermieden.

Alternativ konnten Primer eine Region flankieren, die zumindest ein Intron enthielt. cDNA-Amplikons (enthalten keine Introns) wären dann kleiner als Amplikons von genomischer DNA (enthalten Introns). Anhand dieser Größenunterschiede bei den RT-PCR-Produkten (Real-Time PCR) konnten DNA-Kontaminationen detektiert werden.

### **2.5.1.2 Konzentrationen der einzusetzenden Primer**

In der RT-PCR wurden 0,5-1,0  $\mu\text{M}$  pro Forwärts- oder Rückwärts-Primer eingesetzt. Es stellte sich heraus, dass für die meisten Anwendungen eine Primerkonzentration von 0,6  $\mu\text{M}$  optimal war. Bei gleicher  $T(m)$  wurden gleiche Primerkonzentrationen eingesetzt. Waren die einzig möglichen Primer eines Paares in ihrer  $T(m)$  stark unterschiedlich, wurde die Konzentration eines der beiden Primer erhöht oder reduziert (Primermatrix: 1/9; 1/6; 1/3; 1/1; 3/1; 6/1; 9/1). Hierdurch wurden statistisch die Unterschiede der  $T(m)$ -bedingten verschiedenen Anlagerungswahrscheinlichkeiten solcher Primer ausgeglichen.

### **2.5.1.3 Lagerung**

Durch Lösen der lyophilisierten Primer in einem kleinen Volumen destillierten Wassers oder TE wurde eine konzentrierte Stammlösung hergestellt. Davon wurden aliquotierte Arbeitslösungen von 10 pmol/  $\mu\text{l}$  bereitet, um wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden. Diese wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Eine Qualitätskontrolle der Primer mit einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese war nicht erforderlich und wurde deshalb nicht durchgeführt.

## **2.5.2 Optimierung einer PCR**

Häufig zeigten sich nach dem ersten PCR-Experiment unspezifische Nebenbanden, die eine zweifelsfreie Beurteilung des PCR-Ergebnisses erschwerten und weitere Analysen (z.B. Cycle-Sequenzierung) erforderten. Schon deshalb musste fast immer eine Optimierung der PCR-Bedingungen durchgeführt werden. Von den gängigen Methoden wurden folgende angewendet: Titrierung der Template- und Primerkonzentrationen, „hot start-PCR“, Reduktion der Anzahl der PCR-Zyklen, Optimierung der Reaktionsphasenzeiten oder aber eine graduelle Erhöhung der Annealingtemperatur. Die Wahl der Annealingtemperatur war meist die kritischste Komponente zur Optimierung der Spezifität einer PCR-Reaktion. Folgende Komponenten wurden konstant gehalten: Magnesium- dNTP- und Taq-Polymerase-Konzentrationen.

### **2.5.2.1 Annealingtemperatur**

Die PCR wurde zunächst routinemäßig  $5^{\circ}\text{C}$  unter der berechneten Temperatur des Primerschmelzpunktes ( $T_m$ ) begonnen. Im Fall einer Entstehung unspezifischer Nebenbanden zeigte sich aber, dass die optimale Annealingtemperatur tatsächlich oft viel höher liegt als die errechnete ( $>12^{\circ}\text{C}$ ). Sie musste für die meisten Zwecke empirisch ausgetestet werden: Es

waren solange weitere PCR-Reaktionen mit sukzessive erhöhter Annealingtemperatur erforderlich, bis die stringentesten Bedingungen gefunden waren.

### **2.5.2.2 Hot-Start-PCR**

Die PCR wurde als Real-Time-PCR mit Hot-Start-Technik durchgeführt. Zur Durchführung der Hot-Start-PCR wurde die Hot-Start-Ampli-Taq-Gold-DNA-Polymerase (Perkin Elmer) verwendet. Die Hot-Start-Ampli-Taq-Gold-DNA-Polymerase war zunächst inaktiv, so dass bei niedrigeren Temperaturen, also beim normalen Ansetzen der Reaktion und während der initialen Aufheizphase des GeneAmp 5700, die Bildung von unspezifischen Produkten und Primer-Dimeren verhindert wurde. Erst durch eine 15minütige Inkubation bei 95°C wurde die Ampli-Taq-Gold-DNA-Polymerase aktiviert. Durch diesen Aktivierungsschritt wurden gleichzeitig unspezifisch gebundene Primer denaturiert und eine hochspezifische Amplifikation sichergestellt.

### **2.5.2.3 Zyklenzahl**

Abhängig von der Kopienzahl des Ausgangs-Templates lag die Zyklenzahl eines RT-PCR-Programms normalerweise zwischen 35 und 40 Zyklen. Mehr Zyklen führten nicht unbedingt zu einer höheren Ausbeute an RT-PCR-Produkten, vielmehr konnte dies eine Erhöhung des unspezifischen Hintergrunds zur Folge haben.

Um eine quantitative Auswertung einer RT-PCR durchführen zu können, musste außerdem der Bereich der Zyklenzahl, in dem eine lineare Beziehung zwischen Menge an Ausgangs-Templates und Produktausbeute vorlag, empirisch ermittelt werden. Gründe für die Abnahme der Linearität der Amplifikation (oder das Erreichen der sogenannten Sättigung) waren z.B. abnehmende Primer- und dNTP-Konzentrationen, abnehmende Aktivität der Taq-Polymerase und Template-Inhibierung.

### **2.5.2.4 Reaktionsphasenzeiten**

Das Annealing lief mit enormer Geschwindigkeit ab. Meist waren hierfür 60 Sekunden völlig ausreichend. Zu lange Denaturierungszeiten resultierten in Hitzeschäden der neu synthetisierten DNA und überproportionalem Verlust der Polymeraseaktivität. Während einer Extension bei 72°C ging man von einer Syntheserate von 400 Basenpaaren pro Minute aus. Gewöhnlich reichten deshalb 45 Sekunden für Fragmente unter 400 Basenpaar Länge.

## 2.6 DNA-Sequenzanalyse

Um die Richtigkeit der Amplifikate aus der RT-PCR zweifelsfrei festzustellen, wurde für jedes Primerpaar (nach ansonsten vollständig optimierter PCR) eine Sequenzierung des PCR-Produktes durchgeführt.

Am automatischen DNA-Sequenzierer (Perkin Elmer, Langen, Germany) wurde die DNA-Sequenz nichtradioaktiv analysiert. Die Reaktion wurde nach Angabe des API-PRISM™ DYE TERMINATOR CYCLE SEQUIENCING READY REACTION KIT mit einer Ampli-Taq-DNA-Polymerase unter Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide durchgeführt.

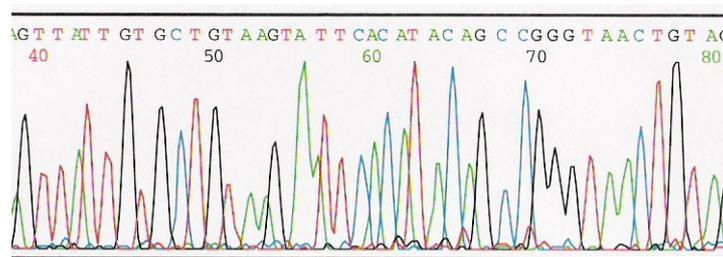


Abbildung 7: Abschnitt aus dem Sequenzierungsergebnis eines Calcineurin A PCR-Amplifikats

## 2.7 Protokolle und Primersequenzen

### 2.7.1 Protokoll der reversen Transkription

Es wurden 4 µl der isolierten RNA (125ng/µl) mit 6 µl DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt, mit 2 µl Random-Hexamer-Primern (300 ng /µl) versetzt und für 10 Min. bei 70°C inkubiert. Im Anschluss wurde jeder Ansatz gekühlt und mit 1 µl Superscript (200 U/µl) und 9 µl Mastermix (s. u.) versetzt, gemischt, zentrifugiert und für 10 Min. bei Raumtemperatur sowie für 50 Min. bei 42°C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde anschließend eine Hitzedenaturierung bei 95°C durchgeführt. Die einzelnen Komponenten des eingesetzten Mastermixes waren:

- 4 µl Puffer (100 mmol Tris HCl, 250 mmol KCl, 12,5 mmol MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µg/ml BSA; pH = 8,4)
- 2 µl DTT (0,1 M)
- 1 µl RNAsin (40 U/µl)
- 1 µl dNTP Mix (10 mmol)

### 2.7.2 Protokoll der PCR

Jede PCR wurde auf Eis und ohne Unterbrechung in die Mikrotiterplatten mit 96 Aussparungen (Perkin Elmer, USA) für die PCR-Ansätze pipettiert. Ein 25µl-PCR Ansatz enthielt 1,25 ng Template, 5 pmol Forward-/Revers-Primermix und 12,5 µl SYBR-Green™ Mastermix (10x SYBR Puffer, Amp-Erase (1U/µl), Ampli Taq Gold (5U/µl), dNTPMix (2,5mMdATP, 2,5mM dCTP, 2,5mM dGTP, 2,5mM dUTG und MgCl<sub>2</sub> (25mM))), der mit H<sub>2</sub>O auf 25 µl aufgefüllt wurde. Eine PCR-Platte wurde nach der vollständigen Pipettierung mit einer selbstklebenden und wiederabziehbaren Klebefolie (Top Seal A, Perkin Elmer) passgenau versiegelt und nach einer kurzen Zentrifugation (Eppendorf Mikrotiterplattenzentrifuge) sofort in den GeneAmp 5700 (Perkin Elmer) gestellt, und das PCR Programm wurde gestartet. Das Fluoreszenzsignal wurde vom Real-Time-PCR Gerät Gene-Amp5700 in jedem Zyklus während des Annealingschrittes gemessen. Durch diese Online-Messung konnte der PCR-Verlauf verfolgt und analysiert werden. Zur qualitativen Kontrolle der gemessenen Produkte wurden Schmelzkurven der entstandenen Hybride bestimmt. So konnten etwaige Nebenprodukte ausgeschlossen werden.

Folgendes PCR-Thermoprofil wurde verwendet:

Hot-Start und Denaturierung: 10 min 95°C

40 Amplifikationszyklen:

1. Denaturierung: 45 sec 95°C
2. Annealing: 60 sec Temp. je nach Primerpaar
3. Extension: 45 sec 72°C

Abschlussynthese: 10 min 72°C

Jedes der Gene durchlief 40 Amplifikationszyklen. Aus einem Pool der Proben wurde eine achtstufige Verdünnungsreihe von 25 ng - 0,19 ng zu jedem Zielgen vermessen. Daraus wurde die Standardkurve zur Quantifizierung erstellt. In jeder PCR wurde außerdem eine Negativkontrolle in Form einer H<sub>2</sub>O Probe mitgeführt, um eine Kontamination der Chemikalien mit DNA auszuschließen. Diese zeigten keine nullwertdifferenten Extinktionen. Alle Proben wurden im Doppelansatz gemessen. Je Primerpaar konnten so neben der Verdünnungsreihe und der Negativkontrolle auf einer PCR-Platte bis zu 39 Patientenproben vermessen werden.

### **2.7.3 Primersequenzen**

Es wurden Primerpaare entworfen, die für jede der Spleissvarianten von Calcineurin A  $\alpha$  und A  $\beta$  spezifisch waren. Nach ihrer Evaluierung wurden aus den oben erwähnten technischen Gründen nur die Primerpaare zur Vermessung der Myokardproben herangezogen, die nur den optimalen PCR-Kriterien entsprachen. So wurden zwei Primerpaare für Calcineurin A  $\alpha$  eingesetzt, die entweder zur Amplifikation der Spleissvarianten A  $\alpha$  1 und 2 oder aller drei A  $\alpha$  Spleissvarianten führten. Die beiden eingesetzten Calcineurin A  $\beta$  Primerpaare waren entweder für die Spleissvariante A  $\beta$  1 oder beide  $\beta$ -Spleissvarianten spezifisch (Tabelle 3).

	<b>CnA <math>\alpha</math> 1+2</b>	<b>CnA <math>\alpha</math> 1-3</b>	<b>CnA <math>\beta</math> 1</b>	<b>CnA <math>\beta</math> 1+2</b>	<b>ANP</b>	<b>BNP</b>	<b>GAPDH</b>
<b>GenBank Accession No</b>	NM 000944	NM 000944	NM 02112	NM 02112	K 02043	NM 2521	NM 002064
<b>Fwd Primer</b>	TG TTCATA- CTTCTACA- GTTACCCGGC	GGAAAAA- GTGACTG- AGATGCTGG	CAAAGT- GCCACA- GTTGAGGC	AATGAG- GGTGCT- GCCATCC	CAGTGA- GCCGAA- TGAAGA	ACGTCC- GGGTTA- CAGGAGC	GAAGGT- GAAGGT- CGGAGTC
<b>Rev Primer</b>	CCTGTAC- ATGCGGT- ACCCTGC	AGCTGTT- GCACCAT- CAAATCC	ATCCTAT- CCAAACC- CTTTGCC	AACCTCT- GTCCACA- TAATCGCC	GCTCCA- ATCCTG- TCCATC	ACCAT- TTTGC- GGTGCCC	GAAGAT- GGTGAT- GGGATTTTC
<b>Amplikonlänge</b>	111 Bp	94 Bp	104 Bp	175 Bp	231 Bp	164 Bp	226 Bp
<b>Primerposition</b>	Exongrenzen überspannend	Exongrenzen überspannend	Exongrenzen überspannend	Intron überspannend	%	%	%
<b>Länge des überspannten Introns</b>	20572 Bp und 2560 Bp	2071 Bp und 20525 Bp	4824 Bp und 1452 Bp	694 Bp	%	%	%
<b>Verhältnis Fwd : Rev</b>	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1
<b>Annealing-Temperatur</b>	61°C	61°C	61°C	61°C	60°C	61°C	60°C

**Tabelle 3 VERWENDETE PRIMER UND IHRE EIGENSCHAFTEN:** Aufgeführt sind die Primersequenzen sowie die Primerpositionierung und die in der PCR angewendeten Konzentrationsverhältnisse und Annealingtemperaturen. Atrialer natriuretischer Faktor (ANF), Basenpaare (Bp), Brain natriuretic Peptide (BNP), Calcineurin A  $\alpha$  1+2/1-3 (CnA  $\alpha$ , für die Spleissvarianten 1 und 2 oder für alle drei Spleissvarianten), Calcineurin A  $\beta$  1/1+2 (CnA  $\beta$ , für die Spleissvariante 1 oder für beide Spleissvarianten), Forward Primer (Fwd Primer), Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Reverse Primer (Rev Primer)

### 3 Messung der Proteinexpression von Calcineurin A

Prinzipiell unterscheidet man zwei Mechanismen der Proteinexpression. Bei der konstitutiven Expression findet die Proteinsynthese immer und unabhängig von äußeren Einflüssen statt. Es wird also immer eine gewisse Menge des Proteins hergestellt. Im Gegensatz dazu kann die Expression auch durch äußere Einflüsse geregelt werden. Man spricht dann von einer Induktion der Expression.

#### 3.1 Homogenisation des Ausgangsmaterials für die Proteinextraktion

Zu Beginn der Homogenisation wurden die jeweiligen Kryoröhrchen (Nunc, 2,5 ml) wieder aus dem Lagerungskontainer herausgesucht und in einem transportablen Stickstoffbehälter zum Abzugsarbeitsplatz getragen. Dort wurde die jeweilige Probe zunächst aus dem Kryoröhrchen zügig mit einer gekühlten Pinzette herausgenommen, in eine ebenfalls vorgekühlte, vorher beschriftete Aluminiumfolie gewickelt und wieder in flüssigen Stickstoff getaucht. Im Anschluss wurde die in Alufolie gewickelte Probe mit einem Hammer zerklopft und nochmals das gesamte Alupäckchen in flüssigen Stickstoff getaucht. Mit einem vorgekühlten Metallspatel wurden 100-150 mg Stücke von der Myokardprobe entnommen, in ein leeres, beschriftetes, abgekühltes und vorher abgewogenes Eppendorfgefäß überführt und auf einer Präzisionswaage (Sartorius, Göttingen) abgewogen, um das jeweilige Probengewicht zu errechnen.

#### 3.2 Proteinextraktion

Für die anschließende Proteinextraktion musste zuerst der sogenannte Lysispuffer zusammen gestellt werden. Dieser wurde dann pro ml mit 2,5 µl Proteinase Inhibitor Cocktail versetzt. Je nach errechnetem Probengewicht wurde von diesem Proteinextraktionspuffer die vierfache Menge in µl zur jeweiligen Myokardprobe hinzugefügt, so dass z.B. eine Myokardprobe von 100 mg mit 400 µl Proteinextraktionspuffer versetzt wurde. Danach wurden die Proben auf Eis gelagert, und zu jeder Probe wurde die zum FASTPREP™ (QBIOSYSTEMS) dazugehörige Lysis Matrix (kleine Kügelchen) hinzugegeben. Im FASTPREP™ Gerät selber wurden anschließend bis zu zwölf Proben gleichzeitig 20 Sekunden bei Stufe 4.0 behandelt, so dass durch die patentierte vertikale und anguläre Bewegung die Proteine lysiert wurden. Daran schloss sich eine 20 minütige Inkubation der Proben auf Eis an. Dann wurde der Überstand des Lysats aus den 2 ml FASTPREP™ Röhrchen abpipettiert und in vorher beschriftete und auf Eis gelagerte Eppendorf Tubes überführt, um diese anschließend für 10 Min. bei 4°C und 14.000 rpm zu zentrifugieren. Nach der Zentrifugation mussten die Eppendorf Tubes

vorsichtig und ohne Schütteln aus der Zentrifuge entnommen werden, um den entstandenen Überstand mit lysiertem Protein in neue Eppendorf Tubes zu überführen. Bevor dieser Überstand dann bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren wurde, wurde von jeder Probe ein  $20\ \mu\text{l}$  Aliquot in ein für die Proteinmessung bestimmtes Eppendorf Tube überführt.

### **3.3 Proteinmessung**

Um eine bekannte und geeignete Menge Protein in den nachfolgenden Western Blot einzusetzen, wurde jede Probe nach der Methode von Lowry et al. [93] gemessen. Dazu wurden ELISA-Platten (Roth, Karlsruhe) mit Flachboden und 96 Kammern verwendet. Zur Vorbereitung gehörte das Vorheizen des Hybridisierungssofens (Bachofer, Reutlingen) auf  $37^{\circ}\text{C}$ , das Ansetzen der Farbstofflösung und der Verdünnungsreihe des Albuminstandards (beides Pierce, USA, BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit, 23227). Sowohl alle Proben als auch die Verdünnungsreihe wurden im Doppelansatz gemessen. Da pro Kammer insgesamt  $300\ \mu\text{l}$  der Farbstofflösung, bestehend aus den beiden Reagentien A und B in einem Verhältnis 1:50, erforderlich waren, wurde für eine ganze ELISA-Platte ein Master Mix aus  $29,4\ \text{ml}$  Protein Reagent A und  $600\ \mu\text{l}$  Protein Reagent B erstellt. Die Verdünnungsreihe des Proteinstandards beinhaltete die Stufen  $100\ \mu\text{g/ml}$ ,  $200\ \mu\text{g/ml}$ ,  $300\ \mu\text{g/ml}$ ,  $400\ \mu\text{g/ml}$ ,  $500\ \mu\text{g/ml}$ ,  $1000\ \mu\text{g/ml}$  und  $2000\ \mu\text{g/ml}$ , die jeweils in einem Volumen von  $100\ \mu\text{l}$  eingesetzt wurden. Neben der Verdünnungsreihe wurden auch zwei Negativ-Kontrollen ohne Albuminstandard mit  $100\ \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  mitgeführt. Die Proben wurden jeweils in vier Verdünnungsstufen eingesetzt und mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf  $20\ \mu\text{l}$  aufgefüllt:  $5\ \mu\text{l}$  und  $2\ \mu\text{l}$  der Originalverdünnung und  $5\ \mu\text{l}$  und  $2\ \mu\text{l}$  einer 1:10 Verdünnung. Ebenso wurde die Eigenextinktion des Proteinextraktionspuffers in diesen vier Verdünnungsstufen und einem Volumen von  $20\ \mu\text{l}$  gemessen, um diese von der Extinktion der Proben subtrahieren zu können.

Die beladenen Kammern enthielten somit neben der Farbstofflösung entweder noch  $\text{H}_2\text{O}$ , Albuminstandard, lysiertes Protein oder Proteinextraktionspuffer. Neben der Albuminverdünnungsreihe und dem Proteinextraktionspuffer konnten so pro ELISA-Platte die Proben von maximal neun Patienten vermessen werden.

Vor der eigentlichen Vermessung wurde die ELISA-Platte mit PARAFILM<sup>®</sup> M Verschlussfolie (Brand, Deutschland) verschlossen und für 30 Min. im Hybridisierungssofen bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach der Inkubation fand die Vermessung der Proben im ELISA-Platten-Reader, einem Filter-Photometer (Anthos Labtec HT2, Österreich), bei  $550\ \text{nm}$  statt.

### 3.4 Western Blot

Vor dem eigentlichen Western Blot wurde Gesamtprotein mit Hilfe einer Gelelektrophoresetechnik in einer Trägermatrix entsprechend der Größe oder Ladung der Einzelproteine aufgetrennt. Hierbei migrierten die zu untersuchenden Proteine innerhalb des halbfesten Trägermaterials (Polyacrylamidgel), so dass sich ein charakteristisches Muster unterschiedlich großer Proteinbanden ergibt. Beim Western Blot selber wurden die aufgetrennten Proteingemische aus der Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Membran transferiert. Die Identität von Proteinen auf der Membran konnte nun mit Hilfe einer Immunodetektion bestimmt werden. Die Proteine wurden dabei von spezifischen Antikörpern erkannt.

#### 3.4.1 Optimierung eines Western Blot

Häufig zeigten sich am Ende des Western Blot nach der Chemilumineszenz Proteinbanden auf dem Filmmaterial, die nicht klar abgrenzbar oder zu kräftig oder zu schwach waren. Im ungünstigen Fall waren außer dem Molekulargewichtsmarker gar keine Proteinbanden der Proben oder keine Bande auf der in Frage kommenden Größe in kDa zu erkennen. Das sich dahinter verbergende Problem ließ sich meist erst nach mehreren Versuchen klar erkennen und beseitigen, indem einzeln folgende Arbeitsschritte oder Parameter verändert wurden:

*Proteinextraktion:* Die Methode der Wahl und die eingesetzten Chemikalien hingen von der intrazellulären Lokalisation und den chemischen Eigenschaften des zu untersuchenden Proteins ab. Für Proteinaktivitätsmessungen wie einem Phosphatase Essay z.B. wären im Gegensatz zum Western Blot ebenfalls unterschiedliche Extraktionsmethoden zum Einsatz gekommen.

*Gesamtprotein:* Die für die Antikörperhybridisierung und Chemilumineszenz optimale Menge an Gesamtprotein, die in der Gelelektrophorese eingesetzt wurde, galt es in einer Verdünnungsreihe zu etablieren. Zu wenig oder zu viel eingesetztes Gesamtprotein hatten unscharfe Proteinbanden in der Chemilumineszenz zur Folge.

*Elektrophorese:* Die Konzentration des Polyacrylamidgels und die Dauer der Gelelektrophorese hingen von der Größe des zu untersuchenden Proteins ab. Je größer das Protein gemessen in kDa war, desto geringer wählte man die Konzentration des Gels, um eine optimale Auftrennung aller in diesem Größenbereich vorhandenen Proteine zu erreichen.

*Blottdauer:* Die optimale Dauer für den Transfer der Proteine von dem Trenngel auf die Nitozellulosemembran orientierte sich ebenfalls an der Größe des zu untersuchenden Proteins und an der Konzentration des Polyacrylamidgels.

*Antikörperkonzentration:* Um eine scharfe Proteinbande der zu erwartenden Größe in kDa ohne unspezifische Nebenbanden zu erhalten, wurden unterschiedliche Kombinationen verschiedener Konzentrationen von primärem und sekundärem Antikörper verglichen. Zu hohe Konzentrationen z.B. des sekundären Antikörpers führten zu unspezifischen Proteinbanden und zu einer Herabsetzung der Effektivität des Western Blot. In einer Negativkontrolle ohne primären Antikörper wurden unspezifische Nebenbanden ausgeschlossen.

### **3.4.2 Gelelektrophorese**

Zu Beginn dieses Abschnitts wurden zwischen zwei eingespannte Glasplatten die Gele gegossen. Viel Übung und handwerkliches Geschick waren erforderlich, um ein von Luftblasen freies Polyacrylamidgel für die fehlerfreie Migration der Proteine durch die Trägermatrix herzustellen. Aufgrund der Größe der beiden zu untersuchenden Proteine (Calcineurin A: 61kDa und GAPDH: 36 kDa) wurden 12,5 %ige Polyacrylamidgele verwendet, um eine optimale Auftrennung der Proteine zu erreichen. Bis zum Ende der Trocknungszeit dieses Trenngels (45 Minuten) war es mit H<sub>2</sub>O beschichtet, damit die obere Grenze horizontal verlief. Auf das Trenngel wurde anschließend das Sammelgel gegossen (Trocknungszeit 45 Minuten), in welches für die Probenbeladung die voneinander abgetrennten Einfüllabschnitte geformt wurden.

Während der Trocknungszeit wurden die Proben der Patienten aus dem -80°C Tiefkühlschrank herausgesucht und langsam auf Eis aufgetaut. Für den Einsatz in der Gelelektrophorese wurden die Proben mit 2,5 µl des reduzierenden Ladepuffers (Ratiload, Roth, Karlsruhe) versetzt und das Volumen mit PBS auf 12,5 µl aufgefüllt. Danach wurden sie gevortext, zentrifugiert und für 5 Minuten bei 95°C im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) denaturiert, wodurch die Disulfidbrücken der Proteine reduziert und die Proteine somit in ihre Monomere fragmentiert wurden. Danach kühlten sie bei Raumtemperatur wieder ab und wurden anschließend noch einmal zentrifugiert.

Während der Abkühlungszeit wurde die Elektrophoresekammer (Biorad, München) vorbereitet durch das Einspannen der Gelkassetten und das Fluten der mittleren und danach der äußeren Pufferkammer mit Elektrophoresepuffer. Anschließend wurden die Taschen im Sammelgel mit den Proben beladen und die Kammer mit dem an ein Stromkabel

angeschlossenen Deckel verschlossen. Es folgte die Elektrophorese, die aus zwei Phasen bestand. Über ein Stromgerät (Amersham Biosciences, Braunschweig) wurde in Phase 1 für die Dauer von einer halben Stunde eine Spannung von 80 Volt angelegt, bis sich die Proben am unteren Ende des Sammelgels fokussierten. Zum Auftrennen der Proteine wurde in Phase 2 für die Dauer von 1,5 Stunden eine Spannung von 100 Volt angelegt.

In die verwendete Elektrophoresekammer konnten zwei Gele eingespannt werden, die jeweils bis zu 25 Taschen zum Beladen hatten. So konnten pro Gel neben einem vorgefärbten Protein-Molekulargewichtsmarker (Roti®-Mark PRESTAINED, Roth, Karlsruhe), einer Positivkontrolle für Calcineurin A (C-1907, Sigma-Aldrich, USA) und einer Negativkontrolle bis zu 22 Proben in Einfachbestimmung vermessen werden.

Für die unten aufgeführten Inkubationen mit den Calcineurin A- und GAPDH-Antikörpern wurden unterschiedliche Proteinmengen in der Gelelektrophorese eingesetzt. Für die Calcineurin A Blots wurden 25 µg Protein pro Myokardprobe eingesetzt neben einer Verdünnungsreihe aus dem Pool aller Proben von 45 µg bis 10 µg Protein. Für die Western Blots mit GAPDH-Antikörpern wurde die Gelelektrophorese mit 7,5 µg Protein pro Myokardprobe und einer Verdünnungsreihe von 20 µg bis 1,25 µg Protein durchgeführt.

Nach der Gelelektrophorese wurden die Glasplatten mit dem Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen und das Gel vorsichtig von den Glasplatten getrennt. Mit einem Einwegskalpell (Ansell, England) wurde das Sammelgel abgetrennt und verworfen, während das Trenngel im anschließenden Blot weiter verwendet wurde.

### **3.4.3 Blotten des Gels**

Die Vorbereitungen für das Blotten begannen bereits während der Gelelektrophorese mit dem Zuschneiden des 3MM-Filterpapiers (Whatman®) und der Nitrozellulosemembranen (Protran, Schleicher & Schüll, Dassel) auf Gelgröße. Dann wurden die Nitrozellulosemembranen in einer kleinen Wanne für zwei Minuten in H<sub>2</sub>O eingeweicht, damit der Transferpuffer besser aufgenommen wurde. Anschließend wurden in je einer Wanne die Membranen, das Filterpapier, das Trenngel und die zur Transferkammer (Biorad, München) gehörigen Schaumstoffe in dem vorbereiteten Transferpuffer für 10 Min. äquilibriert. Nach dem Äquilibrieren wurden sie in folgender Reihenfolge

Schaumstoff - Filterpapier - Trenngel - Membran - Filterpapier - Schaumstoff

von der Kathode zur Anode unter ständiger Zugabe von Transferpuffer luftblasenfrei aufeinander gelegt und in die Transferkammer eingespannt.

Danach wurde die Transferkammer mit dem Rest des Transferpuffers bis über die Höhe der eingespannten Membranen gefüllt. Um optimale Bedingungen für einen vollständigen Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran zu erreichen, wurde der Blot in eine Eiswanne gestellt. Unter dieser befand sich ein Magnetrührer, der über einen auf dem Boden der Transferkammer befindlichen Magnetrührfisch den Transferpuffer konstant durchmischte. Für die Dauer von 1,5 Stunden wurde eine Spannung von 100 Volt angelegt bei einer Stromstärke von 400 mA. In einer Kammer konnten bis zu zwei Trenngele gleichzeitig auf Membranen geblottet werden. Am Ende dieses Abschnitts wurden die Filterpapiere und die Trenngele verworfen und die Membranen für die nächsten Arbeitsschritte weiter verwendet.

#### **3.4.4 Färben der Membranen**

Um den Erfolg des Proteintransfers auf die Membranen nachzuweisen, wurden die Membranen in eine Wanne gelegt, mit Ponceau Rot (Serva, Heidelberg) bedeckt und für fünf Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Membranen zweimal für fünf Minuten mit Miliporewasser gewaschen und danach auf Filterpapier zum Trocknen gelegt. Sichtbar wurden die Proteinbanden der Proben als rote Banden und die des Molekulargewichtsmarkers als blaue. Mit einem Kugelschreiber konnte die Membran nun beschriftet und die Banden des Molekulargewichtsmarkers nachgezeichnet werden.

#### **3.4.5 Hybridisieren mit primärem und sekundärem Antikörper**

Vor der Inkubation mit den Antikörpern wurden die Membranen für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit Blocking Reagenz behandelt. Durch das Binden an die Nitrozellulosemembran verhinderte es ein unspezifisches Binden der zur Detektion verwendeten Antikörper. Ein weiterer Effekt war, dass nach dem Blocken der Membranen die Proteinbanden nicht mehr sichtbar waren, weswegen sie vorher beschriftet wurden. Nach dem Blocken wurden die Membranen einmal für 15 Minuten und zweimal für fünf Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur mit TBS-T Puffer gewaschen.

Während des Blockens wurden die primären Antikörper in den entsprechenden Konzentrationen angesetzt. Für Calcineurin A wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet, der nicht isoformspezifisch war (Sigma-Aldrich, C1956). Die exakte Position des erkannten Epitops auf Calcineurin A (z.B. n-terminal oder c-terminal) ist dem Hersteller nicht bekannt. Der Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:500 gelöst in TBS-T eingesetzt. Für GAPDH kam ebenfalls ein monoklonaler Antikörper zum Einsatz (Chemicon, MAB 374). Er wurde in TBS-T 1:1 Million gelöst. Da die vorangegangenen Arbeitsschritte von der

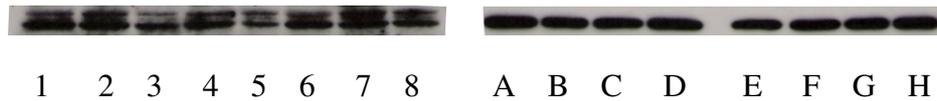
Gelelektrophorese über das Blotting der Membranen bis zum Blocken meist einen ganzen Arbeitstag in Anspruch nahmen, fand die Inkubation mit dem primären Antikörper für gewöhnlich über Nacht auf einem Schüttler im Kühlraum bei 4°C statt.

Nach der Inkubation mit den primären Antikörpern wurden die Membranen einmal für 15 Minuten und zweimal für fünf Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur mit TBS-T Puffer gewaschen. Währenddessen wurden die Verdünnungen des zweiten Antikörpers (HRP-gekoppelter Esel-anti-Maus IgG, Dianova Nr. 715-035-151) in ausreichenden Volumina hergestellt. Die Membranen für Calcineurin A wurden in einer Verdünnung von 1:150.000 und die Membranen für GAPDH in einer Verdünnung von 1:200.000 des sekundären Antikörpers in TBS-T für die Dauer von einer halben Stunde auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation mit den sekundären Antikörpern wurden die Membranen wieder einmal für 15 Minuten und zweimal für fünf Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur mit TBS-T Puffer gewaschen.

Bei allen Arbeitsschritten, in denen die Membranen gewaschen oder mit Antikörpern inkubiert wurden, war es besonders wichtig, dass jeweils große Volumina eingesetzt wurden, damit die Membranen nicht austrockneten, sondern ständig mit Flüssigkeit bedeckt waren.

### **3.4.6 Chemilumineszenz**

Für die Chemilumineszenz wurden die Membranen zuerst mit der Proteinseite nach oben auf 3MM Filterpapier gelegt. Zur Signalverstärkung der immunmarkierten Proteinbanden diente das ECL-Reagenz (Amersham, Braunschweig). Dazu wurden die beiden Komponenten nach Herstellerangaben gemischt. Die Membranen wurden je nach Größe mit 3-6 ml dieses Gemisches benetzt und 60 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit abgetropft und die Membranen luftblasenfrei auf Frischhaltefolie gelegt. Zur Visualisierung der Signale wurde in einer Filmkassette chemilumineszenz-sensitives Filmmaterial (Kodak) der Membran zur Belichtung ausgesetzt. Die Belichtungszeiten betragen 30-60 Sekunden. Entwickelt und fixiert wurde das Filmmaterial in einem Gerät der Firma Kodak.



**Abbildung 8: DETEKTION VON HUMANEM CALCINEURIN A UND GAPDH MITTELS WESTERN BLOT:** 1-8: Antikörperreaktivität des monoklonalem Calcineurin A-Antikörpers in aufgearbeitetem linksventrikulären Myokard (25 µg pro Spur bzw. Patient); Spur 1-4: Patienten mit DKMP, Spur 5-8: Kontrollen; A-H: Antikörperreaktivität des monoklonalen GAPDH-Antikörpers in aufgearbeitetem linksventrikulären Myokard (7,5 µg pro Spur bzw. Patient); Spur A-D: Patienten mit DKMP, Spur E-H: Kontrollen.

### 3.5 Protokolle und Lösungsansätze

#### 3.5.1 Protokoll der Gelelektrophorese

- 0,5 h                      80 Volt                      Raumtemperatur
- 1,5 h                      100 Volt                      Raumtemperatur

#### 3.5.2 Protokoll des Western Blot

- 1,5 h                      100 Volt/400 mA                      auf Eis

#### 3.5.3 Protokoll der Antikörperinkubation

Blocken mit Milchpulver:

- 0,5 h                      5 %                      Raumtemperatur

Waschen in TBS-T Puffer:

- 1 x 15 und 2 x 5 min pH 7,6                      Raumtemperatur

Primärer Antikörper: Calcineurin A

- über Nacht                      1 : 500                      4°C

Primärer Antikörper: GAPDH

- über Nacht                      1 : 1 Mio.                      4°C

Waschen in TBS-T Puffer:

- 1 x 15 und 2 x 5 min pH 7,6                      Raumtemperatur

Sekundärer Antikörper Esel-anti-Maus IgG auf Calcineurin A Blot:

- 0,5 h                      1 : 150.000                      Raumtemperatur

Sekundärer Antikörper Esel-anti-Maus IgG auf GAPDH Blot:

- 0,5 h                      1 : 200.000                      Raumtemperatur

Waschen in TBS-T Puffer:

- 1 x 15 und 2 x 5 min pH 7,6 Raumtemperatur

### 3.5.4 Lösungsansätze

Lysispuffer (2,5 ml Gesamtvolumen):	NaVO <sup>4</sup>	250 µl	200 mM
	HEPES	50 µl	1 M
	EGTA	250 µl	1 M
	DTT	1 ml	0,5 M
	Triton X	25 µl	100 %
	Glycerol	250 µl	100 %
	β-Glyxcerophosphat	12,5 µl	1 M
	H <sub>2</sub> O	662,5 µl	dest.
Protease Inhibitor Cocktail:	PMSF	10 µl	0,5 mM
	DDT	1 µl	5 mM
	Aprotinin	1 µl	100 ng/ml
	Leupeptin	1 µl	100 ng/ml
	Pepstatin	1 µl	100 ng/ml
Acrylamidgele: <span style="margin-left: 20px;">Trenngel 12,5 %:</span>	Acrylamid	8,0 ml	30 %
	TRIS	5,0 ml	1,5 M, pH 8,8
	H <sub>2</sub> O	6,6 ml	dest.
	SDS	200 µl	10 %
	APS	200 µl	10 %
	TEMED	8 µl	

Sammelgel:	Acrylamid	2,6 ml	30 %
	TRIS	2,0 ml	1,5 M, pH 6,8
	H <sub>2</sub> O	11 ml	dest.
	SDS	160 µl	10 %
	APS	160 µl	10 %
	TEMED	16 µl	
Elektrophoresepuffer pH 8,8:	TRIS Base	3,0 g	25 mM
	Glycine	18,8 g	193,7 mM
	SDS	10 ml	10 %
	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	dest.
Transfer-Puffer:	Glycine	14,415 g	193,7 mM
	TRIS Base	3,03 g	25 mM
	H <sub>2</sub> O	800 ml	dest.
	Methanol	200 ml	
TBS-T Puffer pH 7,6:	TRIS Base	12,1 g	20 mM
	NaCl	40 g	137 mM
	HCl	19 ml	1 M
	H <sub>2</sub> O	ad 5 l	dest.
Blocking Reagenz 5 %	Milchpulver	5,0 g	
	TBS-T	100 ml	pH 7,6
PBS pH 7,5	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,5 g	80 mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,96 g	20 mM
	NaCl	5,84 g	100 mM
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l	dest.

## 4 Auswertung

### 4.1 Quantitative Auswertung

#### 4.1.1 mRNA-Expression

##### 4.1.1.1 Standardkurvenberechnung

Die Resultate der quantitativen Real-Time-PCR wurden durch die online-Messungen durch das PCR-Gerät GeneAmp 5700 gewonnen. Der Zyklus, bei dem eine bestimmte Produktmenge überschritten wird (Threshold/Schwelle), steht im logarithmischen Verhältnis zur Ausgangsmenge. Mit diesem sogenannten ct (cycle threshold)-Wert und einer Standardkurve/Eichreihe kann über einen weiten Bereich quantifiziert werden. Diese ct-Werte wurden nach Microsoft Excel exportiert. Von den Doppelbestimmungen der Proben wurde für jedes gemessene Gen der Mittelwert ( $y$ ) gebildet. Der Standardkurve/Eichkurve der Verdünnungsreihe jeden Gens wurden die Steigung ( $a$ ) und der Schnittpunkt mit der y-Achse ( $b$ ) entnommen. Diese Werte wurden eingesetzt in die

Formel:  $y = ax + b$

und umgeformt nach  $x = (y - b) / a$ .

Durch Potenzieren von  $10^x$

wurde der Wert berechnet, welcher der Menge an Gesamt-RNA entspricht, die revers transkribiert werden musste, um die Menge cDNA des Standardkurven RT-Pools zu erhalten, in der sich dieselbe Menge der amplifizierten cDNA befindet wie in der vermessenen Probe.

##### 4.1.1.2 Kalibrierung

Die Genexpression wurde durch die Quantifizierung von cDNA, welche durch reverse Transkription von mRNA hergestellt worden war, relativ zu einem Kalibrator gemessen, der als physiologische Referenz diente. Der Kalibrator war eine willkürlich gewählte Probe, auf deren Messergebnisse alle anderen Probenmessungen kalibriert bzw. relativiert wurden. Deshalb war der Kalibrator idealerweise die „perfekte Kontrollprobe“.

##### 4.1.1.3 Normalisierung

Zusätzlich wurden bei der Real-Time PCR Normalisierungen auf endogene Kontrollen, also Housekeeping Gene (HK Gene), wie z.B. GAPDH, vorgenommen, um den Unterschieden in der Ausgangskonzentration, der Qualität der Gesamt-RNA und der Effizienz der reversen Transkription Rechnung zu tragen. Deshalb ergab sich folgende Formel, wobei es bezüglich der oben angesprochenen Kalibrierung nunmehr egal war, ob

- a) zunächst für jede Probe eine Normalisierung und dann die Kalibrierung oder
- b) zuerst für jede einzelne Genexpression (sowohl des Zielgens (ZG) als auch des Housekeeping Gens) eine Kalibrierung durchgeführt wurde,

da dies rechnerisch ineinander überführbare Gleichungen waren:

- a)  $(\text{Konz. ZG (Pat.)} / \text{Konz. HK Gen (Pat.)}) / (\text{Konz. ZG (Kal.)} / \text{Konz. HK Gen (Kal.)})$
- b)  $(\text{Konz. ZG (Pat.)} / \text{Konz. ZG (Kal.)}) / (\text{Konz. HK Gen (Pat.)} / \text{Konz. HK Gen (Kal.)})$ .

In der vorliegenden Arbeit bestand die Kontrollgruppe aus Spenderherzen mit  $n = 15$ . Diese sollte nun vorher sinnvoller Weise von unglaublichen „Ausreißern“ befreit werden (z.B. 800 g Normalherzgewicht), um anschließend eine Gruppe zu erhalten, deren Mittelwert der hypothetischen Idealkontrolle nahe kommt. Dadurch, daß dieser Mittelwert gleich „1“ gesetzt wurde, konnte durch das Kalibrieren jeder einzelne Patientenwert als x-faches dieses Kalibratorwertes angegeben werden.

## **4.2 Semiquantitative Auswertung**

### **4.2.1 Proteinexpression**

#### **4.2.1.1 Auswertung der Proteinmessung**

Um mit dem Ergebnis der Proteinmessung mit der ELISA-Platte im Photometer die Proteinkonzentration in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  zu berechnen, waren vier Rechenschritte notwendig:

1. Da der ELISA-Platten Reader die Proteinkonzentration in  $\mu\text{g}/\text{ml}$  angab, mussten alle Werte durch den Faktor 1000 dividiert werden, um die Konzentration in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  umzurechnen.
2. Um die vier Verdünnungsstufen vergleichen zu können, mussten sie mit den Faktoren 4 und 10 (5  $\mu\text{l}$  und 2  $\mu\text{l}$  der Originallösung) bzw. 40 und 100 (5  $\mu\text{l}$  und 2  $\mu\text{l}$  der 1:10 Verdünnung) multipliziert werden.
3. Aus diesen vier Werten wurde der Mittelwert für jede Probe und die Eigenextinktion des Proteinextraktionspuffers errechnet.
4. Im letzten Rechenschritt wurde der Wert der Eigenextinktion von dem Wert jeder Probe subtrahiert.

#### **4.2.1.2 Auswertung des Western Blot**

Die Resultate des Western Blot wurden durch Einscannen des entwickelten Filmmaterials in einen Flachbettscanner (Epson Perfection 2480, Meerbusch) gewonnen. Die dabei bestimmten Flächenintegrale über den Proteinbanden wurden mit dem Computerprogramm AlphaEase® FC (Alpha Innotech, USA) berechnet und nach Microsoft Excel exportiert.

In Anlehnung an die Standardkurvenberechnung, die Kalibrierung und die Normalisierung der mRNA-Werte wurden die Proteinwerte jeder Probe für Calcineurin A und GAPDH anhand der Standardkurven berechnet.

### **4.3 Statistische Auswertung**

Die errechneten Werte aus der PCR und dem Western Blot wurden in Diagrammen als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Die statistische Testung der Differenzen zwischen Gruppen erfolgte mit dem Mann-Whitney U Test. Für Korrelationen wurde der Pearson Korrelationskoeffizient errechnet. Unterschiede bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen. Die Berechnungen wurden mit den Programmen SPSS für Windows (SPSS Inc., Version 11.5) und Sigma Plot (Jandel Corporation) durchgeführt.

## C Ergebnisse

### 1 Calcineurin A m-RNA

Die Ergebnisse der m-RNA-Bestimmungen sind in Abbildung 9 bis Abbildung 18 dargestellt. Abgebildet sind jeweils zusätzlich zu den m-RNA-Mengen-Werten (Mittelwerte) der Standardfehler (SEM – englisch für: standard error of the mean), der p-Wert (für Signifikanz) und die Anzahl der Myokardproben, die untersucht wurden.

#### 1.1 Calcineurin A $\alpha$ , Spleissvarianten 1 und 2

##### 1.1.1 Heraufregulation der m-RNA-Expression bei AS

Die Ergebnisse der Bestimmungen der Calcineurin A  $\alpha$  1 und 2 m-RNA sind in Abbildung 9 dargestellt. Die Werte für die m-RNA-Mengen sind Relativwerte bezogen auf die Expression der GAPDH-m-RNA in den selben Myokardproben. Der Mittelwert dieses Verhältnisses in den Myokardproben der Kontrollen wurde auf den Wert 1 gesetzt, damit ein leichtes Verständnis der Zahlen möglich ist.

In der Patientengruppe mit Aortenstenose war eine signifikante Veränderung der Calcineurin A  $\alpha$  1 und 2 m-RNA-Expression auf 166% im Vergleich zur Expression in der Kontrollgruppe messbar ( $p \leq 0,05$ ). In der Patientengruppe mit dilatativer Kardiomyopathie zeigte sich keine signifikante Veränderung der Calcineurin A  $\alpha$  1 und 2 m-RNA-Expression im Vergleich zur Expression in der Kontrollgruppe (99% vs. Kontrollgruppe). In der Patientengruppe mit ischämischer Kardiomyopathie war eine geringfügige nicht signifikante Veränderung der m-RNA-Expression von Calcineurin A  $\alpha$  1 und 2 auf 107% im Vergleich zur m-RNA-Expression in der Kontrollgruppe messbar. In der Patientengruppe mit Aortenstenose zeigte sich eine nicht signifikante geschlechtsabhängige Regulation der m-RNA-Expression, deren Mittelwert bei den männlichen Patienten über dem der weiblichen Patienten lag ( $4,55 \pm 0,61$  vs.  $3,80 \pm 1,15$ , nicht dargestellt).

## Calcineurin A $\alpha$ 1 und 2 m-RNA

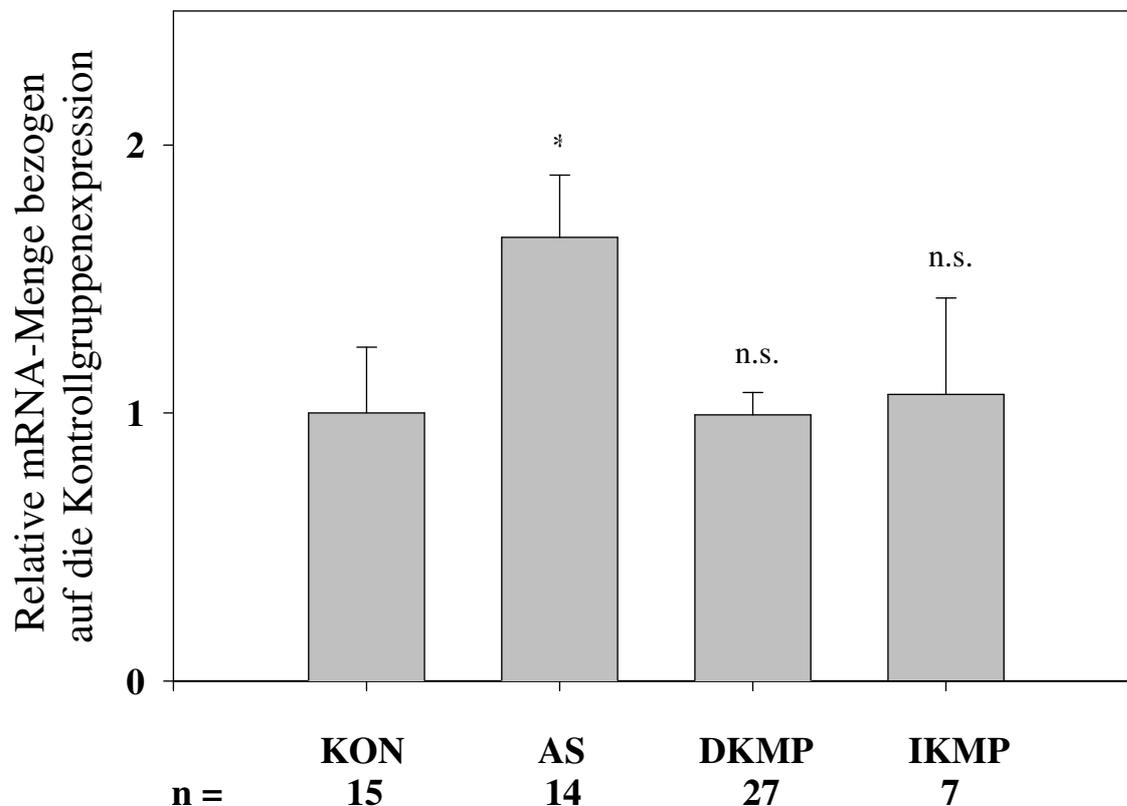


Abbildung 9: Calcineurin A  $\alpha$  1 und 2 m-RNA-Expression im Myokard von Kontrollen (KON), Patienten mit Aortenstenose (AS), dilatativer (DKMP) und ischämischer Kardiomyopathie (IKMP). Die Werte sind auf die Expressionswerte für GAPDH-m-RNA normalisiert und dann als Relativwerte zur Calcineurin A  $\alpha$  1 und 2/GAPDH-Expressionsrelation in der Kontrollgruppe dargestellt. Für die Signifikanz der Unterschiede zur Expressionsstärke in der Kontrollgruppe per Mann-Whitney U gilt: \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; nicht signifikant (n.s.).

### 1.1.2 Altersabhängigkeit der m-RNA-Expression in der Gruppe der DKMP

Die Ergebnisse der Bestimmungen der Calcineurin A  $\alpha$  1 und 2 m-RNA in jüngeren (<40 Jahre) und älteren (>40 Jahre) Patienten mit DKMP sind in der Abbildung 10 dargestellt. Die Werte für die m-RNA-Mengen sind Relativwerte bezogen auf die Expression der GAPDH-m-RNA in den selben Myokardproben.

In der Patientengruppe mit DKMP zeigte sich ein signifikanter Altersunterschied der Calcineurin A  $\alpha$  1 und 2 m-RNA-Expression ( $p \leq 0,05$ ). Die Patientengruppe mit DKMP setzte sich aus sieben jüngeren und 20 älteren Patienten zusammen. Der Mittelwert für die Calcineurin A  $\alpha$  1 und 2 m-RNA-Expression der jüngeren Patienten lag mit  $1,99 (\pm 0,36)$  signifikant höher als der Mittelwert für die Calcineurin A  $\alpha$  1 und 2 m-RNA-Expression der älteren Patienten ( $1,07 \pm 0,11$ ). Aufgrund der überwiegend männlich zusammengesetzten Patientengruppe mit DKMP konnten keine geschlechtsabhängigen Effekte untersucht werden.

## Calcineurin A $\alpha$ 1 und 2 m-RNA (DKMP)

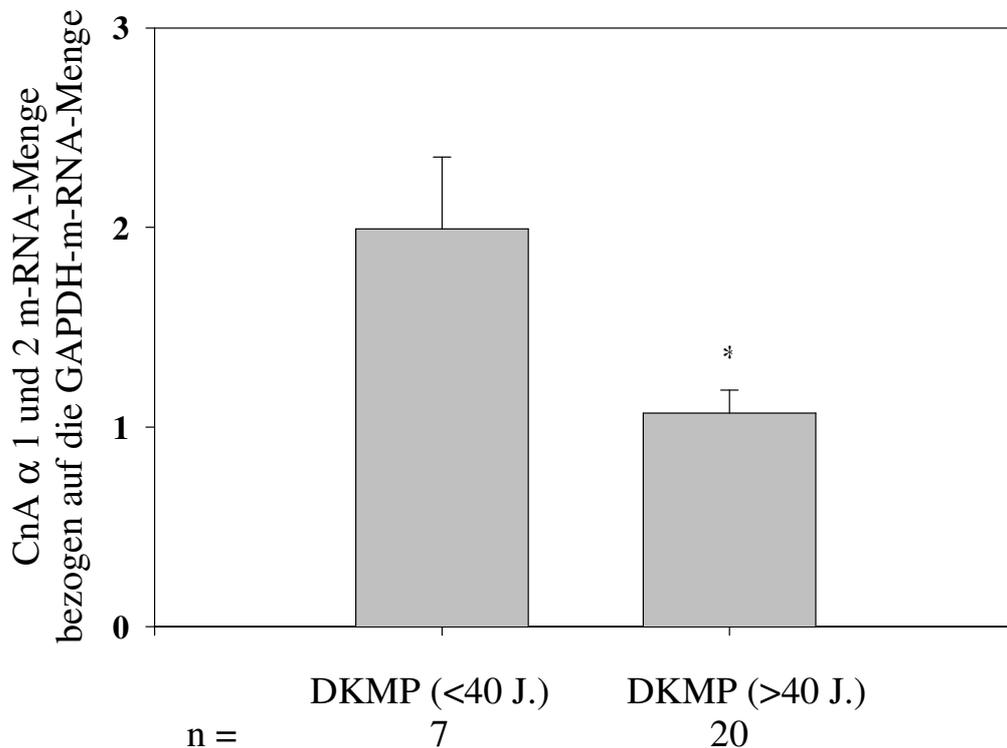


Abbildung 10: Calcineurin A  $\alpha$  1 und 2 m-RNA-Expression im Myokard von jüngeren und älteren Patienten mit DKMP. Die Werte sind auf die Expressionswerte für GAPDH-m-RNA normalisiert. Für die Signifikanz der Unterschiede der Expressionsstärke in den beiden Gruppen per Mann-Whitney U gilt: \* $p \leq 0,05$ .

## 1.2 Calcineurin A $\alpha$ , Spleissvarianten 1, 2 und 3

### 1.2.1 Heraufregulation der m-RNA-Expression bei DKMP

Die Ergebnisse der Bestimmungen der Calcineurin A  $\alpha$  1, 2 und 3 m-RNA sind in der Abbildung 11 dargestellt. Die Werte für die m-RNA-Mengen sind Relativwerte bezogen auf die Expression der GAPDH-m-RNA in den selben Myokardproben. Der Mittelwert dieses Verhältnisses in den Myokardproben der Kontrollen wurde auf den Wert 1 gesetzt, damit ein leichtes Verständnis der Zahlen möglich ist.

In der Patientengruppe mit Aortenstenose war keine signifikante Veränderung der Calcineurin A  $\alpha$  1, 2 und 3 m-RNA-Expression im Vergleich zur Expression in der Kontrollgruppe messbar (105% vs. Kontrollgruppe). In der Patientengruppe mit dilatativer Kardiomyopathie zeigte sich eine signifikante Veränderung der Calcineurin A  $\alpha$  1, 2 und 3 m-RNA-Expression auf 189% im Vergleich zur Expression in der Kontrollgruppe ( $p \leq 0,05$ ). In der Patientengruppe mit ischämischer Kardiomyopathie war eine geringfügige Veränderung der m-RNA-Expression von Calcineurin A  $\alpha$  1, 2 und 3 auf 88% im Vergleich zur m-RNA-

Expression in der Kontrollgruppe messbar. In der Patientengruppe mit DKMP konnte keine signifikante altersabhängige Regulation festgestellt werden.

### Calcineurin A $\alpha$ 1, 2 und 3 m-RNA

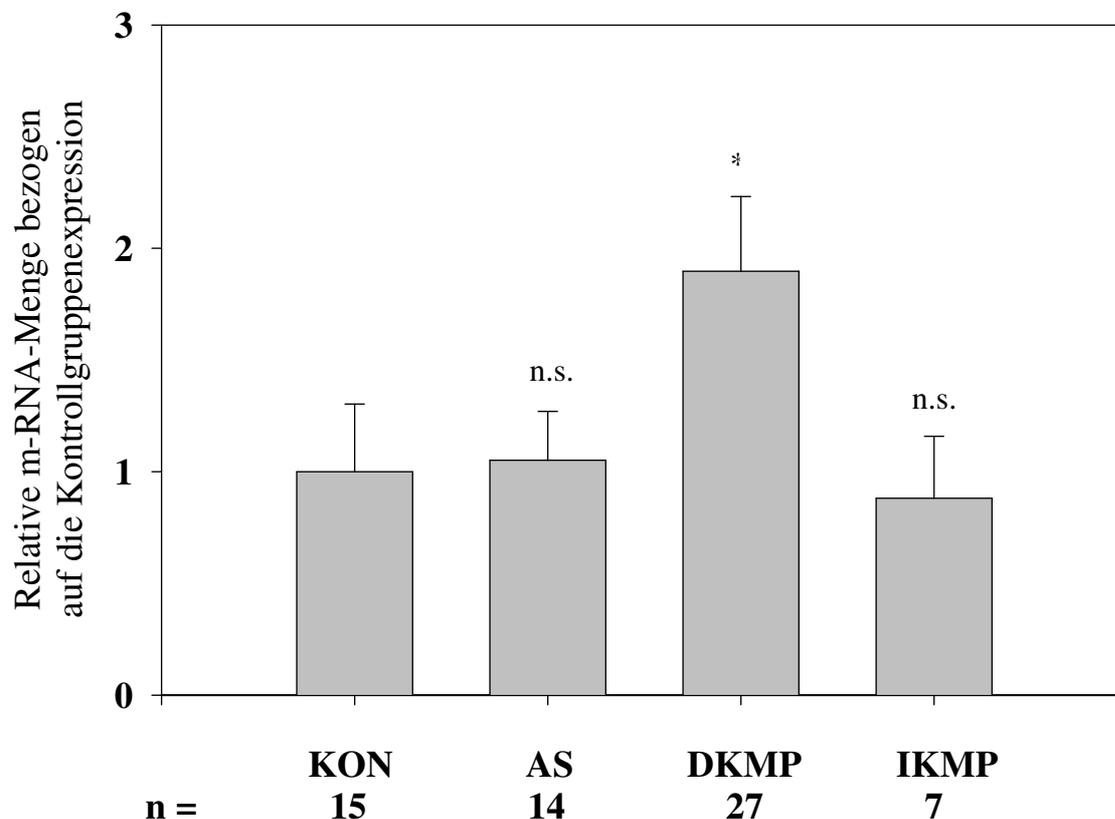


Abbildung 11: Calcineurin A  $\alpha$  1, 2 und 3 m-RNA-Expression im Myokard von Kontrollen (KON), Patienten mit Aortenstenose (AS), dilatativer (DKMP) und ischämischer Kardiomyopathie (IKMP). Die Werte sind auf die Expressionswerte für GAPDH-m-RNA normalisiert und dann als Relativwerte zur Calcineurin A  $\alpha$  1, 2 und 3/GAPDH-Expressionsrelation in der Kontrollgruppe dargestellt. Für die Signifikanz der Unterschiede zur Expressionsstärke in der Kontrollgruppe per Mann-Whitney U gilt: \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; nicht signifikant (n.s.).

#### 1.2.2 Geschlechtsabhängigkeit der m-RNA-Expression in der Gruppe der AS

Die Ergebnisse der Bestimmungen der Calcineurin A  $\alpha$  1, 2 und 3 m-RNA in weiblichen und männlichen Patienten mit Aortenstenose sind in der Abbildung 12 dargestellt. Die Werte für die m-RNA-Mengen sind Relativwerte bezogen auf die Expression der GAPDH-m-RNA in den selben Myokardproben.

In der Patientengruppe mit Aortenstenose zeigte sich ein signifikanter Geschlechtsunterschied der Calcineurin A  $\alpha$  1, 2 und 3 m-RNA-Expression ( $p \leq 0,05$ ). Die Patientengruppe mit Aortenstenose setzte sich aus sieben weiblichen und sieben männlichen Patienten zusammen. Der Mittelwert für die Calcineurin A  $\alpha$  1, 2 und 3 m-RNA-Expression der weiblichen

Patienten lag mit  $6,69 (\pm 2,64)$  signifikant niedriger als der Mittelwert für die Calcineurin A  $\alpha$  1, 2 und 3 m-RNA-Expression der männlichen Patienten ( $10,31 \pm 1,79$ ). In der Kontrollgruppe, die aus fünf weiblichen ( $0,64 \pm 0,23$ ) und zehn männlichen ( $7,23 \pm 3,26$ ) Organspendern bestand, zeigte sich aufgrund der hohen Streubreite ein nicht signifikanter Geschlechtsunterschied. Bei geschlechtsspezifischer Betrachtung jedoch waren die Mittelwerte der Patienten mit Aortenstenose signifikant höher als die der Kontrollen. Aufgrund der geringen Altersunterschiede in der Patientengruppe mit Aortenstenose konnten keine altersabhängigen Effekte untersucht werden.

### Calcineurin A $\alpha$ 1, 2 und 3 m-RNA (AS)

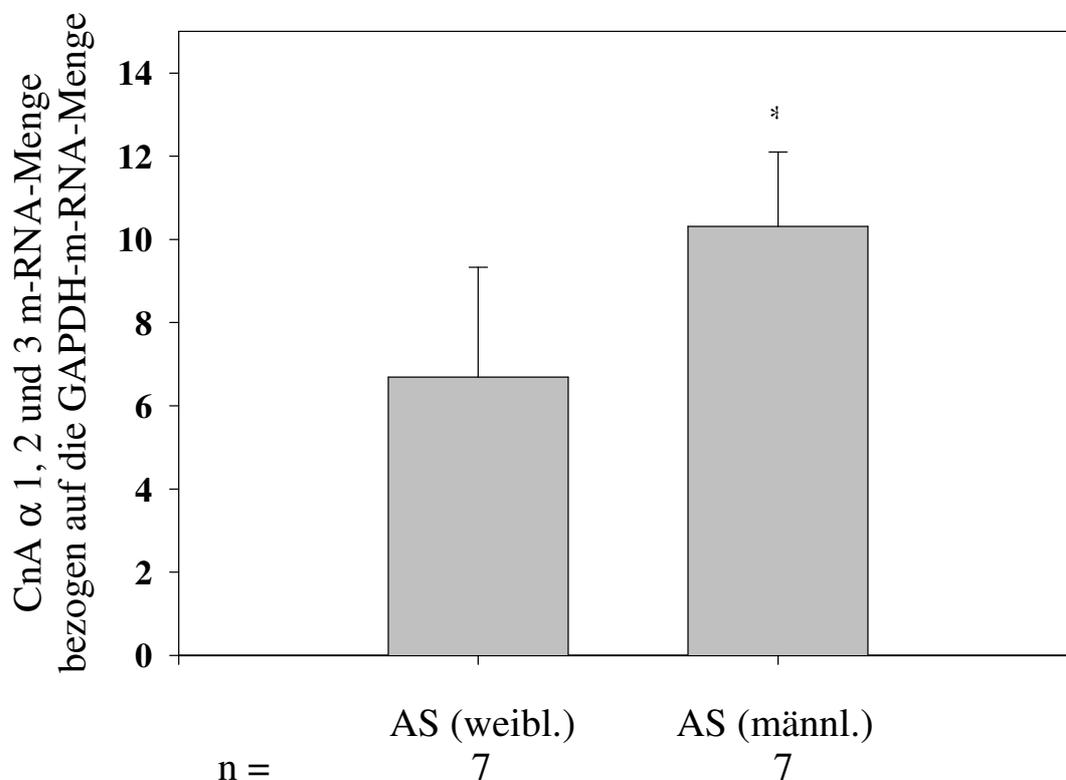


Abbildung 12: Calcineurin A  $\alpha$  1, 2 und 3 m-RNA-Expression im Myokard von weiblichen und männlichen Patienten mit Aortenstenose (AS). Die Werte sind auf die Expressionswerte für GAPDH-m-RNA normalisiert. Für die Signifikanz der Unterschiede der Expressionsstärke in den beiden Gruppen per Mann-Whitney U gilt: \* $p \leq 0,05$ .

## 1.3 Calcineurin A $\beta$ , Spleissvariante 1

### 1.3.1 Heraufregulation der m-RNA-Expression bei AS und DKMP

Die Ergebnisse der Bestimmungen der Calcineurin A  $\beta$  1 m-RNA sind in der Abbildung 13 dargestellt. Die Werte für die m-RNA-Mengen sind Relativwerte bezogen auf die Expression der GAPDH-m-RNA in den selben Myokardproben. Der Mittelwert dieses Verhältnisses in

den Myokardproben der Kontrollen wurde auf den Wert 1 gesetzt, damit ein leichtes Verständnis der Zahlen möglich ist.

In der Patientengruppe mit Aortenstenose war eine signifikante Veränderung der Calcineurin A  $\beta$  1 m-RNA-Expression im Vergleich zur m-RNA-Expression in der Kontrollgruppe messbar (176% vs. Kontrollgruppe,  $p \leq 0,01$ ). In der Patientengruppe mit dilatativer Kardiomyopathie zeigte sich eine signifikante Veränderung der Calcineurin A  $\beta$  1 m-RNA-Expression auf 148% im Vergleich zur m-RNA-Expression in der Kontrollgruppe ( $p \leq 0,01$ ). In der Patientengruppe mit ischämischer Kardiomyopathie war nur eine geringfügige Veränderung der m-RNA-Expression von Calcineurin A  $\beta$  1 auf 118% im Vergleich zur m-RNA-Expression in der Kontrollgruppe messbar. In der Patientengruppe mit Aortenstenose zeigte sich eine nicht signifikante geschlechtsabhängige Regulation der m-RNA-Expression, deren Mittelwert bei den männlichen Patienten über dem der weiblichen Patienten lag ( $9,48 \pm 2,30$  vs.  $5,90 \pm 1,02$ , nicht dargestellt).

### Calcineurin A $\beta$ 1 m-RNA

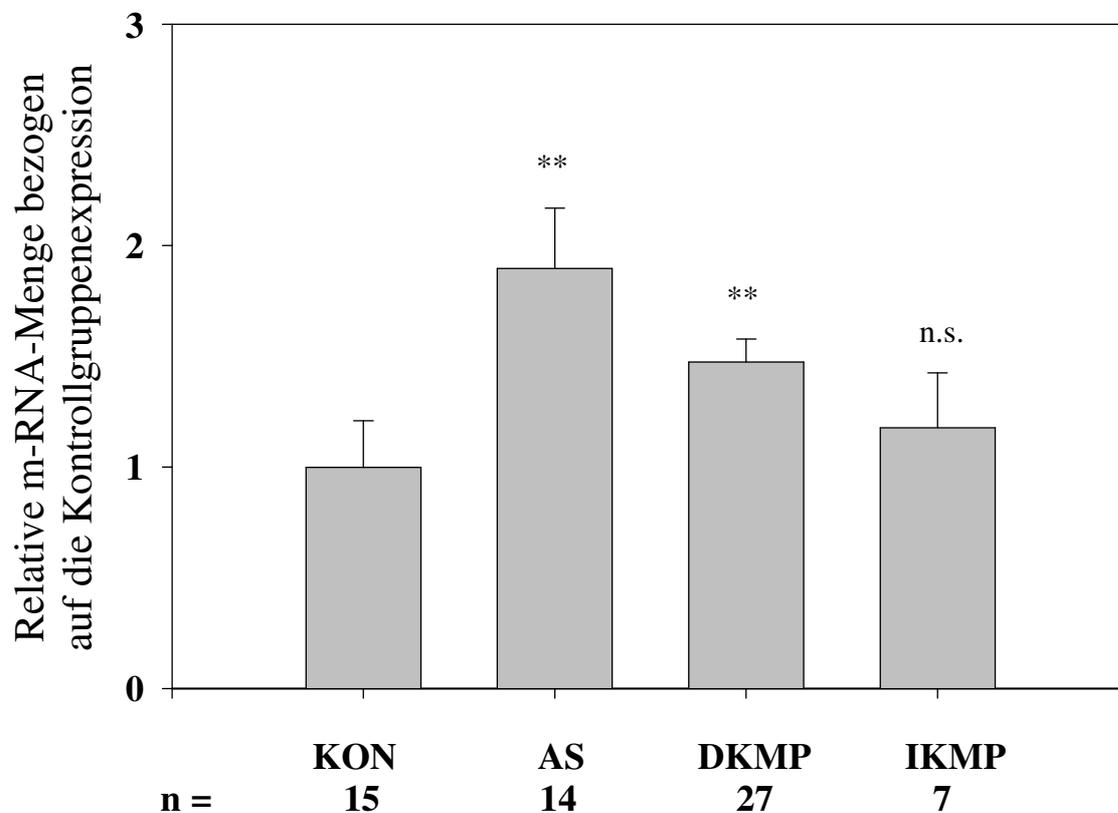


Abbildung 13: Calcineurin A  $\beta$  1 m-RNA-Expression im Myokard von Kontrollen (KON), Patienten mit Aortenstenose (AS), dilatativer (DKMP) und ischämischer Kardiomyopathie (IKMP). Die Werte sind auf die Expressionswerte für GAPDH-m-RNA normalisiert und dann als Relativwerte zur Calcineurin A  $\beta$

1/GAPDH-Expressionsrelation in der Kontrollgruppe dargestellt. Für die Signifikanz der Unterschiede zur Expressionsstärke in der Kontrollgruppe per Mann-Whitney U gilt: \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; nicht signifikant (n.s.).

### 1.3.2 Altersabhängigkeit der m-RNA-Expression in der Gruppe der DKMP

Die Ergebnisse der Bestimmungen der Calcineurin A  $\beta$  1 m-RNA in jüngeren (<40 Jahre) und älteren (>40 Jahre) Patienten mit DKMP sind in der Abbildung 14 dargestellt. Die Werte für die m-RNA-Mengen sind Relativwerte bezogen auf die Expression der GAPDH-m-RNA in den selben Myokardproben.

In der Patientengruppe mit DKMP zeigte sich ein signifikanter Altersunterschied der Calcineurin A  $\beta$  1 m-RNA-Expression ( $p \leq 0,05$ ). Die Patientengruppe mit DKMP setzte sich aus sieben jüngeren und 20 älteren Patienten zusammen. Der Mittelwert für die Calcineurin A  $\beta$  1 m-RNA-Expression der jüngeren Patienten lag mit  $3,32 (\pm 0,70)$  signifikant höher als der Mittelwert für die Calcineurin A  $\beta$  1 m-RNA-Expression der älteren Patienten ( $1,73 \pm 0,23$ ).

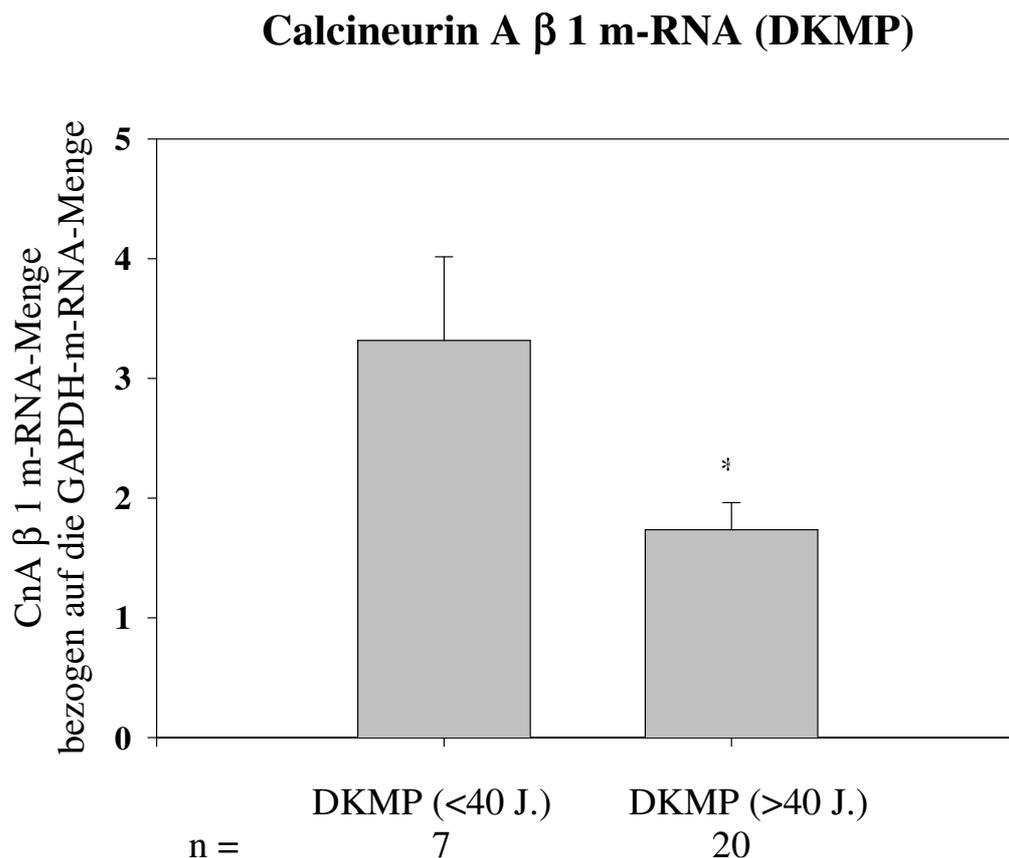


Abbildung 14: Calcineurin A  $\beta$  1 m-RNA-Expression im Myokard von jüngeren und älteren Patienten mit DKMP. Die Werte sind auf die Expressionswerte für GAPDH-m-RNA normalisiert. Für die Signifikanz der Unterschiede der Expressionsstärke in den beiden Gruppen per Mann-Whitney U gilt: \* $p \leq 0,05$ .

## 1.4 Calcineurin A $\beta$ , Spleissvarianten 1 und 2

### 1.4.1 Heraufregulation der m-RNA-Expression bei AS und DKMP

Die Ergebnisse der Bestimmungen der Calcineurin A  $\beta$  1 und 2 m-RNA sind in der Abbildung 15 dargestellt. Die Werte für die m-RNA-Mengen sind Relativwerte bezogen auf die Expression der GAPDH-m-RNA in den selben Myokardproben. Der Mittelwert dieses Verhältnisses in den Myokardproben der Kontrollen wurde auf den Wert 1 gesetzt, damit ein leichtes Verständnis der Zahlen möglich ist.

In der Patientengruppe mit Aortenstenose war eine signifikante Veränderung der Calcineurin A  $\beta$  1 und 2-Expression im Vergleich zur Expression in der Kontrollgruppe messbar (174% vs. Kontrollgruppe,  $p \leq 0,05$ ). In der Patientengruppe mit dilatativer Kardiomyopathie zeigte sich eine signifikante Veränderung der Calcineurin A  $\beta$  1 und 2-Expression auf 150% im Vergleich zur Expression in der Kontrollgruppe ( $p \leq 0,05$ ). In der Patientengruppe mit ischämischer Kardiomyopathie war eine geringfügige Veränderung der Expression von Calcineurin A  $\beta$  1 und 2 auf 122% im Vergleich zur Expression in der Kontrollgruppe messbar. In der Patientengruppe mit Aortenstenose zeigte sich eine nicht signifikante geschlechtsabhängige Regulation der m-RNA-Expression, deren Mittelwert bei den männlichen Patienten über dem der weiblichen Patienten lag ( $7,38 \pm 2,54$  vs.  $5,44 \pm 0,92$ , nicht dargestellt).

## Calcineurin A $\beta$ 1 und 2 m-RNA

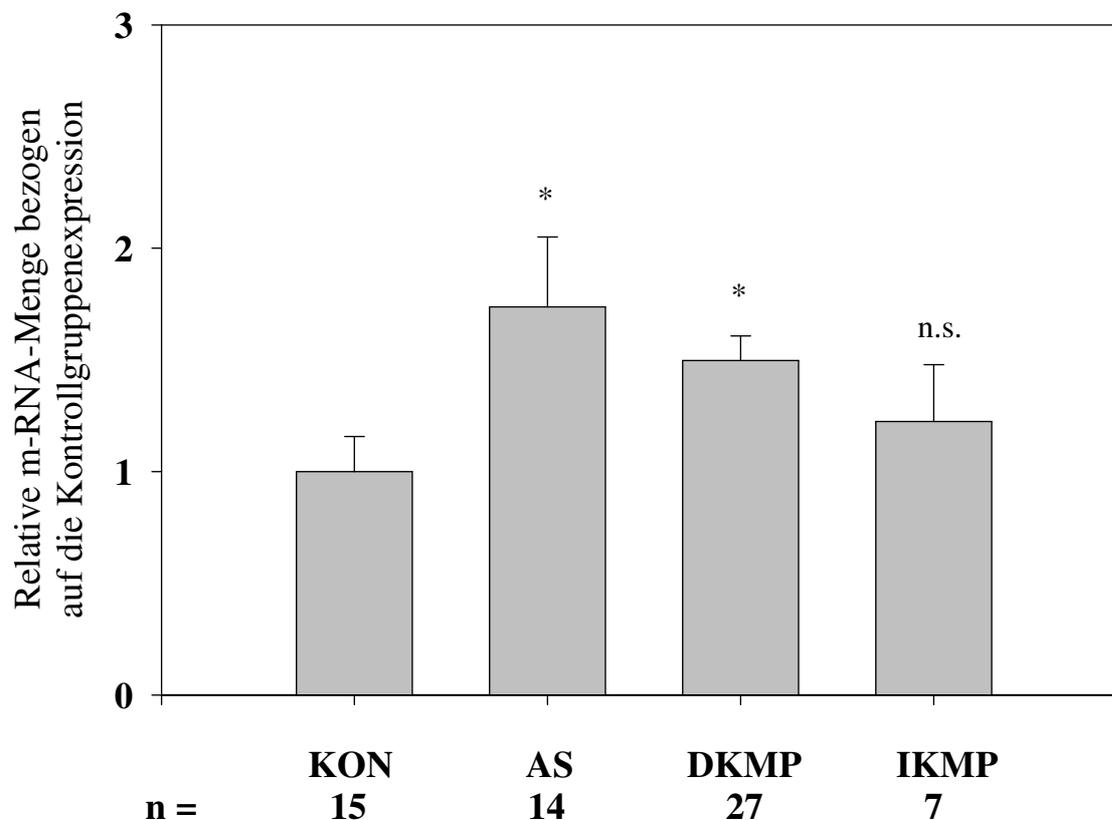


Abbildung 15: Calcineurin A  $\beta$  1 und 2 m-RNA-Expression im Myokard von Kontrollen (KON), Patienten mit Aortenstenose (AS), dilatativer (DKMP) und ischämischer Kardiomyopathie (IKMP). Die Werte sind auf die Expressionswerte für GAPDH-m-RNA normalisiert und dann als Relativwerte zur Calcineurin A  $\beta$  1 und 2/GAPDH-Expressionsrelation in der Kontrollgruppe dargestellt. Für die Signifikanz der Unterschiede zur Expressionsstärke in der Kontrollgruppe per Mann-Whitney U gilt: \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; nicht signifikant (n.s.).

### 1.4.2 Altersabhängigkeit der m-RNA-Expression in der Gruppe der DKMP

Die Ergebnisse der Bestimmungen der Calcineurin A  $\beta$  1 und 2 m-RNA in jüngeren (<40 Jahre) und älteren (>40 Jahre) Patienten mit DKMP sind in der Abbildung 16 dargestellt. Die Werte für die m-RNA-Mengen sind Relativwerte bezogen auf die Expression der GAPDH-m-RNA in den selben Myokardproben.

In der Patientengruppe mit DKMP zeigte sich ein signifikanter Altersunterschied der Calcineurin A  $\beta$  1 und 2 -Expression ( $p \leq 0,01$ ). Die Patientengruppe mit DKMP setzte sich aus sieben jüngeren und 20 älteren Patienten zusammen. Der Mittelwert für die Calcineurin A  $\beta$  1 und 2-Expression der jüngeren Patienten lag mit  $3,63 (\pm 0,95)$  signifikant höher als der Mittelwert für die Calcineurin A  $\alpha$  1 und 2-Expression der älteren Patienten ( $1,42 \pm 0,14$ ).

## Calcineurin A $\beta$ 1 und 2 m-RNA (DKMP)

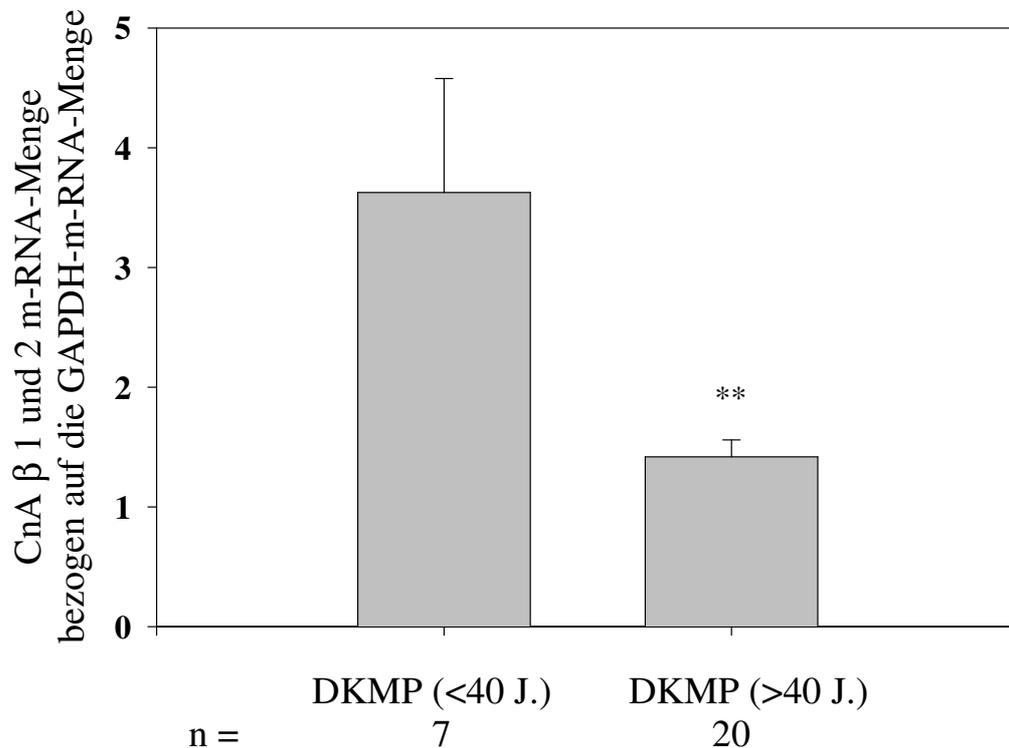


Abbildung 16: Calcineurin A  $\beta$  1 und 2 m-RNA-Expression im Myokard von jüngeren und älteren Patienten mit DKMP. Die Werte sind auf die Expressionswerte für GAPDH-m-RNA normalisiert. Für die Signifikanz der Unterschiede der Expressionsstärke in den beiden Gruppen per Mann-Whitney U gilt: \*\* $p \leq 0,01$ .

## 1.5 ANP

### 1.5.1 Heraufregulation der m-RNA-Expression bei AS und DKMP

Die Ergebnisse der Bestimmungen der ANP m-RNA sind in der Abbildung 17 dargestellt. Die Werte für die m-RNA-Mengen sind Relativwerte bezogen auf die Expression der GAPDH-m-RNA in den selben Myokardproben. Der Mittelwert dieses Verhältnisses in den Myokardproben der Kontrollen wurde auf den Wert 1 gesetzt, damit ein leichtes Verständnis der Zahlen möglich ist.

In der Patientengruppe mit Aortenstenose war eine signifikante 83-fache Erhöhung der ANP-Expression im Vergleich zur Expression in der Kontrollgruppe messbar ( $p \leq 0,01$ ). In der Patientengruppe mit dilatativer Kardiomyopathie zeigte sich eine signifikante 59-fache Erhöhung der ANP-Expression im Vergleich zur Expression in der Kontrollgruppe ( $p \leq 0,01$ ). In der Patientengruppe mit ischämischer Kardiomyopathie war aufgrund der hohen Streubreite eine nicht signifikante Erhöhung der Expression von ANP auf das 62-fache im Vergleich zur Expression in der Kontrollgruppe messbar. In der Patientengruppe mit

Aortenstenose zeigte sich eine nicht signifikante geschlechtsabhängige Regulation der m-RNA-Expression, deren Mittelwert bei den männlichen Patienten über dem der weiblichen Patienten lag ( $12,05 \pm 4,25$  vs.  $3,56 \pm 2,26$ , nicht dargestellt). In der Patientengruppe mit DKMP zeigte sich eine nicht signifikante altersabhängige Regulation der m-RNA-Expression, deren Mittelwert bei den jüngeren Patienten (<40 J.) über dem der älteren Patienten (>40 J.) lag ( $16,92 \pm 13,12$  vs.  $1,94 \pm 0,55$ , nicht dargestellt).

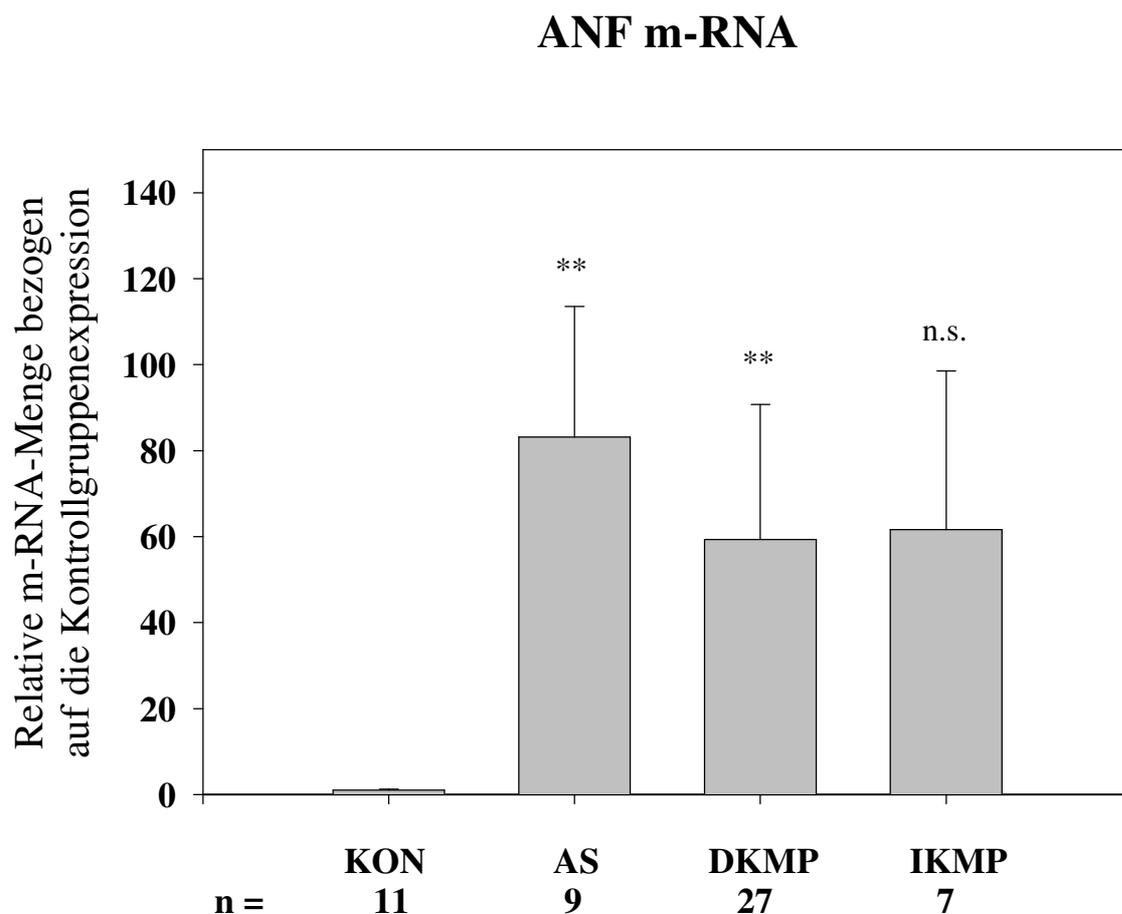


Abbildung 17: ANP m-RNA-Expression im Myokard von Kontrollen (KON), Patienten mit Aortenstenose (AS), dilatativer (DKMP) und ischämischer Kardiomyopathie (IKMP). Die Werte sind auf die Expressionswerte für GAPDH-m-RNA normalisiert und dann als Relativwerte zur ANP/GAPDH-Expressionsrelation in der Kontrollgruppe dargestellt. Für die Signifikanz der Unterschiede zur Expressionsstärke in der Kontrollgruppe per Mann-Whitney U gilt: \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; nicht signifikant (n.s.).

## 1.6 BNP

### 1.6.1 Heraufregulation der m-RNA-Expression bei AS, DKMP und IKMP

Die Ergebnisse der Bestimmungen der BNP m-RNA sind in der Abbildung 18 dargestellt. Die Werte für die m-RNA-Mengen sind Relativwerte bezogen auf die Expression der GAPDH-m-RNA in den selben Myokardproben. Der Mittelwert dieses Verhältnisses in den

Myokardproben der Kontrollen wurde auf den Wert 1 gesetzt, damit ein leichtes Verständnis der Zahlen möglich ist.

In der Patientengruppe mit Aortenstenose war eine signifikante 12-fache Erhöhung der BNP-Expression im Vergleich zur Expression in der Kontrollgruppe messbar ( $p \leq 0,01$ ). In der Patientengruppe mit dilatativer Kardiomyopathie zeigte sich eine signifikante 6-fache Erhöhung der BNP-Expression im Vergleich zur Expression in der Kontrollgruppe ( $p \leq 0,01$ ). In der Patientengruppe mit ischämischer Kardiomyopathie war eine signifikante Erhöhung der Expression von BNP auf das 5-fache im Vergleich zur Expression in der Kontrollgruppe messbar ( $p \leq 0,01$ ). In der Patientengruppe mit Aortenstenose zeigte sich eine nicht signifikante geschlechtsabhängige Regulation der m-RNA-Expression, deren Mittelwert bei den männlichen Patienten über dem der weiblichen Patienten lag ( $6,95 \pm 3,43$  vs.  $1,79 \pm 0,65$ , nicht dargestellt). In der Patientengruppe mit DKMP zeigte sich keine signifikante altersabhängige Regulation der m-RNA-Expression.

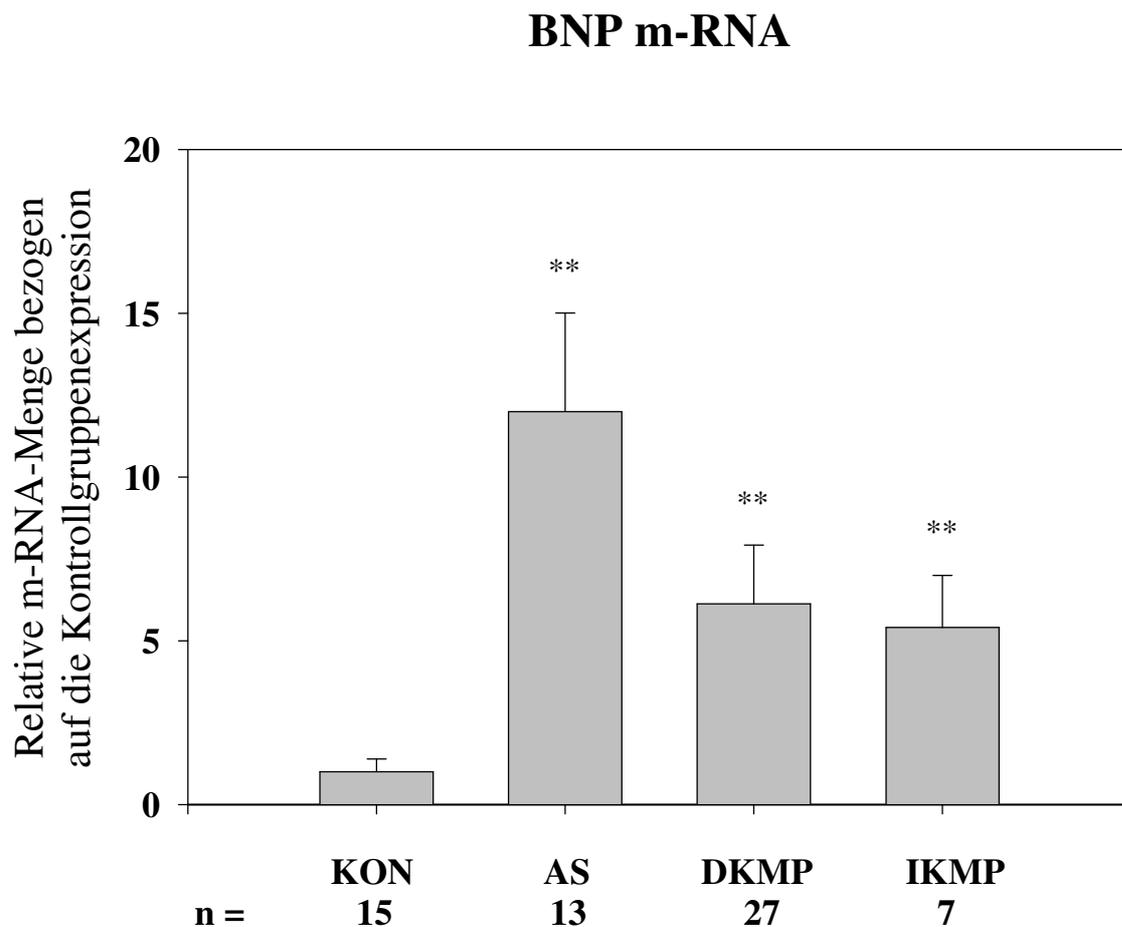


Abbildung 18: BNP m-RNA-Expression im Myokard von Kontrollen (KON), Patienten mit Aortenstenose (AS), dilatativer (DKMP) und ischämischer Kardiomyopathie (IKMP). Die Werte sind auf die Expressionswerte für GAPDH-m-RNA normalisiert und dann als Relativwerte zur BNP/GAPDH-

Expressionsrelation in der Kontrollgruppe dargestellt. Für die Signifikanz der Unterschiede zur Expressionsstärke in der Kontrollgruppe per Mann-Whitney U gilt: \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; nicht signifikant (n.s.).

## 1.7 Korrelation der m-RNA-Expressionsdaten

Um die möglichen Beziehungen zwischen den m-RNA-Mengen der gemessenen Zielgene zu prüfen, wurden die auf die Expressionswerte für GAPDH-m-RNA normalisierten Werte der Zielgene mit Hilfe einer Korrelationsanalyse nach Pearson untersucht.

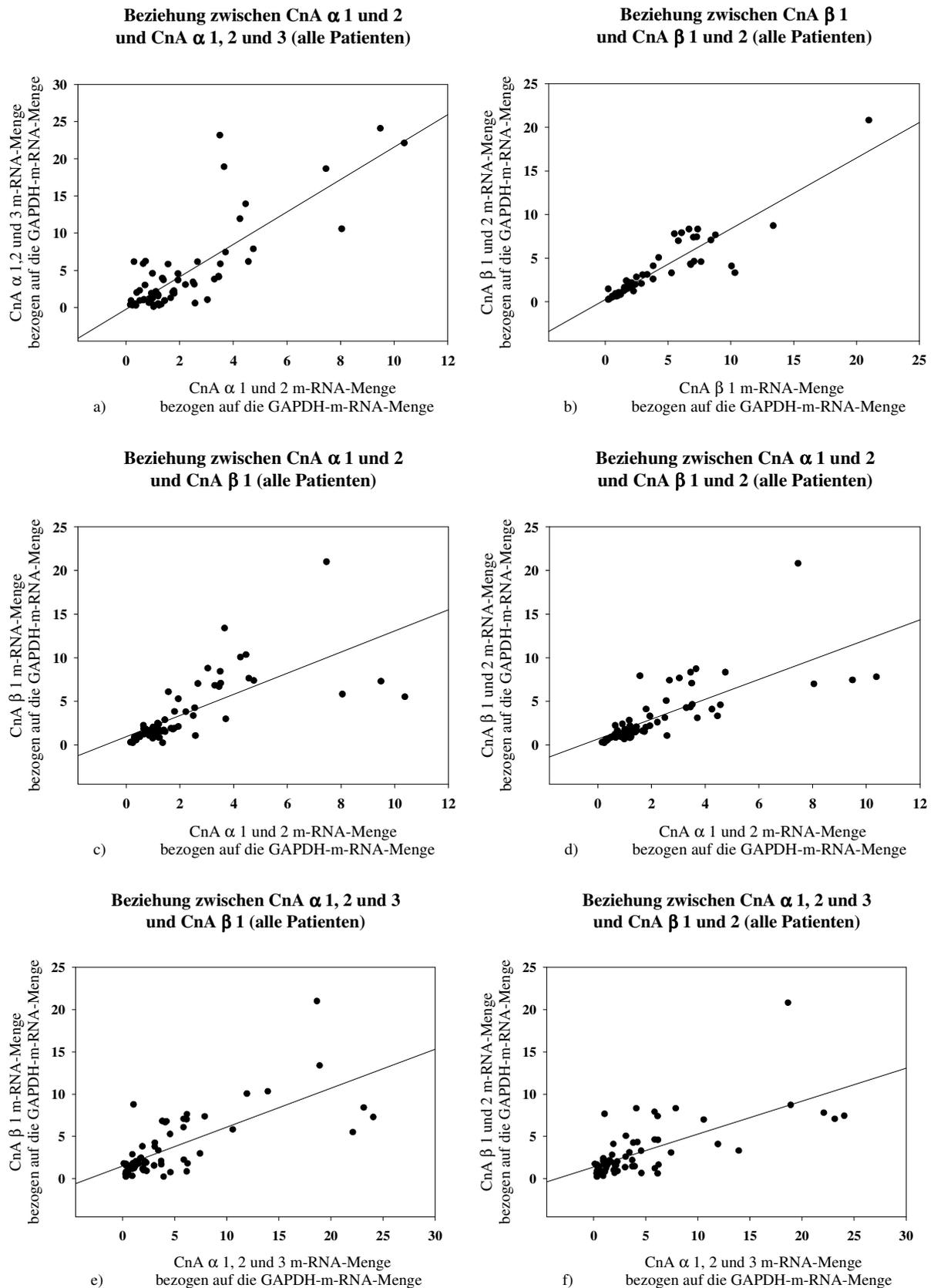
### 1.7.1 Positive Korrelationen zwischen den Calcineurin A Spleissvarianten

In Tabelle 4 und Abbildung 19 sind die Ergebnisse der Korrelationen der Spleissvarianten dargestellt. Die Untersuchung erfolgte nicht gruppenspezifisch, d.h. es wurden jeweils alle Patienten und Kontrollen zusammen betrachtet. Es wurden sowohl die Beziehungen zwischen den Spleissvarianten der Isoform  $\alpha$ , zwischen den Spleissvarianten der Isoform  $\beta$  als auch zwischen den Spleissvarianten beider Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  untersucht.

Bei den sechs möglichen Beziehungen zeigte sich jeweils eine signifikant positive Korrelation zwischen den auf die Expressionswerte für GAPDH-m-RNA normalisierten Werten der Zielgene.

		CnA $\alpha$ 1, 2 und 3/ GAPDH	CnA $\beta$ 1/ GAPDH	CnA $\beta$ 1 und 2/ GAPDH
CnA $\alpha$ 1 und 2/ GAPDH	r	0,806	0,697	0,733
	p	0,001	0,001	0,001
CnA $\alpha$ 1, 2 und 3/ GAPDH	r		0,716	0,678
	p		0,001	0,001
CnA $\beta$ 1/ GAPDH	r			0,908
	p			0,001

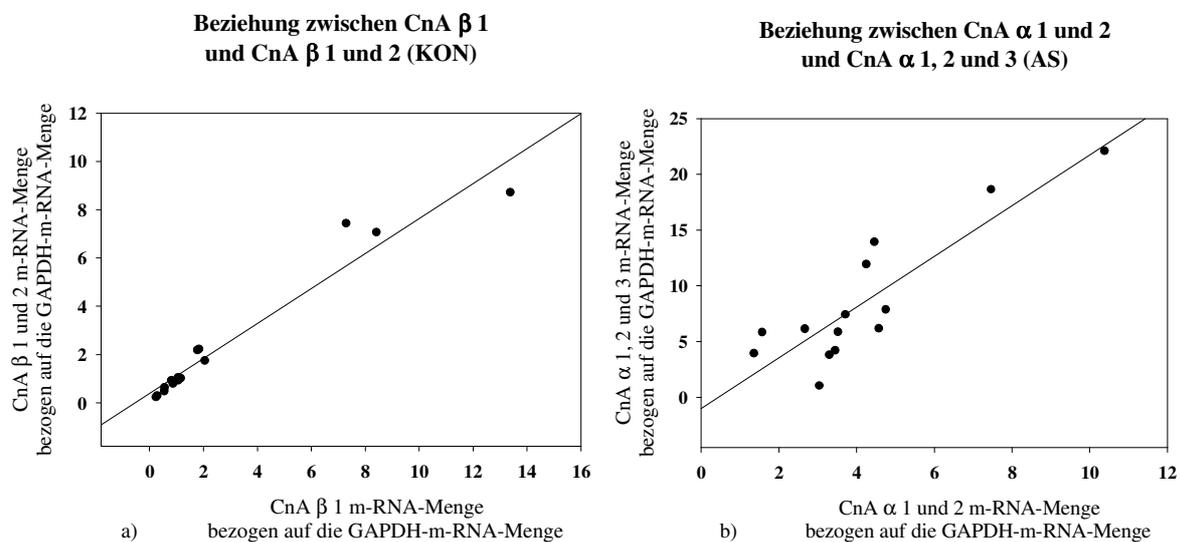
**Tabelle 4: BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DEN SPLEISSVARIANTEN IN DER GESAMTGRUPPE:** Korrelationen der auf die Expressionswerte für GAPDH-m-RNA normalisierten m-RNA-Mengen der Zielgene; angegeben sind jeweils der Korrelationskoeffizient r und der p-Wert für die Signifikanz.



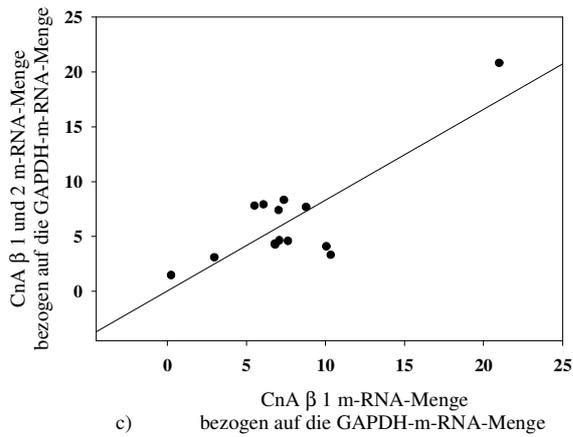
**Abbildung 19:** a) bis f): **BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DEN SPLEISSVARIANTEN IN DER GESAMTGRUPPE:** graphische Darstellung der Beziehungen zwischen der auf die Expressionswerte für GAPDH-m-RNA normalisierten m-RNA-Expression der Spleissvarianten der beiden Isoformen Calcineurin A  $\alpha$  und  $\beta$  in der Gesamtgruppe (alle Patienten und Kontrollen) mit eingezeichneter Regressionsgerade.

In Abbildung 20 sind die Ergebnisse der Korrelationen der Spleissvarianten dargestellt. Die Untersuchung erfolgte gruppenspezifisch, d.h. es wurden jeweils die Kontrollen, die Patienten mit AS, mit DKMP und mit IKMP zusammen betrachtet. Es wurden sowohl die Beziehungen zwischen den Spleissvarianten der Isoform  $\alpha$ , zwischen den Spleissvarianten der Isoform  $\beta$  als auch zwischen den Spleissvarianten beider Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  untersucht.

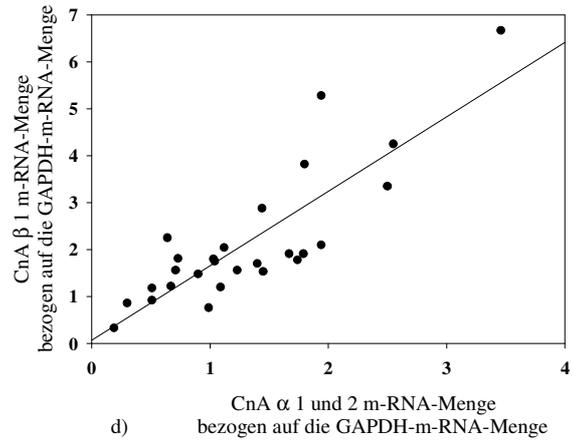
Von den sechs möglichen Beziehungen in der Kontrollgruppe zeigte sich zwischen den Spleissvarianten der  $\beta$  Isoform eine signifikant positive Korrelation ( $r=0,972$ ,  $p\leq 0,01$ ). In der Gruppe der AS zeigten sich in zwei Fällen signifikant positive Korrelationen. So waren jeweils die Spleissvarianten der Calcineurin A  $\alpha$  Isoform ( $r=0,876$ ,  $p\leq 0,01$ ) und die Spleissvarianten der  $\beta$  Isoform signifikant positiv korreliert ( $r=0,819$ ,  $p\leq 0,01$ ). In der Gruppe der DKMP zeigten sich signifikant positive Korrelationen zwischen Calcineurin A  $\alpha$  1 und 2 und den Spleissvarianten der  $\beta$  Isoform ( $r=0,893$ ,  $p\leq 0,01$  und  $r=0,875$ ,  $p\leq 0,01$ ) und zwischen den Spleissvarianten der  $\beta$  Isoform selber ( $r=0,934$ ,  $p\leq 0,01$ ). Bei den Patienten mit IKMP zeigten sich drei signifikant positive Korrelationen zwischen Calcineurin A  $\beta$  1 und den Spleissvarianten der  $\alpha$  Isoform ( $r=0,924$ ,  $p\leq 0,01$  und  $r=0,904$ ,  $p\leq 0,01$ ) und zwischen den Spleissvarianten der  $\beta$  Isoform selber ( $r=0,928$ ,  $p\leq 0,01$ ).



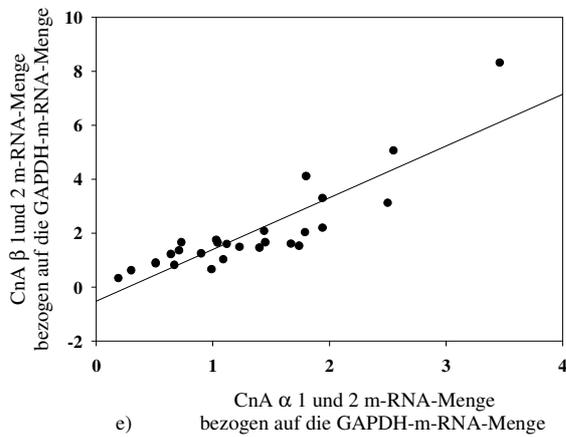
**Beziehung zwischen CnA  $\beta$  1 und CnA  $\beta$  1 und 2 (AS)**



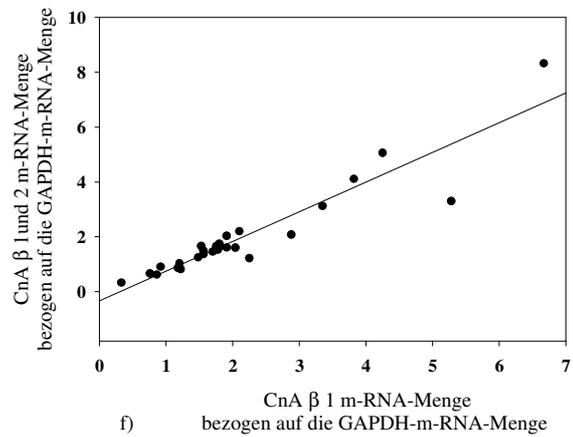
**Beziehung zwischen CnA  $\alpha$  1 und 2 und CnA  $\beta$  1 (DKMP)**



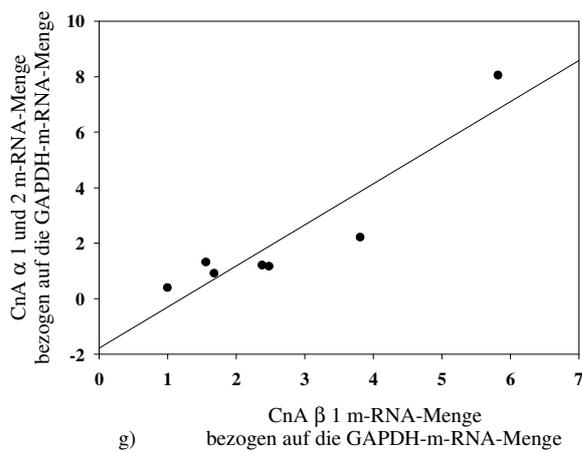
**Beziehung zwischen CnA  $\alpha$  1 und 2 und CnA  $\beta$  1 und 2 (DKMP)**



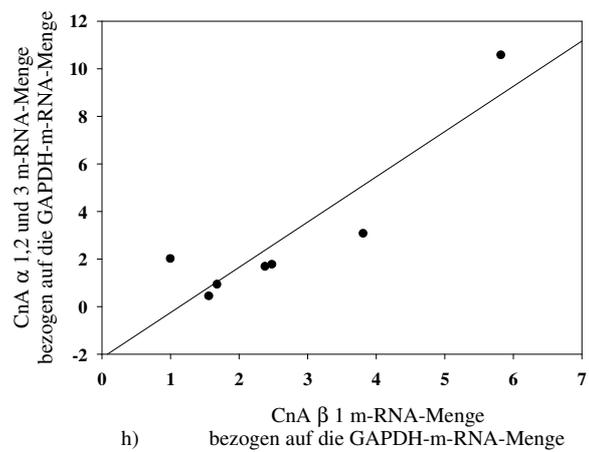
**Beziehung zwischen CnA  $\beta$  1 und CnA  $\beta$  1 und 2 (DKMP)**

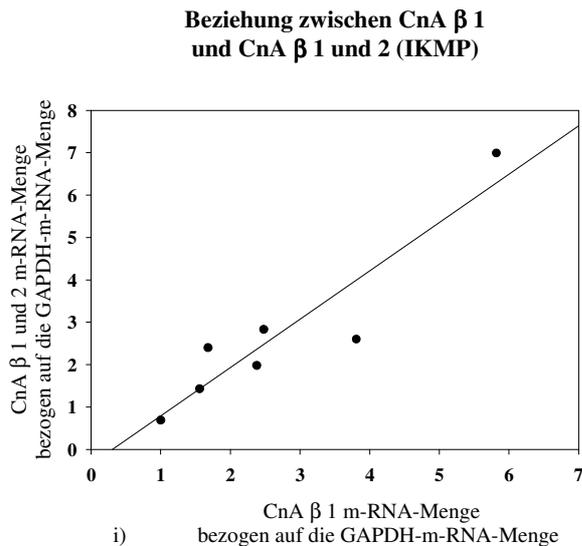


**Beziehung zwischen CnA  $\beta$  1 und CnA  $\alpha$  1 und 2 (IKMP)**



**Beziehung zwischen CnA  $\beta$  1 und CnA  $\alpha$  1,2 und 3 (IKMP)**

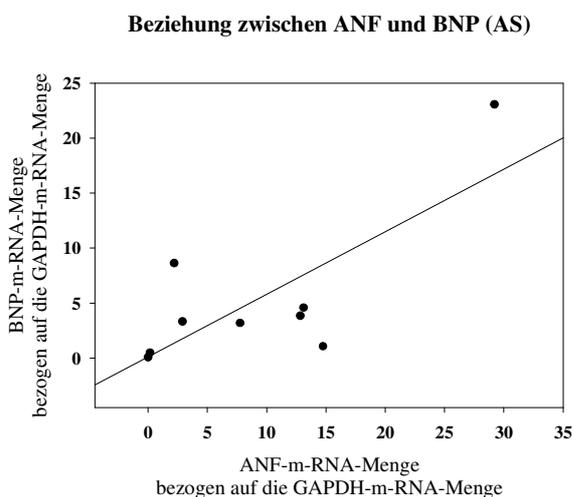




**Abbildung 20: a) bis i): BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DEN SPLEISSVARIANTEN IN DEN EINZELNEN UNTERGRUPPEN:** graphische Darstellung der Beziehungen zwischen der auf die Expressionswerte für GAPDH-m-RNA normalisierten m-RNA-Expression der Spleissvarianten der beiden Isoformen Calcineurin A  $\alpha$  und  $\beta$  in der Kontrollgruppe, in der Gruppe der AS, der DKMP und der IKMP mit eingezeichneter Regressionsgerade. Die anderen möglichen nicht abgebildeten Beziehungen zwischen den Spleissvarianten zeigten keine signifikanten Korrelationen.

### 1.7.2 Positive Korrelation zwischen ANP und BNP

In Abbildung 21 sind die Ergebnisse der Korrelation der beiden Hypertrophiemarker ANP und BNP dargestellt. In der Gesamtgruppe zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen ANP und BNP. Bei den Untergruppen zeigte sich nur in der Gruppe der AS eine signifikant positive Korrelation zwischen den beiden Hypertrophiemarkern ( $r=0,756$ ,  $p\leq 0,05$ ).



**Abbildung 21: BEZIEHUNG ZWISCHEN ANP UND BNP BEI PATIENTEN MIT AS:** graphische Darstellung der Beziehung zwischen der auf die Expressionswerte für GAPDH-m-RNA normalisierten m-RNA-Expression der beiden Hypertrophiemarker mit eingezeichneter Regressionsgerade.

### 1.7.3 Keine Korrelation zwischen Calcineurin A und ANP/BNP

Bei der Untersuchung der Beziehungen zwischen der m-RNA-Expression der Spleissvarianten von Calcineurin A  $\alpha$  und A  $\beta$  und der m-RNA-Expression der Hypertrophiemarker ANP und BNP zeigten sich weder in der Gesamtgruppe noch in den einzelnen Patientengruppen mit AS, DKMP oder IKMP oder den Kontrollen signifikante Korrelationen.

### 1.8 Korrelation der m-RNA-Expressionsdaten mit klinischen Parametern

Um die möglichen Beziehungen zwischen den m-RNA-Mengen der gemessenen Zielgene und den klinischen Parametern zu prüfen, wurden die auf die Expressionswerte für GAPDH-m-RNA normalisierten Werte der Zielgene und die klinischen Daten mit Hilfe einer Korrelationsanalyse nach Pearson untersucht.

In Tabelle 5 und Abbildung 22 bis Abbildung 26 sind die Ergebnisse der Korrelationen zwischen den klinischen Daten und den Spleissvarianten von Calcineurin A  $\alpha$  und A  $\beta$  dargestellt. In der Gesamtgruppe aller Patienten (AS, DKMP und IKMP zusammen) zeigten sich signifikante Korrelationen zwischen den klinischen Daten (LVEF, FS, LVESD, LVEDD und Patientenalter) und fast allen Spleissvarianten von Calcineurin A  $\alpha$  und A  $\beta$ . Zwischen den klinischen Daten und den beiden Hypertrophiemarkern ANP und BNP wurden in der Gesamtgruppe aller Patienten (AS, DKMP und IKMP zusammen) keine signifikanten Korrelationen festgestellt.

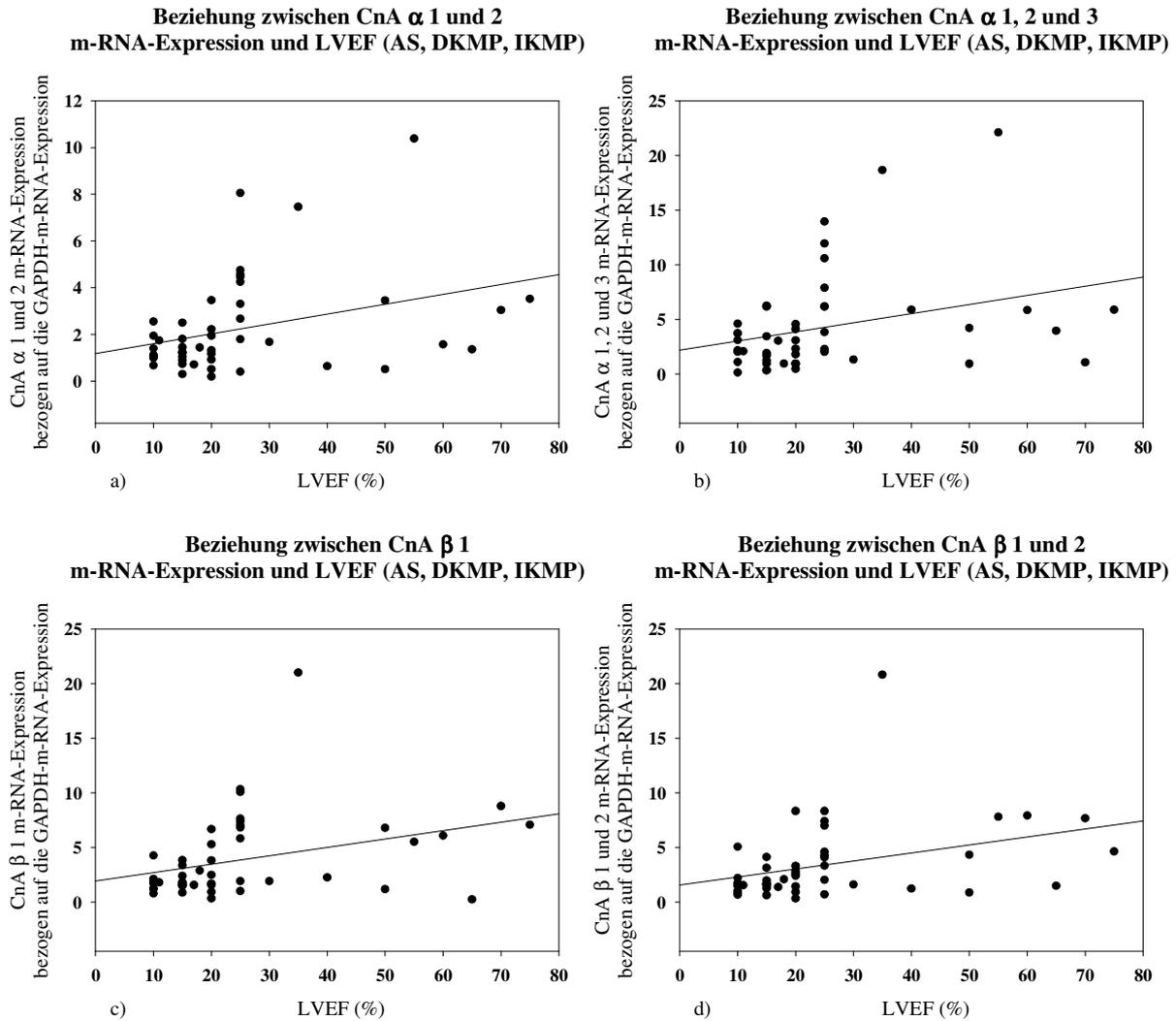
Die Ergebnisse der Korrelation sowohl zwischen den klinischen Daten und den Spleissvarianten von Calcineurin A  $\alpha$  und A  $\beta$  als auch zwischen den klinischen Daten und den beiden Hypertrophiemarkern, die gruppenspezifisch (Gruppe der AS, der DKMP und der IKMP jeweils einzeln) erfolgte, sind in Abbildung 27 und Abbildung 28 dargestellt.

		<b>CnA <math>\alpha</math> 1 und 2</b>	<b>CnA <math>\alpha</math>1, 2 und 3</b>	<b>CnA <math>\beta</math> 1</b>	<b>CnA <math>\beta</math> 1 und 2</b>
<b>LVEF</b>	r	0,361	0,304	0,359	0,369
	p	0,014	0,04	0,014	0,011
<b>FS</b>	r	0,401	0,280	0,339	0,340
	p	0,006	0,063	0,023	0,023
<b>LVESD</b>	r	-0,478	-0,468	-0,448	-0,482
	p	0,001	0,002	0,003	0,001
<b>LVEDD</b>	r	-0,472	-0,369	-0,379	-0,431
	p	0,001	0,012	0,009	0,003
<b>Alter</b>	r	0,369	0,287	0,372	0,325
	p	0,003	0,024	0,003	0,010

**Tabelle 5: BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DEN SPLEISSVARIANTEN VON CnA UND DEN KLINISCHEN PARAMETERN:** Korrelationen zwischen den auf die Expressionswerte für GAPDH-m-RNA normalisierten m-RNA-Mengen der Zielgene und den klinischen Parametern jeweils in der Gesamtgruppe aller Patienten (AS, DKMP und IKMP); angegeben sind jeweils der Korrelationskoeffizient r und der p-Wert für die Signifikanz.

### 1.8.1 Positive Korrelation zwischen Calcineurin A und LVEF in der Gesamtgruppe

In der Gesamtgruppe aller Patienten (AS, DKMP und IKMP) zeigten sich jeweils zwischen der LVEF und der m-RNA-Expression aller Spleissvarianten von Calcineurin A  $\alpha$  und A  $\beta$  signifikant positive Korrelationen. Je besser die LVEF eines Patienten war, desto höher waren die gemessenen Calcineurin A m-RNA-Werte (Abbildung 22).



**Abbildung 22:** a) bis d): **BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DER m-RNA-EXPRESSION DER SPLEISSVARIANTEN UND DER LVEF:** graphische Darstellung der Beziehungen zwischen der auf die Expressionswerte für GAPDH-m-RNA normalisierten m-RNA-Expression der Spleissvarianten von Calcineurin A  $\alpha$  und A  $\beta$  und der LVEF in der Gesamtgruppe der Patienten (AS, DKMP, IKMP) mit eingezeichneter Regressionsgerade.

### 1.8.2 Positive Korrelation zwischen Calcineurin A und FS in der Gesamtgruppe

In der Gesamtgruppe aller Patienten (AS, DKMP und IKMP) zeigten sich jeweils zwischen der FS und und der m-RNA-Expression aller Spleissvarianten von Calcineurin A  $\alpha$  und A  $\beta$  bis auf Calcineurin A  $\alpha$  1, 2 und 3 signifikant positive Korrelationen. Je besser die FS eines Patienten war, desto höher waren die gemessenen Calcineurin A m-RNA-Werte (Abbildung 23).

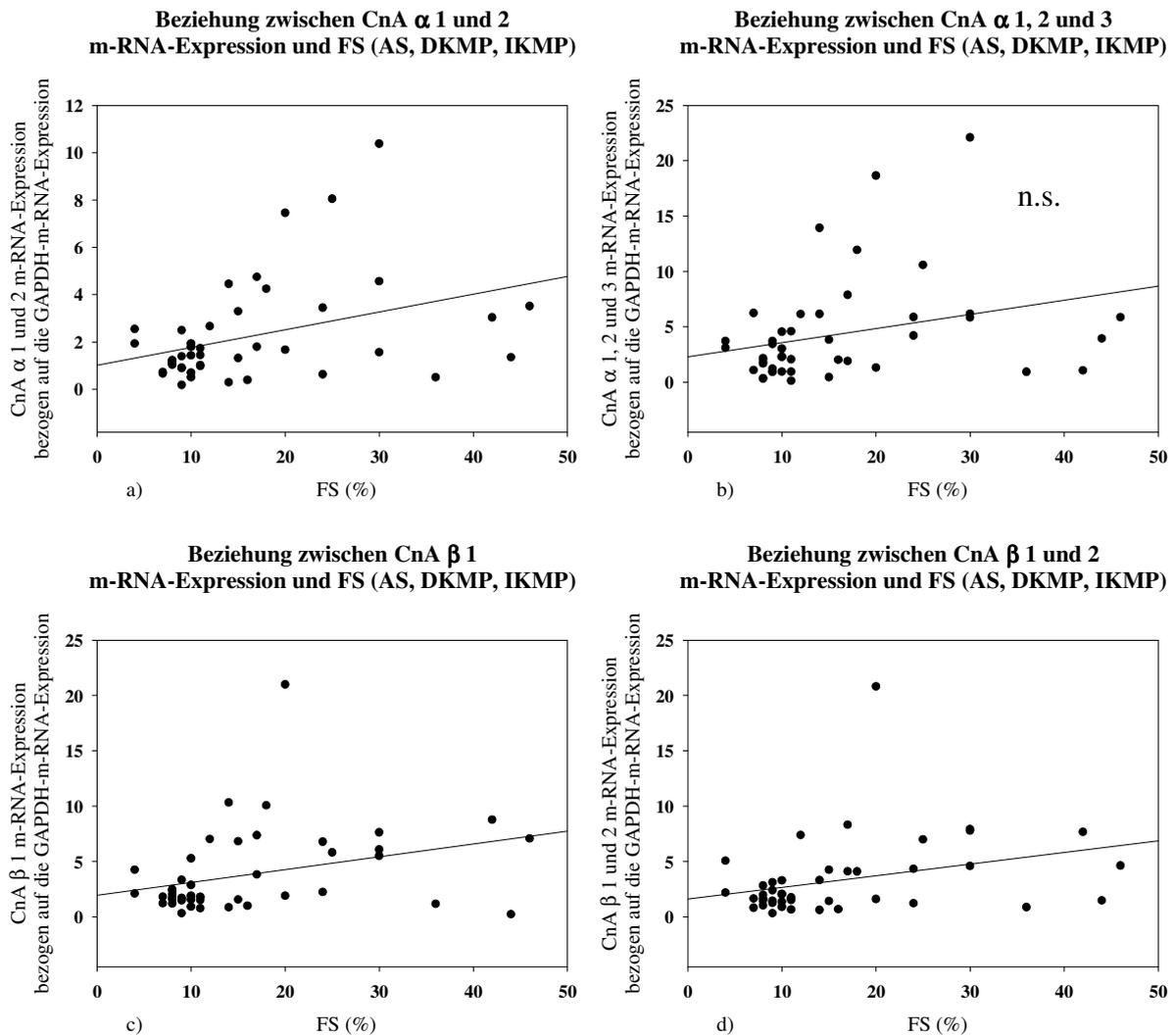
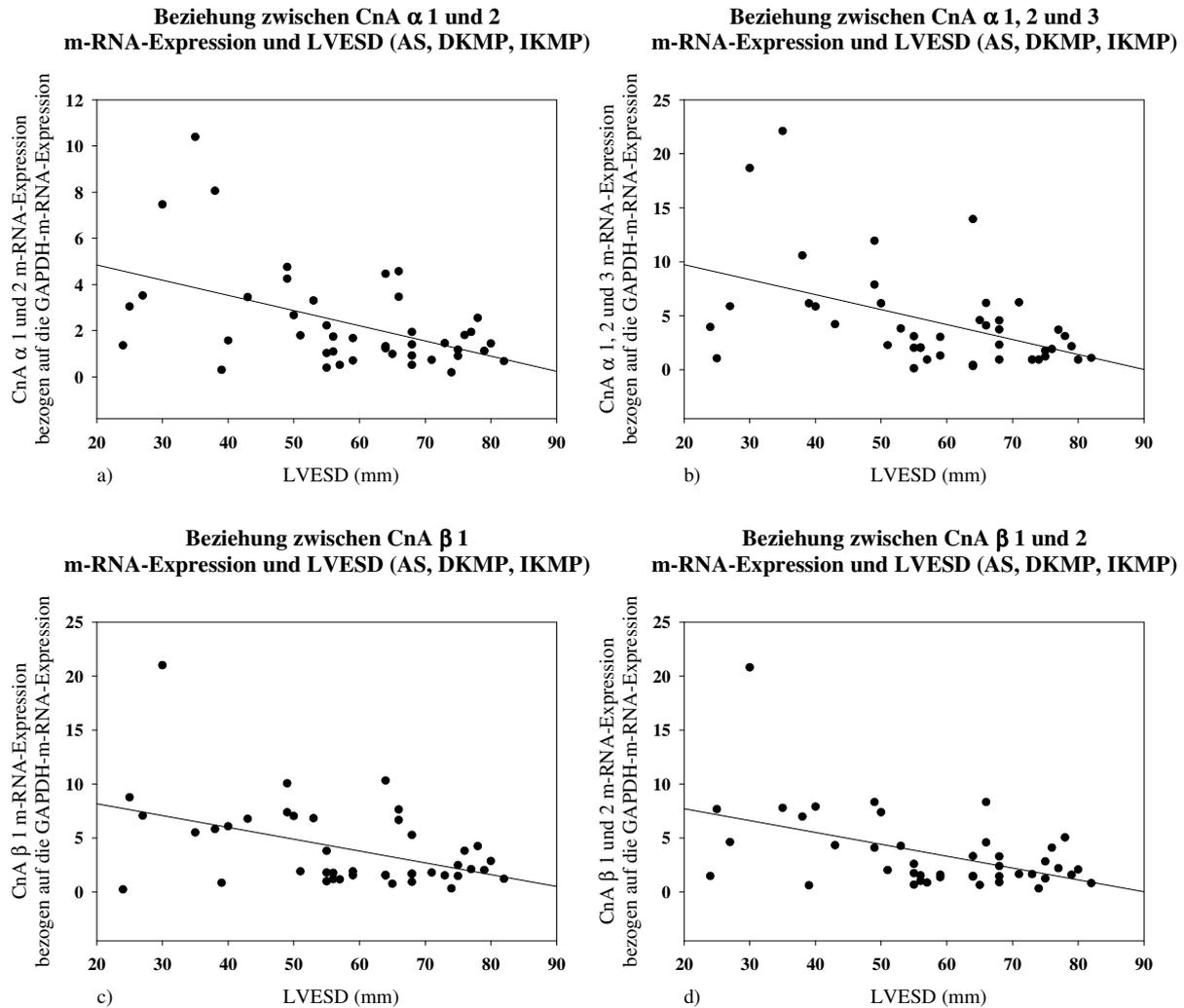


Abbildung 23: a) bis d): BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DER m-RNA-EXPRESSION DER SPLEISSVARIANTEN UND DER FS: graphische Darstellung der Beziehungen zwischen der auf die Expressionswerte für GAPDH-m-RNA normalisierten m-RNA-Expression der Spleissvarianten von Calcineurin A  $\alpha$  und A  $\beta$  und der FS in der Gesamtgruppe der Patienten (AS, DKMP, IKMP) mit eingezeichneter Regressionsgerade.

### 1.8.3 Negative Korrelation zwischen Calcineurin A und LVESD in der Gesamtgruppe

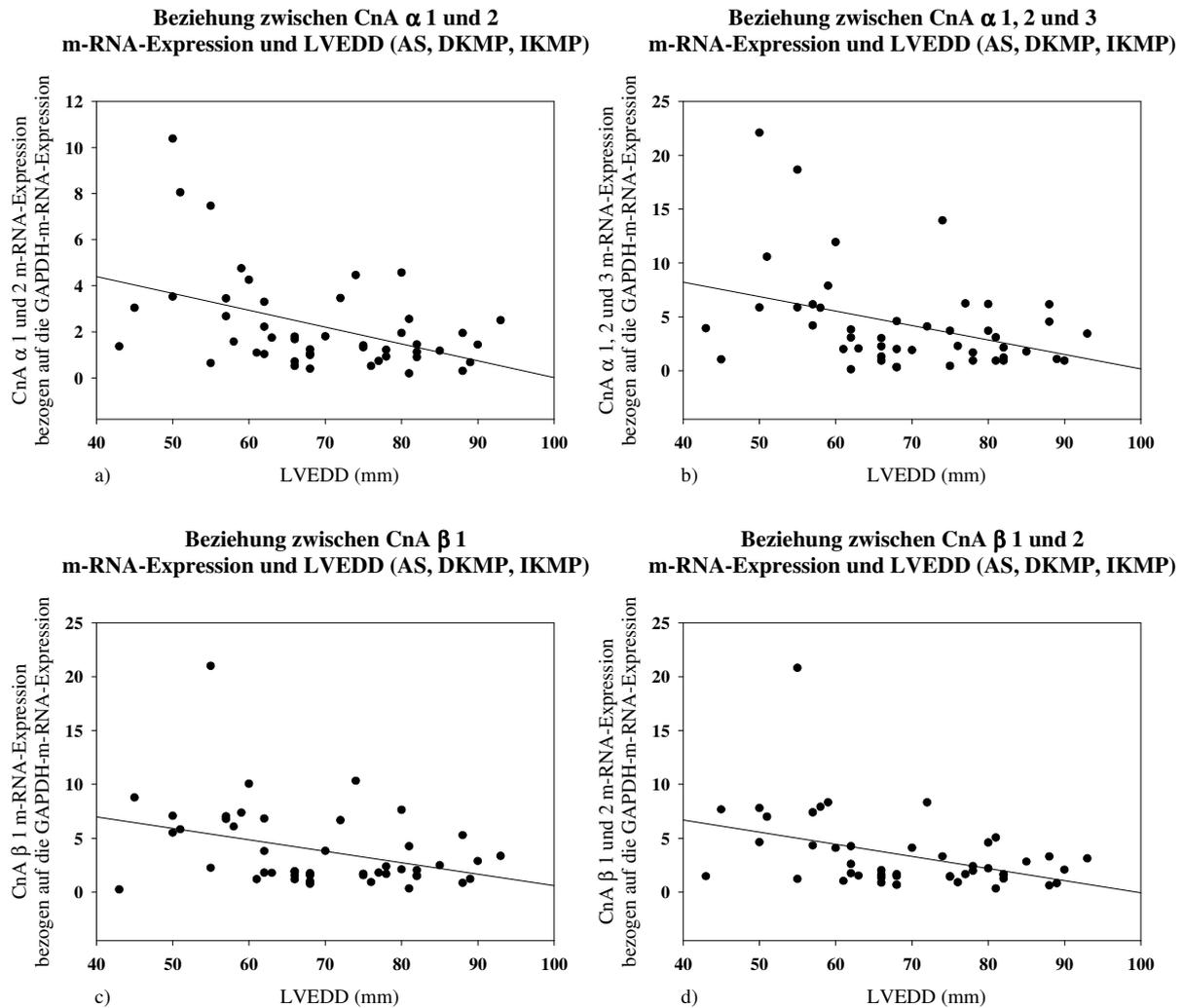
In der Gesamtgruppe aller Patienten (AS, DKMP und IKMP) zeigten sich jeweils zwischen dem LVESD und der m-RNA-Expression aller Spleissvarianten von Calcineurin A  $\alpha$  und A  $\beta$  signifikant negative Korrelationen. Je kleiner der LVESD eines Patienten war, desto höher waren die gemessenen Calcineurin A m-RNA-Werte (Abbildung 24).



**Abbildung 24: a) bis d): BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DER m-RNA-EXPRESSION DER SPLEISSVARIANTEN UND DEM LVESD: graphische Darstellung der Beziehungen zwischen der auf die Expressionswerte für GAPDH-m-RNA normalisierten m-RNA-Expression der Spleissvarianten von Calcineurin A  $\alpha$  und A  $\beta$  und dem LVESD in der Gesamtgruppe der Patienten (AS, DKMP, IKMP) mit eingezeichneter Regressionsgerade.**

### 1.8.4 Negative Korrelation zwischen Calcineurin A und LVEDD in der Gesamtgruppe

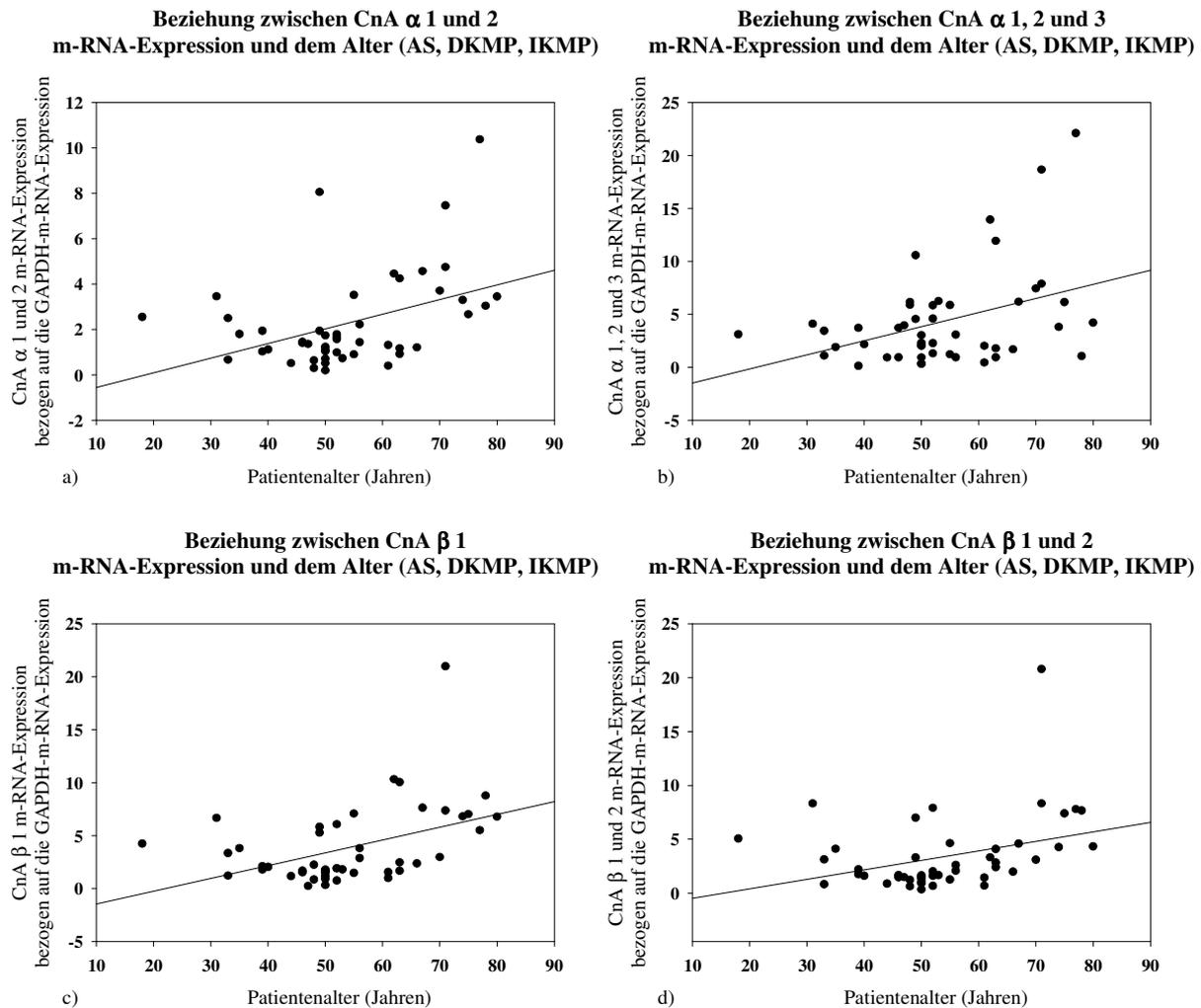
In der Gesamtgruppe aller Patienten (AS, DKMP und IKMP) zeigten sich jeweils zwischen dem LVEDD und der m-RNA-Expression aller Spleissvarianten von Calcineurin A  $\alpha$  und A  $\beta$  signifikant negative Korrelationen. Je kleiner der LVEDD eines Patienten war, desto höher waren die gemessenen Calcineurin A m-RNA-Werte (Abbildung 25).



**Abbildung 25:** a) bis d): **BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DER m-RNA-EXPRESSION DER SPLEISSVARIANTEN UND DEM LVEDD:** graphische Darstellung der Beziehungen zwischen der auf die Expressionswerte für GAPDH-m-RNA normalisierten m-RNA-Expression der Spleissvarianten von Calcineurin A  $\alpha$  und A  $\beta$  und dem LVEDD in der Gesamtgruppe der Patienten (AS, DKMP, IKMP) mit eingezeichneter Regressionsgerade.

### 1.8.5 Positive Korrelation zwischen Calcineurin A und dem Patientenalter in der Gesamtgruppe

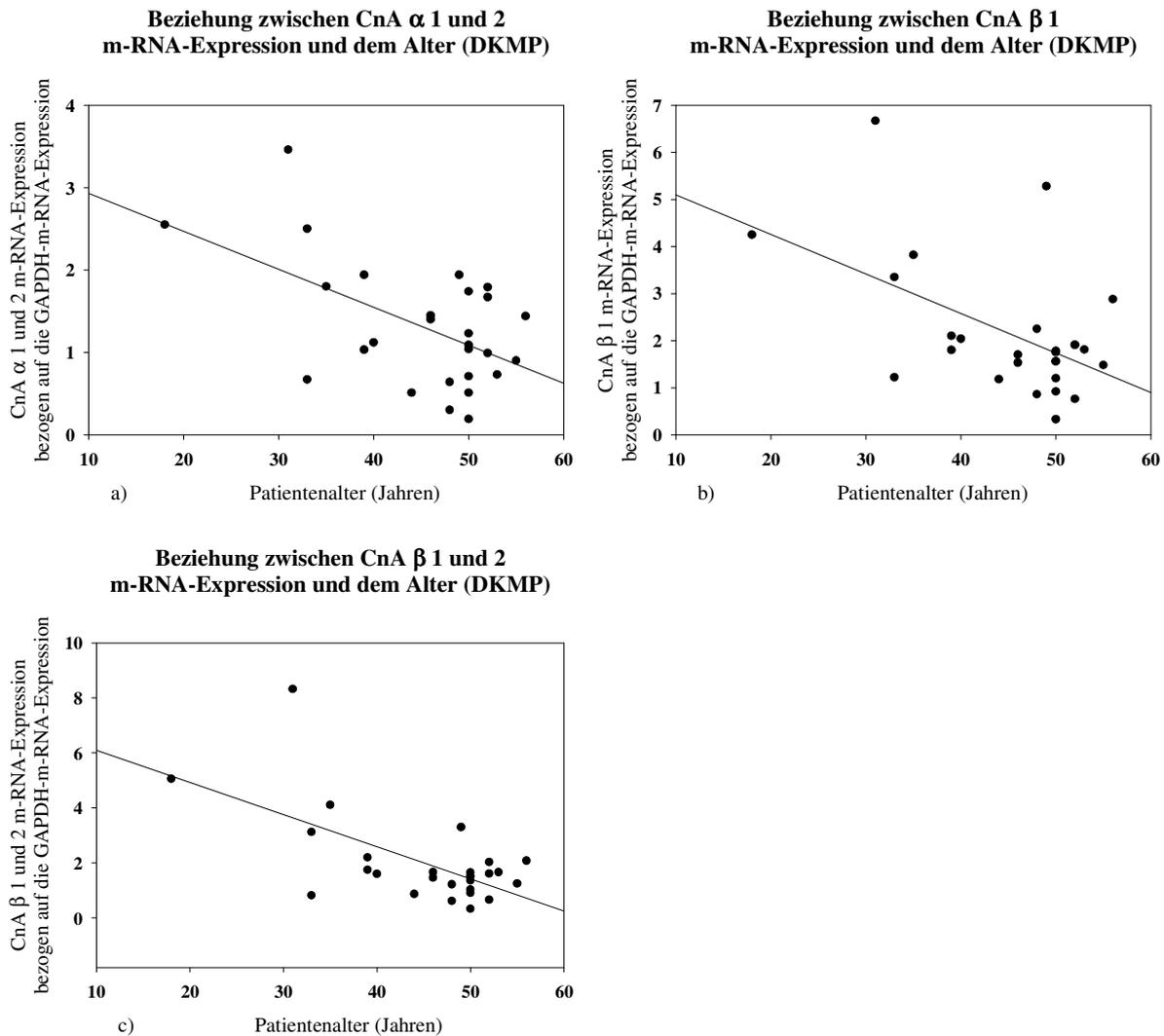
In der Gesamtgruppe aller Patienten (AS, DKMP und IKMP) zeigten sich jeweils zwischen dem Patientenalter und der m-RNA-Expression aller Spleissvarianten von Calcineurin A  $\alpha$  und A  $\beta$  signifikant positive Korrelationen. Je höher das Alter eines Patienten war, desto höher waren die gemessenen Calcineurin A m-RNA-Werte (Abbildung 26).



**Abbildung 26: a) bis d): BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DER m-RNA-EXPRESSION DER SPLEISSVARIANTEN UND DEM PATIENTENALTER: graphische Darstellung der Beziehungen zwischen der auf die Expressionswerte für GAPDH-m-RNA normalisierten m-RNA-Expression der Spleissvarianten von Calcineurin A  $\alpha$  und A  $\beta$  und dem Patientenalter in der Gesamtgruppe der Patienten (AS, DKMP, IKMP) mit eingezeichneter Regressionsgerade.**

### 1.8.6 Negative Korrelation zwischen CnA und dem Patientenalter in der Gruppe der DKMP

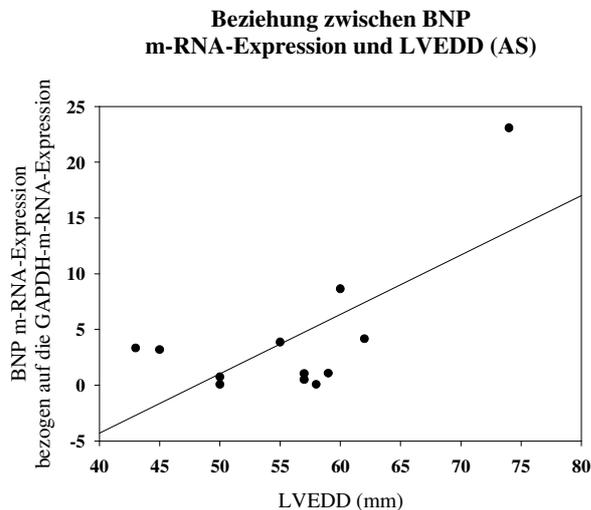
In der Patientengruppe mit DKMP zeigten sich zwischen dem Patientenalter und der m-RNA-Expression jeweils von Calcineurin A  $\alpha$  1 und 2,  $\beta$  1 und  $\beta$  1 und 2 signifikant negative Korrelationen ( $p \leq 0,01$ ,  $r = -0,543$ ;  $p \leq 0,01$ ,  $r = -0,532$ ;  $p \leq 0,01$ ,  $r = -0,628$  respektive). Je jünger der Patient mit DKMP war, desto höher waren die gemessenen Calcineurin A m-RNA-Werte (Abbildung 27).



**Abbildung 27:** a) bis c): **BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DER m-RNA-EXPRESSION DER SPLEISSVARIANTEN UND DEM PATIENTENALTER (DKMP):** graphische Darstellung der Beziehungen zwischen der auf die Expressionswerte für GAPDH-m-RNA normalisierten m-RNA-Expression der Spleissvarianten von Calcineurin A  $\alpha$  und A  $\beta$  und dem Patientenalter in der Patientengruppe mit DKMP mit eingezeichneter Regressionsgerade.

### 1.8.7 Positive Korrelation zwischen BNP und LVEDD in der Gruppe der AS

In der Patientengruppe mit Aortenstenose zeigte sich zwischen dem LVEDD und der m-RNA-Expression des Hypertrophiemarkers BNP eine signifikant positive Korrelation ( $p \leq 0,05$ ,  $r=0,683$ ). Je größer der LVEDD des Patienten war, desto höher war der gemessene BNP m-RNA-Expressionswert (Abbildung 28).



**Abbildung 28: BEZIEHUNG ZWISCHEN BNP UND LVEDD (AS):** graphische Darstellung der Beziehung zwischen der auf die Expressionswerte für GAPDH-m-RNA normalisierten m-RNA-Expression von BNP und dem LVEDD in der Patientengruppe mit AS mit eingezeichneter Regressionsgerade.

## 2 Calcineurin A Protein

### 2.1 Calcineurin A Proteinexpression

#### 2.1.1 Keine Regulation der Proteinexpression

Die Ergebnisse der Bestimmungen des Calcineurin A Proteins sind in der Abbildung 29 dargestellt. Abgebildet sind zusätzlich zu den jeweiligen Protein-Mengen-Werten (Mittelwerte) der Standardfehler (SEM), der p-Wert (für Signifikanz) und die Anzahl der Myokardproben, die untersucht wurden.

Die Werte für die Protein-Mengen sind Relativwerte bezogen auf die Expression des GAPDH-Proteins in denselben Myokardproben. Der Mittelwert dieses Verhältnisses in den Myokardproben der Kontrollen wurde auf den Wert 1 gesetzt, damit ein leichtes Verständnis der Zahlen möglich ist.

In der Patientengruppe mit Aortenstenose war keine signifikante Veränderung der Calcineurin A-Proteinexpression im Vergleich zur Expression in der Kontrollgruppe messbar (100 % vs. Kontrollen). In der Patientengruppe mit dilatativer Kardiomyopathie zeigte sich eine nicht signifikante Herabregulation der Calcineurin A-Proteinexpression im Vergleich zur

Expression in der Kontrollgruppe (95 % vs. Kontrollen). In der Patientengruppe mit ischämischer Kardiomyopathie war eine nicht signifikante Erhöhung der Expression von Calcineurin A auf 101 % im Vergleich zur Expression in der Kontrollgruppe messbar.

### Calcineurin A Protein

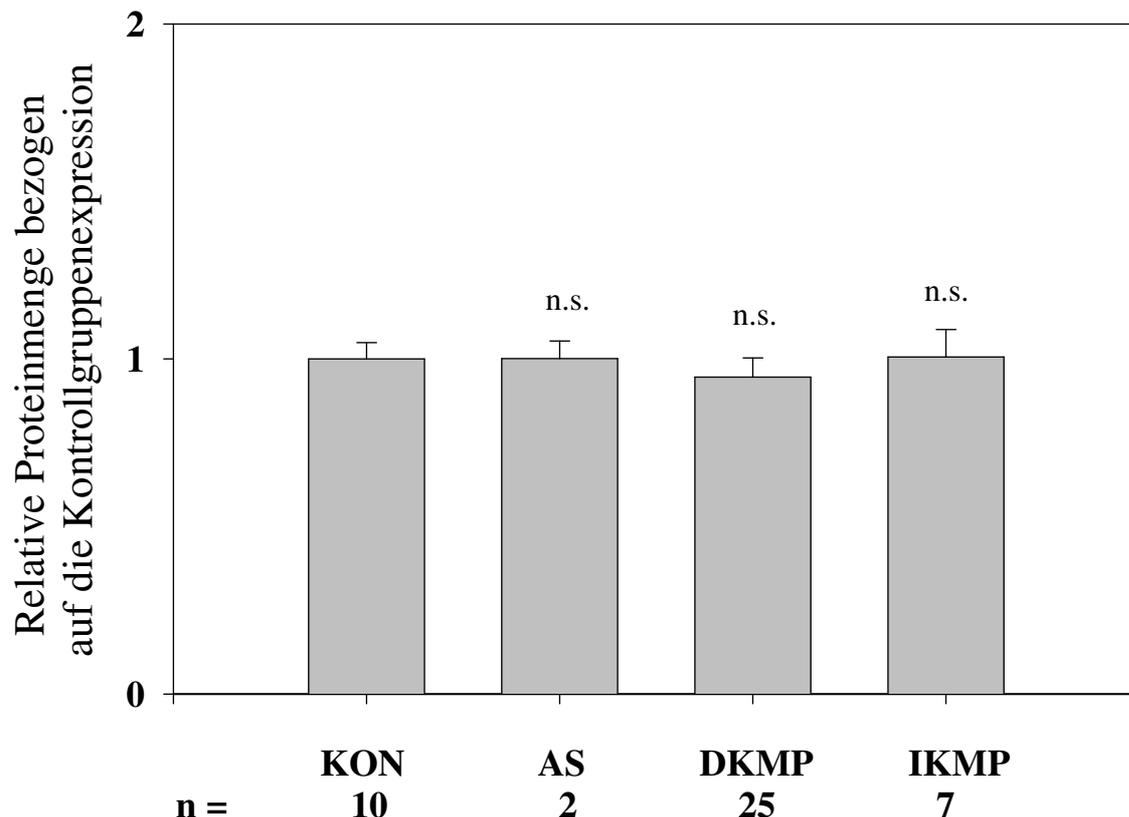


Abbildung 29: Calcineurin A Proteinexpression im Myokard von Kontrollen, Patienten mit Aortenstenose, dilatativer und ischämischer Kardiomyopathie. Die Werte sind auf die Expressionswerte für GAPDH-Protein normalisiert und dann als Relativwerte zur ANP/GAPDH-Expressionsrelation in der Kontrollgruppe dargestellt. Für die Signifikanz der Unterschiede zur Expressionsstärke in der Kontrollgruppe per Mann-Whitney U gilt: \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; nicht signifikant (n.s.).

#### 2.1.2 Keine Alters- und Geschlechtsunterschiede in der Proteinexpression von Calcineurin A

Die Ergebnisse der Bestimmungen des Calcineurin A Proteins in jüngeren (<40 Jahre) und älteren (>40 Jahre) Patienten mit DKMP sind in der Abbildung 30 dargestellt. Abgebildet sind zusätzlich zu den jeweiligen Proteinmengen-Werten (Mittelwerte) der Standardfehler (SEM), der p-Wert (für Signifikanz) und die Anzahl der Myokardproben, die untersucht wurden.

Die Werte für die Proteinmengen sind Relativwerte bezogen auf die Expression des GAPDH-Proteins in den selben Myokardproben.

In der Patientengruppe mit DKMP zeigte sich ein nicht signifikanter Altersunterschied der Calcineurin A Proteinexpression. Die Patientengruppe mit DKMP setzte sich aus sechs jüngeren und 19 älteren Patienten zusammen. Der Mittelwert für die Calcineurin A Proteinexpression der jüngeren Patienten lag mit  $0,89 (\pm 0,08)$  nicht signifikant niedriger als der Mittelwert für die Calcineurin A Proteinexpression der älteren Patienten ( $1,10 \pm 0,08$ ).

### Calcineurin A Protein (DKMP)

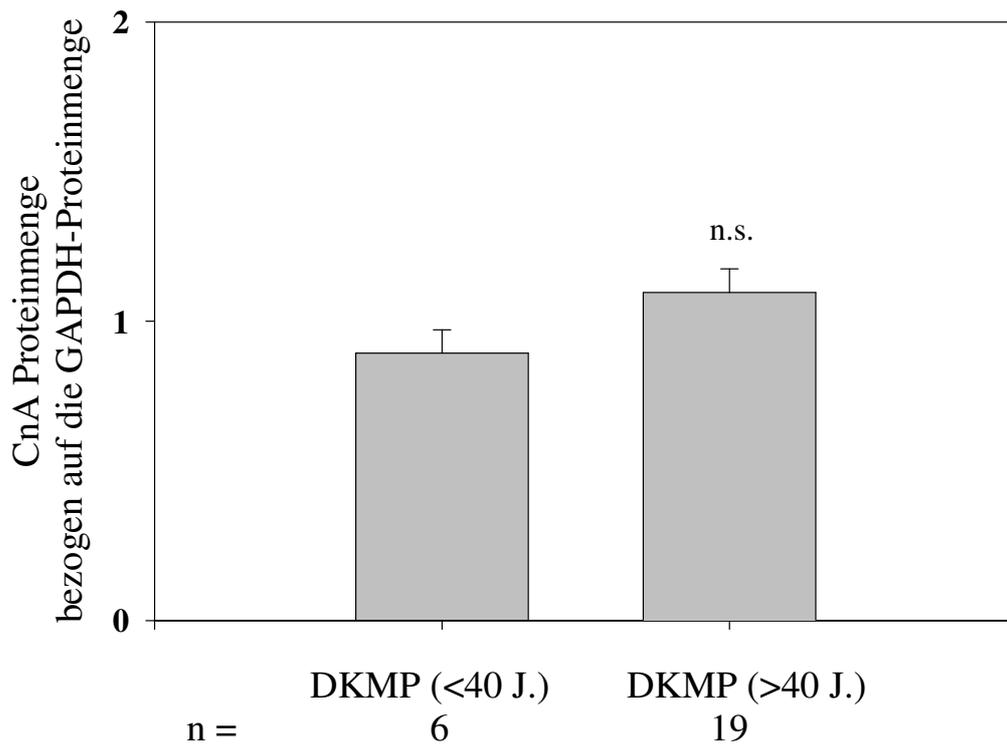


Abbildung 30: Calcineurin A Proteinexpression im Myokard von jüngeren und älteren Patienten mit DKMP. Die Werte sind auf die Expressionswerte für GAPDH-Protein normalisiert. Für die Signifikanz der Unterschiede der Expressionsstärke in den beiden Gruppen per Mann-Whitney U gilt: n.s. (nicht signifikant).

Da für die Proteinmessung nur noch Myokardproben von zwei Patientinnen mit Aortenstenose zur Verfügung standen, konnte die Gruppe der Patienten mit Aortenstenose nicht auf einen geschlechtsspezifischen Unterschied in der Proteinexpression von Calcineurin A untersucht werden.

### 3 Patientenalter

Die Patienten mit AS ( $67 \pm 3$  Jahre) waren sowohl signifikant älter als die Gruppe der Kontrollen ( $47 \pm 4$  Jahre,  $p < 0,01$ ), als auch signifikant älter als die Patienten mit DKMP ( $45 \pm 2$  Jahre,  $p < 0,01$ ). Zwischen der Gruppe mit DKMP und der Gruppe mit IKMP ( $60 \pm 2$  Jahre)

zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Altersunterschied ( $p < 0,01$ ). Die Beziehungen zwischen dem Patientenalter und der m-RNA-Expression der Zielgene wurden in Kapitel 1.8.5 und 1.8.6 beschrieben.

### 3.1 Medikamentöse Therapie

*Diuretika:* Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Einnahme von Diuretika und der m-RNA-Expression der Spleissvarianten von Calcineurin A  $\alpha$  und A  $\beta$  und BNP festgestellt werden. In der Gruppe mit AS hatten die Patienten, die unter Diuretikatherapie standen, signifikant niedrigere Werte für die ANP/GAPDH Expressionsrelation als die drei Patienten, die keine Diuretika einnahmen ( $p < 0,05$ ).

*Betablocker:* Mit einer Ausnahme konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden zwischen der Einnahme von Betablockern und der m-RNA-Expression der Zielgene. In der Gruppe mit AS hatten die sechs Patienten, die unter Betablockertherapie standen, signifikant niedrigere Werte für die CnA  $\alpha$  1, 2 und 3/GAPDH Expressionsrelation als die acht Patienten, die keine Betablocker einnahmen ( $p < 0,05$ ).

*ACE-Hemmer/Angiotensin-Rezeptorantagonisten:* Es konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden zwischen der Einnahme von ACE-Hemmern bzw. Angiotensin-Rezeptorantagonisten und der m-RNA-Expression der Zielgene.

## D Diskussion

Die Untersuchung der Spleissvarianten der Calcineurin A Gene in der vorliegenden Arbeit zeigt eine Hochregulation von Calcineurin A auf Transkriptionsebene. Diese Heraufregulation ist stärker in kardialer Hypertrophie als in terminaler Herzinsuffizienz. Hier zeigt sich, dass Spleissvarianten bei den verschiedenen Patientengruppen uneinheitlich reguliert werden. Patienten mit Aortenstenose und junge Patienten mit DKMP nutzen vor allem die Hochregulation von Calcineurin A  $\alpha$  1 und 2. Demgegenüber nehmen ältere Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz und männliche Patienten mit reiner Hypertrophie eine Hochregulation von Calcineurin A  $\alpha$  3 wohl zu Hilfe, um eine Aktivitätssteigerung von Calcineurin zu erreichen. Bei Calcineurin A  $\beta$  zeigt sich ein ähnliches Muster. Patienten mit reiner Hypertrophie und junge Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz nutzen den Weg der  $\beta$  1-Heraufregulation, bei älteren Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz scheint das nicht mehr zu funktionieren. Calcineurin A und Calcineurin B werden auf transkriptioneller Ebene von unterschiedlichen Genen aus reguliert, aber es zeigt sich eine gute Korrelation zwischen dem Ansteigen der beiden Transkripte. Die Hypertrophiemarker ANP und BNP zeigen auf Transkriptionsebene ebenfalls Alters- und Geschlechtsabhängigkeiten, die zu einer stärkeren Hochregulation bei jungen Patienten mit DKMP (nur ANP) und bei männlichen Patienten mit Aortenstenose (ANP und BNP) führen. Die Regulation der Calcineurin Gene korrelierte jedoch nicht mit der Regulation der Hypertrophiemarker, obwohl diese ebenfalls eine stärkere Heraufregulation in kardialer Hypertrophie zeigten als in terminaler Herzinsuffizienz, was durch die hohe Varianz innerhalb der Gruppe der Aortenstenosen bedingt sein könnte. Signifikante Korrelationen zeigten sich zwischen der m-RNA-Expression der Spleissvarianten von Calcineurin A untereinander, was eine ähnliche Regulation bzw. identische Funktion vermuten lässt. Eine alters- und geschlechtsspezifische Regulation von Calcineurin A zeigte sich in der Gruppe mit DKMP mit stärkerer Heraufregulation bei jüngeren Patienten bzw. in der Gruppe mit AS mit stärkerer Heraufregulation bei männlichen Patienten. Die Untersuchung der Proteinexpression von Calcineurin A wies allerdings keine signifikante Regulation zwischen Patienten und Kontrollproben auf. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass der verwendete primäre Calcineurin-Antikörper nicht an alle Proteinisoformen von Calcineurin bindet und somit eine eventuell vorhandene Heraufregulation von Calcineurin auf Proteinebene nicht erkannt werden konnte.

# 1 Diskussion der Ergebnisse – Regulation der Calcineurintranskription

## 1.1 Calcineurin A alpha

Wegen der gewählten optimalen PCR-Bedingungen konnten nicht alle drei bekannten Spleissvarianten von CnA  $\alpha$  einzeln untersucht werden. Auf diese Weise wurde sicher gestellt, dass von einer hohen Spezifität der nachgewiesenen Transkripte auszugehen ist. Optimale PCR-Bedingungen herrschten für die entworfenen Primerpaare, die entweder für die Spleissvarianten 1 und 2 oder für alle drei Spleissvarianten spezifisch waren. Somit liegt der Unterschied im zusätzlichen Nachweis der dritten Spleissvariante CnA  $\alpha$  3. Dies lässt die differenzierte Betrachtung der einzelnen Spleissvarianten zu und gewährleistet gleichzeitig aufgrund optimaler PCR-Bedingungen zuverlässige Ergebnisse. Aber auch dieser Vergleich ist bis heute nicht in der Literatur beschrieben. Taigen et al. beschrieben zwei unterschiedlich große Amplifikate beim Einsatz eines Calcineurin A  $\alpha$  spezifischen Primerpaares [95]. Dieses Primerpaar war ratten- und mäuse-spezifisch und wurde bei neonatalen Rattenkardiomyozyten eingesetzt, nachdem sie mit AT2 stimuliert worden waren. D. h., dass dieses Primerpaar wahrscheinlich zur Amplifikation von zwei Spleissvarianten von CnA  $\alpha$  führte. In dieser Versuchsreihe wurde keine signifikante Regulation von Calcineurin A  $\alpha$  m-RNA im Vergleich zu unstimulierten neonatalen Rattenkardiomyozyten gefunden.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine signifikante Heraufregulation von CnA  $\alpha$  1 und 2 nur in der Gruppe der Aortenstenosen und jungen Patienten mit DKMP, während CnA  $\alpha$  1, 2 und 3 nur in der Gruppe der DKMP signifikant heraufreguliert war. Dieser Unterschied muss also durch die dritte Spleissvariante hervorgerufen worden sein. Reuter et al. konnten die dritte Spleissvariante auch im Western Blot nachweisen [37]. D.h., dass diese Spleissvariante tatsächlich auch für ein Protein kodiert, obwohl bei diesem die katalytische und die CnB bindende Domäne ganz fehlen. Obwohl diese Spleissvariante selber keine eigene Phosphataseaktivität besitzt, vermuten sie, dass durch diese Spleissvariante Calcineurin A noch kalziumsensitiver wird, da durch dessen Zugabe zum Standard-Calcineurin, welches alle Domänen aufweist, sich dessen Phosphataseaktivität erhöht.

In Bezug auf die untersuchten Patientengruppen scheint diese sensitivitätssteigernde Spleissvariante CnA  $\alpha$  3 nicht bei hypertrophen Herzen generell sondern nur bei männlichen Patienten mit Hypertrophie und terminal insuffizienten Herzen ungeachtet ihres Alters eine Rolle zu spielen. Das Standard Calcineurin mit allen Domänen, wie sie die Spleissvarianten 1 und 2 von CnA  $\alpha$  aufweisen, könnte mit ausreichender Phosphataseaktivität ausgestattet sein,

um mitverantwortlich zu sein für die Ausbildung und Erhaltung von Hypertrophie. Durch die bei terminal herzinsuffizienten heraufregulierte sensitivitätssteigernde Spleissvariante CnA  $\alpha$  3 könnte Calcineurin auch eine mitwirkende Rolle für den Übergang von kompensierter zu dekomensierter Herzinsuffizienz zugesprochen werden sowie als zusätzlicher Mechanismus bei männlichen Patienten mit Hypertrophie zum Tragen kommen.

Andererseits zeigten neueste Untersuchungen, dass sich die Phosphataseaktivität von Calcineurin A stufenweise erhöhen lässt durch die künstliche Abtrennung eben dieser regulatorischen Domänen von der katalytischen Domäne von Calcineurin A [96]. Diese belegen, dass sich die regulatorischen Domänen von Calcineurin A negativ auf dessen enzymatische Aktivität in Abwesenheit von Calcineurin B und Calmodulin auswirken. Zwar befasste sich diese Studie mit der enzymatischen Aktivität der katalytischen Domäne von Calcineurin A, jedoch widerspricht dies nicht der weiter oben als sensitivitätssteigernd bezeichneten Eigenschaft der Spleissvariante CnA  $\alpha$  3, welche nur aus der Calmodulin bindenden und der autoinhibitorischen Domäne besteht.

Tsao et al. kamen nach Proteinuntersuchungen von CnA in Proben von Herzen von Patienten mit THI mittels unterschiedlicher n- und c-terminaler Antikörper zu dem Schluss, dass weniger die Menge sondern vielmehr die spezifische Isoform von Calcineurin entscheidend sein könnte [38]. Sie vermuten eine komplexe Rolle von Calcineurin A, welche sich durch einen Wechsel der Isoformen in den Stadien der Herzkrankheit auszeichnet, während einige Autoren den Standpunkt vertreten, dass Calcineurin A vor allem für die Ausbildung und Erhaltung von pathologischer Hypertrophie verantwortlich ist [65, 75, 89, 97].

Es wurde auch eine Expressionsregulation von CnA  $\alpha$  1 und 2 innerhalb der Gruppe der Patienten mit DKMP festgestellt (Abbildung 10). Jüngere Patienten (<40 Jahre) mit DKMP hatten eine signifikant höhere m-RNA-Expression von CnA  $\alpha$  1 und 2 als ältere (>40 Jahre). Das könnte bedeuten, dass Calcineurin m-RNA mit zunehmender Erkrankungsdauer herab reguliert wird.

Eine weitere Regulation der m-RNA-Expression zeigte sich bei CnA  $\alpha$  1, 2 und 3 in der Patientengruppe mit Aortenstenose (Abbildung 12). In der Untergruppe der männlichen Patienten mit AS war CnA  $\alpha$  1, 2 und 3 signifikant höher exprimiert als in der Untergruppe der weiblichen Patienten mit AS. Morphologisch zeigte sich hier tatsächlich ein zwar nicht signifikanter Geschlechtsunterschied der Myokardhypertrophie: die präoperative echokardiographische Messung der Septumdicke (mm) ergab bei männlichen Patienten mit AS einen höheren Wert (12,1) als bei weiblichen Patienten mit AS (11,8), was vermuten lässt,

dass in der untersuchten Patientengruppe die Myokardhypertrophie bei männlichen Patienten mit AS stärker ausgeprägt war als bei weiblichen Patienten. Zwar sind solche geschlechtsspezifischen m-RNA-Expressionsunterschiede in der Literatur noch nicht beschrieben, jedoch stehen sie in gewissem Einklang mit geschlechtsspezifischen Unterschieden der hämodynamischen Parameter, wie sie auch andere Forschungsgruppen aufgezeigt haben [7, 98-101]. Sie demonstrieren, dass Unterschiede in der linksventrikulären Adaptation auf eine Aortenstenose mit dem Geschlecht assoziiert sind trotz gleich ausgeprägter Aortenstenose und gleicher NYHA-Einstufung. Dies zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit (Tabelle 1): Patientinnen mit Aortenstenose hatten eine bessere LVEF ( $57\pm 6$  vs.  $27\pm 2\%$ ) und FS ( $33\pm 4$  vs.  $19\pm 3\%$ ) und kleinere LVESD ( $35\pm 4$  vs.  $51\pm 5$ mm) und LVEDD ( $52\pm 3$  vs.  $64\pm 4$ mm) als die männlichen Patienten. Diese gleichartige Regulation der m-RNA-Expression und der klinischen Parameter deutet auf einen geschlechtsspezifischen Zusammenhang zwischen Calcineurin und der morphologischen Ausprägung einer Aortenstenose.

## 1.2 Calcineurin A beta

Auch bei Calcineurin A  $\beta$  konnten aus Gründen für optimale PCR-Bedingungen nur zwei Primerpaare eingesetzt werden. Das erste Primerpaar war spezifisch für die Spleissvariante CnA  $\beta$  1, während das zweite Primerpaar für beide Spleissvarianten von CnA  $\beta$  spezifisch war. In der vorliegenden Arbeit ergaben die Messungen mit beiden Primerpaaren eine signifikante Heraufregulation der CnA  $\beta$  m-RNA-Expression im Vergleich zu den Kontrollproben, die in den hypertrophierten Herzen der Patienten mit Aortenstenose stärker war als in den Herzen terminal insuffizienter Patienten mit DKMP (Abbildung 13 und Abbildung 15). Hier zeigte sich also anders als bei Calcineurin A alpha keine unterschiedliche Regulation der einzelnen Spleissvarianten. Somit scheinen beide Spleissvarianten von Calcineurin A beta nicht bei terminal insuffizienten Herzen sondern bei hypertrophen Herzen eine Rolle zu spielen. Ähnlich wie bei CnA  $\alpha$  zeigte sich auch bei CnA  $\beta$  ein Altersunterschied in der m-RNA-Expression in der Patientengruppe mit DKMP. Die Messungen mit beiden Primerpaaren für CnA  $\beta$  ergaben signifikant höhere m-RNA-Expressionswerte in den unter 40-jährigen Patienten mit DKMP als in den über 40-jährigen. Zusätzlich liessen sich in der Patientengruppe mit DKMP zwischen dem Patientenalter und der m-RNA-Expression jeweils von Calcineurin A  $\alpha$  1 und 2 sowie  $\beta$  1 und 2 signifikant negative Korrelationen nachweisen. Dieses m-RNA-Expressionsmuster verdeutlicht ebenfalls die unterschiedliche Calcineurinregulation in Abhängigkeit vom Patientenalter.

Ein geschlechtsabhängiger Unterschied respektive Korrelation der m-RNA-Expression von CnA  $\beta$  in der Patientengruppe mit Aortenstenose wurde im Vergleich zu den Ergebnissen von CnA  $\alpha$  nicht festgestellt. Somit liess sich sowohl für Calcineurin A  $\alpha$  als auch  $\beta$  zeigen, dass jüngere und ältere als auch männliche und weibliche Patienten unterschiedliche Regulationsmechanismen benutzen bzw. unterschiedliche Transkripte oder Spleissformen hochregulieren. Dies ist ein ganz wesentliches Verdienst der vorliegenden Arbeit und konnte zum ersten mal gezeigt werden.

### 1.3 Hypertrophiemarker

Die Messung der m-RNA-Expression der Hypertrophiemarker ANP und BNP zeigte eine signifikante Heraufregulation bei den Patienten im Vergleich zu den Kontrollproben. Beide Gene waren in der Patientengruppe der Aortenstenosen am stärksten heraufreguliert. Zum einen war diese Regulation bei ANP um das bis zu zehnfache stärker ausgeprägt als bei BNP, wobei diese stärkere Regulation auch mit einer stärkeren Streuung der Werte einher ging. Zum anderen war die m-RNA-Expressionsregulation von BNP bei allen Patienten signifikant, während sie bei ANP nur bei den Patienten mit AS und bei den Patienten mit DKMP signifikant war. Die Hypertrophiemarker ANP und BNP zeigen auf Transkriptionsebene ebenfalls eine alters- und geschlechtsabhängige Regulation der Transkription, die zu einer stärkeren Hochregulation bei jungen Patienten mit DKMP (nur ANP) und bei männlichen Patienten mit Aortenstenose (ANP und BNP) führt.

Dieser Wechsel der Genprogrammierung bei kardialer Hypertrophie hin zu einer Reexpression von ANP und BNP ist von vielen Autoren beschrieben [7, 59, 102, 103]. Nach der Geburt ist ihre Expression auf den Vorhof beschränkt, aber als Antwort auf hypertrophe Signale werden sie im Ventrikel reexprimiert. Sie senken den Blutdruck durch Vasodilatation und Natriurese. Ihre Induktion kann als adaptive Antwort interpretiert werden, um die Wandspannung des Ventrikels bei hämodynamischer Überladung zu reduzieren. Die Induktion von ANP und BNP ist Kennzeichen der kardialen Hypertrophie in allen Säugetierspezies und ein prognostischer Indikator von klinischer Relevanz [103].

Unter Berücksichtigung der medikamentösen Therapie der Patienten mit AS zeigte sich ein Expressionsunterschied von ANP-m-RNA: Sowohl Patienten, die unter Diuretikatherapie standen als auch Patienten, die unter beta-Blockertherapie standen, zeigten eine signifikant niedrigere ANP-Expression als Patienten, die nicht unter entsprechender medikamentöser Therapie standen. Dies lässt vermuten, dass die medikamentös beeinflusste und somit weniger stark ausgeprägte Hypertrophie im Zusammenhang steht mit geringerer Induktion von ANP.

Diese Gene werden zwar allgemein als Hypertrophiemarker bezeichnet, jedoch zeigte sich ihre stärkste Regulation in der Patientengruppe mit konzentrischer Hypertrophie. Bei exzentrischer Hypertrophie war ihre Regulation ebenfalls signifikant, jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei den Patienten mit AS.

#### 1.4 Beziehungen zwischen den Expressionen und klinischen Parametern

Um funktionelle und regulatorische Zusammenhänge der untersuchten Genexpressionen untereinander und zu den klinischen und hämodynamischen Parametern aufzudecken und zu verstehen, wurden diese auf signifikante Korrelationen getestet. Die Untersuchungen in der Gesamtgruppe (alle Patienten und Kontrollen) ergaben für alle Kombinationen zwischen den Spleissvarianten signifikante Korrelationen. In den einzelnen Untergruppen zeigten sich vor allem in der Gruppe der DKMP signifikante Korrelationen. D. h., dass die Spleissvarianten von CnA trotz unterschiedlicher Gewebsverteilung und unterschiedlicher Regulation bei Hypertrophie und THI bis zu einem gewissen Grad ähnlich exprimiert werden und somit die Regulation der unterschiedlichen Transkripte eng miteinander korreliert (Tabelle 4). Trotz unterschiedlicher Genlokalisierung zeigt sich also eine starke Übereinstimmung der Regulation der einzelnen Gentranskripte von Calcineurin A  $\alpha$  und A  $\beta$ .

Eine signifikante Korrelation der Spleissvarianten zu den Hypertrophiemarkern konnte nicht festgestellt werden, weder in der Gesamt- noch in den Untergruppen. Somit kann nur angenommen werden, dass die Calcineurin A Gene und die Hypertrophiemarker ANP und BNP bei kardialer Hypertrophie und THI unterschiedlich reguliert sind und nicht in direktem Zusammenhang stehen. Allerdings lieferte eine Studie von Colomer und Means einen Hinweis für eine Verbindung zwischen dem Calcineurin-NFAT-Signalweg und der Expression von ANP [104]. Sie konnten nachweisen, dass die konstitutive Aktivierung von Calmodulin über einen Zwischenschritt und über die Regulation des ANP-Promoters die Dauer der ANP-Expression verlängern kann. Und in Bezug auf BNP konnte gezeigt werden, dass sein Promoter ein direktes Transkriptionsziel der synergistischen Aktivierung von GATA-4 und NFAT-3 im Kardiomyozyten ist [26]. Somit besteht über den Einfluss des Calcineurin-NFAT-Signalwegs auf die Promoter der Hypertrophiemarker eine Verbindung zur Expression von ANP und BNP, die sich aber nicht in einer signifikanten Expressionskorrelation sondern nur in einer pathophysiologisch homogenen Umgestaltung äussern kann.

Weiterhin zeigte sich in der Gruppe der Patienten mit AS eine signifikant positive Korrelation zwischen der m-RNA-Expression von BNP und LVEDD (Abbildung 28). Höhere Werte der

Expression von BNP-m-RNA gingen einher mit höheren Werten für den LVEDD und somit erhöhtem Wandstress. Alle Transkripte von Calcineurin korrelieren in der erwarteten Weise mit den hämodynamischen Parametern (Tabelle 5), und die gesehenen Korrelationen für solche biologischen Verhältnisse sind sehr gut. Jedoch sind engere Korrelationen aufgrund unterschiedlicher Begleitumstände, Medikation, Erkrankungsdauer und Komorbidität nicht zu erwarten.

Unterstützung für die These, dass Calcineurin vor allem für die Ausbildung und Erhaltung von pathologischer Hypertrophie verantwortlich ist, lieferten Proteinuntersuchungen von Haq et al. [65] und mehrere genetisch basierte Nagetiermodelle [75, 89, 97]. Diese zeigten, dass die durch Aktivierung des Calcineurin-NFAT-Signalwegs induzierbare Hypertrophie durch Inhibition mit Calcineurinantagonisten gestoppt wurde.

## 2 Diskussion der Ergebnisse – Calcineurin A Protein

### 2.1 Calcineurin A

Die Messung der Proteinmenge von Calcineurin A im Western Blot sollte Aufschluss geben darüber, ob sich die unterschiedliche Regulation der m-RNA-Expression der CnA Spleissvarianten auch auf die Proteinexpression auswirkt. Der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte primäre Calcineurin A Antikörper war ein nicht isoformenspezifischer monoklonaler Antikörper von Sigma. Dem Hersteller ist nicht bekannt, ob dieser Antikörper an ein c- oder an ein n-terminales Epitop auf Calcineurin A bindet.

Aufgrund des begrenzten Probenmaterials stand für die Proteinuntersuchungen nur noch Myokard von 2 Patienten mit Aortenstenose, 25 Patienten mit DKMP, 7 Patienten mit IKMP und von 10 abgelehnten Spenderherzen zur Verfügung. Die Auswertung ergab in keinerlei Hinsicht eine signifikante Regulation der Proteinexpression. In der Kontroll- und den Patientengruppen war die gleiche Menge an Calcineurinprotein exprimiert. Auch im Hinblick auf das Alter zeigte sich innerhalb der Patientengruppe mit DKMP keine signifikante Regulation.

Wenn man diese Ergebnisse mit denen anderer Forschungsgruppen vergleicht, so muss festgestellt werden, dass sich die Eigenschaften des verwendeten Calcineurin A Antikörpers auf die Ergebnisse der Proteinexpressionsmessung entscheidend auswirken können. Diese Eigenschaften betreffen die c- oder n-terminale Bindungsspezifität des Antikörpers sowie seine  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ - isoformenspezifische Bindung.

Tsao et al. untersuchten Myokard von Patienten mit THI zuerst mit einem c-terminalen anti-Calcineurin A Antikörper. Die meisten der kommerziell erhältlichen anti-Calcineurin A Antikörper binden am c-Terminus, an dem sich die autoinhibitorische Domäne von Calcineurin A befindet. Im Vergleich zu Kontrollproben konnten sie keinen Expressionsunterschied von Calcineurin A Protein feststellen. Im Gegensatz dazu ergaben Messungen mit einem n-terminalen anti-Calcineurin A Antikörper eine deutliche Heraufregulation im Myokard von Patienten mit THI [38]. Da ihre m-RNA-Messungen von CnA  $\beta$  im Northern Blot jedoch eine Herabregulation im Myokard von Patienten mit THI zeigten, vermuten sie, dass weniger die Menge des an Calmodulin gebundenen Calcineurins als vielmehr die partikuläre Isoform in diesen Komplexen von Bedeutung ist.

Haq et al. verglichen vier verschiedene anti-Calcineurin A Antikörper im Myokard von Patienten mit kompensierter Herzinsuffizienz und mit THI. Mit einem c-, einem n-terminalen (dieselben wie bei Tsao et al., beide nicht isoformenspezifisch) und einem Calcineurin A  $\beta$  spezifischen Antikörper zeigte sich jeweils eine signifikante 1,5- bis 1,8-fache Heraufregulation in beiden Patientengruppen im Vergleich zu Kontrollproben, während Messungen mit einem Calcineurin A  $\alpha$  spezifischen Antikörper keine Veränderung der Proteinexpression zeigte [65].

Einen weiteren Vergleich zwischen zwei c- und einem n-terminalen anti-Calcineurin A Antikörper lieferten Ritter et al. Diese waren von anderen Herstellern als die oben erwähnten Antikörper. Der verwendete n-terminale Antikörper war nicht isoformenspezifisch, während die c-terminalen Antikörper entweder für die  $\alpha$  oder für die  $\beta$  Isoform spezifisch waren. Die Messung von Myokardproben von Patienten mit kompensierter Hypertrophie ergab nur bei dem n-terminalen Antikörper eine signifikante Heraufregulation im Vergleich zu Kontrollproben, während sich bei beiden c-terminalen Antikörpern eine signifikante Herabregulation zeigte [68]. Zugleich ergab die Messung mit dem n-terminalen Antikörper nur bei den Patienten, aber nicht bei den Kontrollen, eine Doppelbande mit unterschiedlichen Molekulargewichten. Für die Autoren deutete dies auf eine potentielle partielle Proteolyse am c-Terminus hin, der die autoinhibitorische Domäne enthält. Diese Resultate gingen einher mit einer erhöhten enzymatischen Phosphataseaktivität von Calcineurin im vermessenen hypertrophierten Myokard der Patienten im Vergleich zu den Kontrollproben.

Auch wenn die Ergebnisse von Haq et al. dagegen sprechen, geben die beiden anderen Studien Anlass zur Vermutung, dass der in der vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper an ein c-Terminales Epitop auf Calcineurin A bindet, da sich hier ebenfalls andeutungsweise

eine Doppelbande erkennen lässt (Abbildung 8). Somit könnte es sein, dass eine partielle Degradation am c-Terminus in der vorliegenden Arbeit dazu geführt hat, dass bei der Western Blot Auswertung eine geringere Menge an Calcineurinprotein gemessen werden konnte im Vergleich zur Verwendung eines n-terminalen Antikörpers. Es ist somit die Hypothese aufzustellen, dass der verwendete Antikörper an das c-Terminus bindet und dieser im hypertrophierten Myokard abgespalten wird. Als Erklärungsmöglichkeit kommt dies durchaus in Betracht. Durch die partielle Degradation könnte das Signal der Calcineurin-Doppelbande nicht die tatsächliche Menge an Gesamtcalcineurin repräsentieren und somit dazu geführt haben, dass die Ergebnisse der Proteinmessung keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen aufzeigten. Dies vertieft die bisher bekannten Befunde zur Regulation des Calcineurin-Proteins im menschlichen Myokard und bestätigt, dass die Mechanismen der Regulation auf Transkriptebene stattfinden und dass hier eine unerwartete Komplexität mit Unterschieden zwischen jungen und alten und männlichen und weiblichen Patienten aufgezeigt wurde sowie zwischen unterschiedlichen Stadien der Herzinsuffizienz, von Patienten mit reiner Hypertrophie bis hin zur terminalen Herzinsuffizienz.

### 3 Abschliessende Überlegungen

Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass Unterschiede in der m-RNA-Expression der Calcineurin Gene nicht zwingend zu äquivalenten Veränderungen auf Proteinebene führen. Wenn der c-Terminus mit der autoinhibitorischen Domäne im hypertrophierten Myokard tatsächlich einer partiellen Degradation unterliegt, der Western Blot somit eine Herab- und der Phosphatase Essay eine Heraufregulation zeigt, so steht dies im Einklang mit den Ergebnissen von Liu et al., die bei künstlicher Abtrennung der regulatorischen Domänen von Calcineurin A ebenfalls eine stärkere Phosphataseaktivität der katalytischen Domäne von Calcineurin A feststellen konnten [96].

Von entscheidender Bedeutung sind ebenfalls die Bindungseigenschaften der beim Western Blot verwendeten anti-Calcineurin A Antikörper. Um zum einen die Proteinergebnisse konform mit den m-RNA-Ergebnissen zu vergleichen und zum anderen Aussagen über die Integrität des Calcineurin Proteins treffen zu können, sollten künftige Studien jeweils isoformenspezifisch n- und c-terminale Antikörper vergleichen.

Daran anschliessen sollte sich nicht nur die Frage nach der enzymatischen Aktivität von Calcineurin, sondern auch die Frage nach seiner spezifischen Aktivität, d.h. seiner Aktivität

pro Proteinmenge. Lim et al. stellten fest, dass eine Zunahme der Calcineurinaktivität häufig mit einer Zunahme des Calcineurin Proteingehalts korreliert, wobei noch nicht geklärt ist, ob dies durch eine verbesserte Proteinstabilität oder transkriptionale Aktivierung oder beides erreicht wird [69]. Verschiedene Arbeitsgruppen widmeten sich bereits der Frage nach der Phosphataseaktivität von Calcineurin im menschlichen Herzen und kamen trotz unterschiedlicher Methoden zu ähnlichen Ergebnissen [63-66, 68, 105]. Sie verglichen Myokardproben von Patienten mit kompensierter Hypertrophie oder THI mit Kontrollproben. Sie benutzten unterschiedliche Methoden zu Messung der Aktivität, der spezifischen Aktivität und zur Messung des mit Calmodulin coimmunopräzipitierten, also aktivierten Calcineurins. Dennoch zeigen ihre Ergebnisse einheitlich eine Erhöhung der Phosphataseaktivität in den Myokardproben der Patienten im Vergleich zu den Kontrollproben. Hierbei wäre ein Vergleich mit einer neuwertigeren Methode zur Messung der Calcineurinaktivität interessant, die 100 bis 200 mal sensitiver sein soll [106]. Hierbei wird ein rekombinantes Protein als Substrat und Ascorbinsäure als Antioxidant eingesetzt.

Ein weiterer vielversprechender Ansatz sind Untersuchungen der Promoterregion der Calcineurin A Gene. Oka et al. konnten beim CnA  $\beta$  Promoter eine hohe Anzahl an Bindungssequenzen für die Transkriptionsfaktoren NFAT und GATA und auch seine Ansprechbarkeit auf Druckbelastung in vivo nachweisen [107]. Diese Promoter sind somit ein wichtiger Bestandteil für das Verständnis des Calcineurin-NFAT-Signalwegs und seiner Rolle bei der Entstehung und Erhaltung von humaner kardialer Hypertrophie und beim Übergang zur terminalen Herzinsuffizienz.

Die vorliegende Arbeit konnte durch Nachweis der Regulation der Spleissvarianten von Calcineurin dessen Rolle bei der Entstehung und Erhaltung kardialer Hypertrophie weiter untermauern. Sie zeigt jedoch auch, dass noch Fragen nach der enzymatischen und spezifischen Aktivität Calcineurins offen sind und der eindeutigen Klärung bedürfen.

## E Zusammenfassung

Die kardiale Hypertrophie ist einer der wichtigsten klinischen Prädiktoren für die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität. Ebenso sind sowohl das Alter als auch das Geschlecht zwei bekannte kardiovaskuläre Risikofaktoren. In vielen Studien wurde Calcineurin bei der Entstehung der kardialen Hypertrophie eine zentrale Rolle zugewiesen [26, 85]. Aktiviertes Calcineurin besteht aus der katalytischen Untereinheit A (58-59 kDa) und der regulatorischen Untereinheit B (19 kDa). Die Gene für die katalytische Untereinheit befinden sich auf den Chromosomen 4, 10 und 8 und kodieren für die drei Isoformen Calcineurin A  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  respektive. Durch alternatives Spleissen entstehen insgesamt mindestens sieben Spleissvarianten (CnA  $\alpha$  1, 2 und 3, CnA  $\beta$  1 und 2, CnA  $\gamma$  1 und 2). Verschiedene Agonisten bewirken über eine intrazelluläre Calciumerhöhung mit Calmodulin die Aktivierung von Calcineurin. Aktiviertes Calcineurin assoziiert mit spezifischen Transkriptionsfaktoren und transloziert mit diesen in den Nukleus, wo sie eine Umstrukturierung der Genexpression mit der Folge der kardialen Hypertrophie bewirken.

Die Studie verfolgte das Ziel, die Gen- und Proteinexpression von CnA  $\alpha$  und  $\beta$  und seinen Spleissvarianten sowie den Hypertrophie markern ANP und BNP in menschlicher kardialer Hypertrophie infolge Aortenstenose und in terminaler, transplantationsbedürftiger Herzinsuffizienz infolge ischämischer und dilatativer Kardiomyopathie zu untersuchen. Die Ergebnisse der Messungen sollten untereinander und in Bezug auf die klinischen Daten der Patienten auf Korrelationen und auf Alters- und Geschlechtsunterschiede untersucht werden.

Es wurden linksventrikuläre Myokardproben von 14 Patienten mit Aortenklappenstenose, von 27 Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz aufgrund dilatativer Kardiomyopathie und 7 Patienten aufgrund ischämischer Kardiomyopathie untersucht im Vergleich zu Proben von 15 gesunden Herzen potentieller Spender, die aus technischen Gründen abgelehnt wurden. Nach RNA-Isolation und reverser Transkription erfolgte die semiquantitative Real-Time RT-PCR auf dem TaqMan® PE 5700. Eine externe Standardisierung auf GAPDH wurde vorgenommen. Der Proteinaufarbeitung schloss sich die Proteinbestimmung mittels Western-Blot an.

Zwei Spleissvarianten von CnA  $\alpha$  zeigten eine signifikante Heraufregulation der m-RNA-Expression in der Gruppe der AS (166 % vs. Kontrollen,  $p < 0,05$ ), während die Messung aller drei Spleissvarianten von CnA  $\alpha$  eine signifikante Heraufregulation in der Gruppe der DKMP zeigte (189 % vs. Kontrollen,  $p < 0,05$ ). Beide Messungen der Spleissvarianten von CnA  $\beta$  zeigten jeweils eine stärkere Heraufregulation der m-RNA-Expression in der Gruppe der AS

(176 % und 174 % vs. Kontrollen respektive,  $p < 0,01$  und  $p < 0,05$  respektive) als in der Gruppe der DKMP (148 % und 150 % vs. Kontrollen respektive,  $p < 0,01$  und  $p < 0,05$  respektive). Die Messung einer Spleissvariante zeigte zusätzlich eine geschlechtsspezifische Regulation innerhalb der Gruppe der AS mit einer stärker ausgeprägten Heraufregulation bei männlichen als bei weiblichen Patienten, während die Messungen der anderen Spleissvarianten jeweils eine altersspezifische Regulation in der Gruppe der DKMP mit einer stärkeren Heraufregulation bei den jüngeren Patienten ( $< 40$  Jahre) als bei den älteren ergab. Die m-RNA-Expression des Hypertrophiemarkers ANP war stärker heraufreguliert als die von BNP in allen Patientengruppen, und diese Regulation war jeweils am stärksten ausgeprägt in der Gruppe der AS. Die Messung der Proteinexpression von Gesamt-Calcineurin A (nicht isoformenspezifisch) zeigte in keinerlei Hinsicht eine Regulation. Weder zwischen der m-RNA-Expression der Spleissvarianten von CnA und den Hypertrophiemarkern noch zwischen der m-RNA- und der Proteinexpression zeigten sich signifikante Korrelationen. Signifikant positiv korreliert war die m-RNA-Expression der Spleissvarianten untereinander. Zudem war sie signifikant positiv korreliert zu der LVEF und der FS der Patienten und signifikant negativ korreliert zum LVESD und LVEDD der Patienten.

Die Regulation der m-RNA-Expression der Spleissvarianten von Calcineurin A unterstreicht dessen Rolle bei der Entstehung und Erhaltung kardialer Hypertrophie [65]. Beim Western Blot sind die Eigenschaften des benutzten Antikörpers zu berücksichtigen (nicht isoformenspezifisch, ev. c-terminale Bindung), die sich auf die Ergebnisse entscheidend auswirken können [38, 68]. Von grösserer Bedeutung könnte hier die Messung der spezifischen Aktivität von Calcineurin sein, um dessen Rolle beim Übergang von kompensierter Hyertrophie zur terminalen Herzinsuffizienz weiter aufzuklären und um dessen Eignung als therapeutisches Ziel zu evaluieren.

## F Literaturverzeichnis

1. British Heart Foundation, in *European Cardiovascular Disease Statistics, 2000 Edition*.
2. Kannel, W.B., *Incidence and epidemiology of heart failure*. Heart Fail Rev., 2000. **5**(2): p. 167-73.
3. Ho, K.K., et al., *The epidemiology of heart failure: the Framingham Study*. J Am Coll Cardiol., 1993. **22**(4 Suppl A): p. 6A-13A.
4. Mann, D.L., *Mechanisms and models in heart failure: A combinatorial approach*. Circulation, 1999. **100**(9): p. 999-1008.
5. Crabtree, G.R. and E.N. Olson, *NFAT signaling: choreographing the social lives of cells*. Cell., 2002. **109**(Suppl): p. S67-79.
6. Hunt, S.A., et al., *ACC/AHA Guidelines for the Evaluation and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: Executive Summary A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation; Endorsed by the Heart Failure Society of America*. Circulation, 2001. **104**(24): p. 2996-3007.
7. Lorell, B.H. and B.A. Carabello, *Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis*. Circulation, 2000. **102**(4): p. 470-9.
8. Barry, S.P., S.M. Davidson, and P.A. Townsend, *Molecular regulation of cardiac hypertrophy*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(10): p. 2023-39.
9. Berenji, K., et al., *Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure?* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(1): p. H8-H16.
10. Benjamin, E.J. and D. Levy, *Why is left ventricular hypertrophy so predictive of morbidity and mortality?* Am J Med Sci, 1999. **317**(3): p. 168-75.
11. Vega, R.B., R. Bassel-Duby, and E.N. Olson, *Control of cardiac growth and function by calcineurin signaling*. J Biol Chem, 2003. **278**(39): p. 36981-4. Epub 2003 Jul 24.
12. Halm, M.A. and S. Penque, *Heart failure in women*. Prog Cardiovasc Nurs., 2000. **15**(4): p. 121-33.
13. Lund, L.H. and D. Mancini, *Heart failure in women*. Med Clin North Am., 2004. **88**(5): p. 1321-45, xii.
14. Sussman, M.A., et al., *Pathogenesis of dilated cardiomyopathy: molecular, structural, and population analyses in tropomodulin-overexpressing transgenic mice*. Am J Pathol, 1999. **155**(6): p. 2101-13.
15. Adams, K.F., Jr., et al., *Gender differences in survival in advanced heart failure. Insights from the FIRST study*. Circulation, 1999. **99**(14): p. 1816-21.
16. Adams, K.F., Jr., et al., *Relation between gender, etiology and survival in patients with symptomatic heart failure*. J Am Coll Cardiol., 1996. **28**(7): p. 1781-8.
17. Regitz-Zagrosek, V., S. Brokat, and C. Tschope, *Role of gender in heart failure with normal left ventricular ejection fraction*. Prog Cardiovasc Dis., 2007. **49**(4): p. 241-51.
18. Regitz-Zagrosek, V., E. Lehmkuhl, and H.B. Lehmkuhl, *[Heart failure--are there gender aspects?]*. Internist (Berl). 2008. **49**(4): p. 422-6, 428.
19. Regitz-Zagrosek, V., et al., *Gender aspects in heart failure. Pathophysiology and medical therapy*. Arch Mal Coeur Vaiss., 2004. **97**(9): p. 899-908.
20. Stromberg, A. and J. Martensson, *Gender differences in patients with heart failure*. Eur J Cardiovasc Nurs., 2003. **2**(1): p. 7-18.
21. Regitz-Zagrosek, V. and E. Lehmkuhl, *Heart failure and its treatment in women. Role of hypertension, diabetes, and estrogen*. Herz., 2005. **30**(5): p. 356-67.

22. Richardson, L.G. and M. Rocks, *Women and heart failure*. Heart Lung., 2001. **30**(2): p. 87-97.
23. Pijna, I.L. and C. Buchter, *Heart failure in women*. Cardiol Rev., 2003. **11**(6): p. 337-44.
24. Ghali, J.K., et al., *Gender differences in advanced heart failure: insights from the BEST study*. J Am Coll Cardiol., 2003. **42**(12): p. 2128-34.
25. Ghali, J.K., *Sex-related differences in heart failure and beta-blockers*. Heart Fail Rev., 2004. **9**(2): p. 149-59.
26. Molkenin, J.D., et al., *A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy*. Cell, 1998. **93**(2): p. 215-28.
27. Clipstone, N.A. and G.R. Crabtree, *Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation*. Nature., 1992. **357**(6380): p. 695-7.
28. Crabtree, G.R., *Calcium, calcineurin, and the control of transcription*. J Biol Chem, 2001. **276**(4): p. 2313-6. Epub 2000 Nov 28.
29. Barford, D., A.K. Das, and M.P. Egloff, *The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation*. Annu Rev Biophys Biomol Struct., 1998. **27**: p. 133-64.
30. Rusnak, F. and P. Mertz, *Calcineurin: form and function*. Physiol Rev., 2000. **80**(4): p. 1483-521.
31. Klee, C.B., H. Ren, and X. Wang, *Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin*. J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13367-70.
32. Jiang, H., et al., *Distinct tissue and cellular distribution of two major isoforms of calcineurin*. Mol Immunol, 1997. **34**(8-9): p. 663-9.
33. Kung, L., et al., *Tissue distribution of calcineurin and its sensitivity to inhibition by cyclosporine*. Am J Transplant., 2001. **1**(4): p. 325-33.
34. Giri, P.R., S. Higuchi, and R.L. Kincaid, *Chromosomal mapping of the human genes for the calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin) catalytic subunit*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **181**(1): p. 252-8.
35. Guerini, D., C. Montell, and C.B. Klee, *Molecular cloning and characterization of the genes encoding the two subunits of Drosophila melanogaster calcineurin*. J Biol Chem., 1992. **267**(31): p. 22542-9.
36. Molkenin, J.D., *Calcineurin and beyond: cardiac hypertrophic signaling*. Circ Res, 2000. **87**(9): p. 731-8.
37. Reuter, A., et al., *A novel calcineurin splice variant that modifies calcineurin activity*. Eur J Biochem., 2001. **268**(22): p. 5955-60.
38. Tsao, L., et al., *Revisiting calcineurin and human heart failure*. Nat Med, 2000. **6**(1): p. 2-3.
39. Guerini, D. and C.B. Klee, *Cloning of human calcineurin A: evidence for two isozymes and identification of a proline structural domain*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1989. **86**(23): p. 9183-7.
40. Wang, M.G., et al., *Calcineurin A alpha (PPP3CA), calcineurin A beta (PPP3CB) and calcineurin B (PPP3R1) are located on human chromosomes 4, 10q21-->q22 and 2p16-->p15 respectively*. Cytogenet Cell Genet., 1996. **72**(2-3): p. 236-41.
41. Muramatsu, T. and R.L. Kincaid, *Molecular cloning and chromosomal mapping of the human gene for the testis-specific catalytic subunit of calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin A)*. Biochem Biophys Res Commun., 1992. **188**(1): p. 265-71.
42. Hemenway, C.S. and J. Heitman, *Calcineurin. Structure, function, and inhibition*. Cell Biochem Biophys, 1999. **30**(1): p. 115-51.
43. Wilkins, B.J. and J.D. Molkenin, *Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **322**(4): p. 1178-91.

44. Hogan, P.G., et al., *Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT*. *Genes Dev*, 2003. **17**(18): p. 2205-32.
45. Bush, E.W., et al., *Canonical transient receptor potential channels promote cardiomyocyte hypertrophy through activation of calcineurin signaling*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(44): p. 33487-96.
46. Timmerman, L.A., et al., *Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca<sup>2+</sup> signals and immunosuppression*. *Nature.*, 1996. **383**(6603): p. 837-40.
47. Houser, S.R. and J.D. Molkentin, *Does contractile Ca<sup>2+</sup> control calcineurin-NFAT signaling and pathological hypertrophy in cardiac myocytes?* *Sci Signal*, 2008. **1**(25): p. pe31.
48. Dolmetsch, R.E., et al., *Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration*. *Nature.*, 1997. **386**(6627): p. 855-8.
49. Guerini, D., *Calcineurin: not just a simple protein phosphatase*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1997. **235**(2): p. 271-5.
50. Sugden, P.H., *Signaling in myocardial hypertrophy: life after calcineurin?* *Circ Res*, 1999. **84**(6): p. 633-46.
51. Martinez-Martinez, S. and J.M. Redondo, *Inhibitors of the calcineurin/NFAT pathway*. *Curr Med Chem.*, 2004. **11**(8): p. 997-1007.
52. Zhu, J. and F. McKeon, *Nucleocytoplasmic shuttling and the control of NF-AT signaling*. *Cell Mol Life Sci*, 2000. **57**(3): p. 411-20.
53. Bourajjaj, M., et al., *NFATc2 is a necessary mediator of calcineurin-dependent cardiac hypertrophy and heart failure*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(32): p. 22295-303.
54. Shibasaki, F., et al., *Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4*. *Nature.*, 1996. **382**(6589): p. 370-3.
55. Zhu, J. and F. McKeon, *NF-AT activation requires suppression of Crm1-dependent export by calcineurin*. *Nature.*, 1999. **398**(6724): p. 256-60.
56. Rao, A., C. Luo, and P.G. Hogan, *Transcription factors of the NFAT family: regulation and function*. *Annu Rev Immunol.*, 1997. **15**: p. 707-47.
57. Sadoshima, J. and S. Izumo, *The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress*. *Annu Rev Physiol*, 1997. **59**: p. 551-71.
58. Im, S.H. and A. Rao, *Activation and deactivation of gene expression by Ca<sup>2+</sup>/calcineurin-NFAT-mediated signaling*. *Mol Cells.*, 2004. **18**(1): p. 1-9.
59. Olson, E.N. and J.D. Molkentin, *Prevention of cardiac hypertrophy by calcineurin inhibition: hope or hype?* *Circ Res*, 1999. **84**(6): p. 623-32.
60. Rothermel, B.A., et al., *Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2001. **98**(6): p. 3328-33.
61. Yang, J., et al., *Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles*. *Circ Res.*, 2000. **87**(12): p. E61-8.
62. Hill, J.A., et al., *Targeted inhibition of calcineurin in pressure-overload cardiac hypertrophy. Preservation of systolic function*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(12): p. 10251-5. Epub 2002 Jan 10.
63. Lim, H.W. and J.D. Molkentin, *Calcineurin and human heart failure*. *Nat Med*, 1999. **5**(3): p. 246-7.
64. Lim, H.W. and J.D. Molkentin, *Reply to revisiting calcineurin and human heart failure*. *Nat Med*, 2000. **6**(1): p. 3.
65. Haq, S., et al., *Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure*. *Circulation*, 2001. **103**(5): p. 670-7.
66. Diedrichs, H., et al., *Increased regulatory activity of the calcineurin/NFAT pathway in human heart failure*. *Eur J Heart Fail*, 2004. **6**(1): p. 3-9.

67. Burkard, N., et al., *Targeted proteolysis sustains calcineurin activation*. *Circulation*, 2005. **111**(8): p. 1045-53. Epub 2005 Feb 21.
68. Ritter, O., et al., *Calcineurin in human heart hypertrophy*. *Circulation*, 2002. **105**(19): p. 2265-9.
69. Lim, H.W., et al., *Calcineurin expression, activation, and function in cardiac pressure-overload hypertrophy*. *Circulation*, 2000. **101**(20): p. 2431-7.
70. Luo, Z., et al., *Calcineurin inhibitors and cardiac hypertrophy*. *Nat Med*, 1998. **4**(10): p. 1092-3.
71. Meguro, T., et al., *Cyclosporine attenuates pressure-overload hypertrophy in mice while enhancing susceptibility to decompensation and heart failure*. *Circ Res*, 1999. **84**(6): p. 735-40.
72. Rothermel, B.A., et al., *Differential activation of stress-response signaling in load-induced cardiac hypertrophy and failure*. *Physiol Genomics*, 2005. **23**(1): p. 18-27. Epub 2005 Jul 20.
73. Wang, Z., et al., *Electrical remodeling in pressure-overload cardiac hypertrophy: role of calcineurin*. *Circulation*, 2001. **104**(14): p. 1657-63.
74. Nagata, K., et al., *AT1 receptor blockade reduces cardiac calcineurin activity in hypertensive rats*. *Hypertension*, 2002. **40**(2): p. 168-74.
75. Wilkins, B.J., et al., *Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy*. *Circ Res*, 2004. **94**(1): p. 110-8. Epub 2003 Dec 1.
76. Obata, K., et al., *Overexpression of calmodulin induces cardiac hypertrophy by a calcineurin-dependent pathway*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2005. **338**(2): p. 1299-305. Epub 2005 Oct 24.
77. Lim, H.W., et al., *Reversal of cardiac hypertrophy in transgenic disease models by calcineurin inhibition*. *J Mol Cell Cardiol*, 2000. **32**(4): p. 697-709.
78. Zou, Y., et al., *Calcineurin plays a critical role in the development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy*. *Circulation*, 2001. **104**(1): p. 97-101.
79. Wilkins, B.J., et al., *Targeted disruption of NFATc3, but not NFATc4, reveals an intrinsic defect in calcineurin-mediated cardiac hypertrophic growth*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(21): p. 7603-13.
80. Bueno, O.F., et al., *Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta - deficient mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(7): p. 4586-91. Epub 2002 Mar 19.
81. Bueno, O.F., et al., *Calcineurin Abeta gene targeting predisposes the myocardium to acute ischemia-induced apoptosis and dysfunction*. *Circ Res*, 2004. **94**(1): p. 91-9. Epub 2003 Nov 13.
82. De Windt, L.J., et al., *Targeted inhibition of calcineurin attenuates cardiac hypertrophy in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(6): p. 3322-7.
83. van Rooij, E., et al., *Requirement of nuclear factor of activated T-cells in calcineurin-mediated cardiomyocyte hypertrophy*. *J Biol Chem.*, 2002. **277**(50): p. 48617-26. Epub 2002 Sep 10.
84. De Windt, L.J., et al., *Calcineurin promotes protein kinase C and c-Jun NH2-terminal kinase activation in the heart. Cross-talk between cardiac hypertrophic signaling pathways*. *J Biol Chem.*, 2000. **275**(18): p. 13571-9.
85. Molkentin, J.D. and I.G. Dorn, 2nd, *Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy*. *Annu Rev Physiol*, 2001. **63**: p. 391-426.
86. Jeong, D., et al., *PICOT attenuates cardiac hypertrophy by disrupting calcineurin-NFAT signaling*. *Circ Res*, 2008. **102**(6): p. 711-9.
87. Hainsey, T., et al., *Cyclosporin A does not block exercise-induced cardiac hypertrophy*. *Med Sci Sports Exerc.*, 2002. **34**(8): p. 1249-54.

88. Zhang, W., et al., *Failure of calcineurin inhibitors to prevent pressure-overload left ventricular hypertrophy in rats*. Circ Res., 1999. **84**(6): p. 722-8.
89. Wilkins, B.J. and J.D. Molkenin, *Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy*. Biochem Biophys Res Commun., 2004. **322**(4): p. 1178-91.
90. *Statistisches Bundesamt 2004, in Kosten 2002 nach Krankheitsklassen*.
91. Blaeser-Kiel, G., *Mangel an Spenderherzen ist der limitierende Faktor*, in *Deutsches Ärzteblatt*. 2004. p. A 2932 - A 2934.
92. Balke, C.W. and S.R. Shorofsky, *Alterations in calcium handling in cardiac hypertrophy and heart failure*. Cardiovasc Res, 1998. **37**(2): p. 290-9.
93. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem., 1951. **193**(1): p. 265-75.
94. Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol., 2002. **3**(7): p. RESEARCH0034. Epub 2002 Jun 18.
95. Taigen, T., et al., *Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(3): p. 1196-201.
96. Liu, P., et al., *Non-catalytic domains of subunit A negatively regulate the activity of calcineurin*. Biochimie, 2005. **87**(2): p. 215-21.
97. Sussman, M.A., et al., *Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition*. Science, 1998. **281**(5383): p. 1690-3.
98. Carroll, J.D., et al., *Sex-associated differences in left ventricular function in aortic stenosis of the elderly*. Circulation, 1992. **86**(4): p. 1099-107.
99. Kostkiewicz, M., et al., *Left ventricular geometry and function in patients with aortic stenosis: gender differences*. Int J Cardiol., 1999. **71**(1): p. 57-61.
100. Lindenfeld, J., H. Krause-Steinrauf, and J. Salerno, *Where are all the women with heart failure?* J Am Coll Cardiol., 1997. **30**(6): p. 1417-9.
101. Petrie, M.C., et al., *Failure of women's hearts*. Circulation., 1999. **99**(17): p. 2334-41.
102. Komuro, I. and Y. Yazaki, *Control of cardiac gene expression by mechanical stress*. Annu Rev Physiol, 1993. **55**: p. 55-75.
103. Hunter, J.J. and K.R. Chien, *Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure*. N Engl J Med, 1999. **341**(17): p. 1276-83.
104. Colomer, J.M. and A.R. Means, *Chronic elevation of calmodulin in the ventricles of transgenic mice increases the autonomous activity of calmodulin-dependent protein kinase II, which regulates atrial natriuretic factor gene expression*. Mol Endocrinol., 2000. **14**(8): p. 1125-36.
105. Diedrichs, H., et al., *Activation of the calcineurin/NFAT signalling cascade starts early in human hypertrophic myocardium*. J Int Med Res, 2007. **35**(6): p. 803-18.
106. Mitsuhashi, S., et al., *Development of an assay method for activities of serine/threonine protein phosphatase type 2B (calcineurin) in crude extracts*. Anal Biochem, 2000. **278**(2): p. 192-7.
107. Oka, T., Y.S. Dai, and J.D. Molkenin, *Regulation of calcineurin through transcriptional induction of the calcineurin A beta promoter in vitro and in vivo*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(15): p. 6649-59.

## Erklärung

„Ich, Jan Christopher Baß, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Regulation der Calcineurin Gene im menschlichen Herzen bei Myokardhypertrophie, ischämischer und dilatativer Kardiomyopathie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

## **Hinweis auf Publikationen von Ergebnissen dieser Arbeit**

### **Originalarbeiten**

J. Nordmeyer, S. Eder, S. Mahmoodzadeh, P. Martus, J. Fielitz, J. Bass, N. Bethke, H. R. Zurbrügg, R. Pregla, R. Hetzer, V. Regitz-Zagrosek:  
Upregulation of Myocardial Estrogen Receptors in Human Aortic Stenosis  
*Circulation* 2004; 110; 3270-3275.

### **Kongressbeiträge**

J. Bass, U. Gemke, R. Pregla, A. Steege, A. Doller, H. R. Zurbrügg, R. Hetzer, V. Regitz-Zagrosek:  
Unterschiedliche Regulation der Calcineurin Gene in humaner kardialer Hypertrophie und in ischämischer und dilatativer Kardiomyopathie  
*Deutsche Gesellschaft für Kardiologie*, Mannheim, 2003

J. Bass, U. Gemke, R. Pregla, A. Steege, A. Doller, H. R. Zurbrügg, V. Regitz-Zagrosek:  
Differential Regulation of the Calcineurin Genes in Human Cardiac Hypertrophy and in Ischemic and Dilated Cardiomyopathy  
*American Heart Association*, Chicago, 2002

J. Bass, U. Gemke, R. Pregla, A. Steege, A. Doller, H. R. Zurbrügg, R. Hetzer, V. Regitz-Zagrosek:  
Differential Regulation of the Calcineurin Genes in Human Cardiac Hypertrophy and in Ischemic and Dilated Cardiomyopathy  
*European Society for Cardiology*, Berlin, 2002

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, keine anderen Promotionsversuche an der Charité – Universitätsmedizin Berlin oder einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung unternommen zu haben.

Berlin, den

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

## Danksagung

Frau **Prof. V. Regitz-Zagrosek** danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und die finanzielle Unterstützung für die Dauer der experimentellen Arbeit. Durch intensive Betreuung, ihr kritisches Wort und vielseitige Anregung hat sie die vorliegende Arbeit und mein wissenschaftliches Denken nachhaltig geprägt.

Herrn **Dr. Reinhard Pregla** möchte ich nachdrücklich für die freundliche Bereitstellung der Myokardproben danken. Bei ihm und bei **Dr. Thore Dietrich** möchte ich mich für das Erlernen des molekularbiologischen Handwerks bedanken. Sie standen stets mit Hilfe und Freundschaft zur Seite. Auch möchte ich mich bei ihnen für die rege Anteilnahme an Studium und Werdegang bedanken, der durch konstruktive Ratschläge positiv beeinflusst wurde.

Mit **Anke Doller, Shokoufeh Mahmoodzadeh, Jens Fielitz** und **Britta Hannack** habe ich viele ideenbringende Diskussionen geführt und so manche logistische Unterstützung erhalten.

Mit **Ulrike Gemke, Sarah Eder, Johannes Nordmeyer, Lars Herda** und **Jenny Thomas** habe ich viele Laborstunden freundschaftlich verbracht.

Meiner Familie danke ich dafür, dass sie mir das Medizinstudium ermöglicht hat und mit viel Liebe, Fürsorge und Verständnis die Grundlage für diese Arbeit schuf.