

1 Einleitung

1.1 Kardiomyopathien

1.1.1 Definition der Kardiomyopathien

Die weitaus häufigste Todesursache in der westlichen Welt sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Eine der wesentlichen Ursachen für den plötzlichen Herztod und Herzinsuffizienz im jüngeren Alter stellen Kardiomyopathien dar (Hayashi *et al.* 2004).

Als Kardiomyopathie werden nach der WHO alle primären Erkrankungen des Myokards unbekannter Ursache bezeichnet, die mit einer kardialen Funktionsstörung einhergehen (Richardson 1996). Es werden unterschieden:

1. Dilatative Kardiomyopathie (DCM) mit Störung der systolischen Funktion
2. Hypertrophische Kardiomyopathie mit oder ohne Obstruktion (HCM)
3. Restriktive Kardiomyopathie (RCM)
4. Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVCM) mit überwiegend rechtsventrikulärem kombiniertem Pumpfehler und ventrikulären Tachykardien
5. Nichtklassifizierbare Kardiomyopathie (NKCM)

Die Genese dieser Krankheitsentitäten ist unbekannt, man spricht daher auch von primären oder idiopathischen Kardiomyopathien. Häufig findet sich bei diesen Erkrankungen eine genetische Veränderung. Zusätzlich werden spezifische, sekundäre Kardiomyopathien differenziert, die durch die Assoziation mit einer speziellen kardialen oder systemischen Erkrankung gekennzeichnet sind. So kennt man beispielsweise durch Alkoholkonsum, Viren, immunologische Prozesse, Diabetes mellitus und arteriellen Hypertonus verursachte Kardiomyopathien. Diese Formen sind also nicht in erster Linie genetisch bedingt und dienen daher in dieser Arbeit nicht weiter als Gegenstand der Betrachtung.

Es wurden die beiden in der Auflistung zuerst erwähnten Krankheitsbilder, also die Dilatative Kardiomyopathie (DCM) und die Hypertrophische Kardiomyopathie (HCM) untersucht.

Histomorphologisches Charakteristikum der HCM ist der Verlust der normalerweise parallelen

Anordnung der Herzmuskelzellen zugunsten einer ungeordneten Struktur („Disarray“ der Myozyten). Makroskopisch findet man eine Hypertrophie der Ventrikelmuskulatur, insbesondere des Kammerseptums. Pathomorphologisches Korrelat der DCM dagegen sind Kardiomegalie („Cor bovinum“) mit interstitieller Fibrose und struktureller Alteration der extrazellulären Matrix. Bei mehr als 60 % der Patienten werden intrakavitäre Thromben beobachtet (Ardjah *et al.* 2003 S.301)

1.1.2 Formen der Herzhypertrophie

Hypertrophie des Herzens wird durch unterschiedliche Reize getriggert. Als physiologische Veränderung ist die Adaptation bei körperlichem Training anzusehen. Pathologische Hypertrophie entwickelt sich durch verstärkte Volumen- oder Druckbelastung und das u.a. nach Herzinfarkt auftretende so genannte „Remodeling“ ebenso wie durch rein intrinsische Mechanismen bei den primären Kardiomyopathien (Kahan *et Bergfeldt* 2005).

Grundsätzlich werden zwei Arten von pathologischen hypertrophen Reaktionen beobachtet: zum einen die sich oft bei Volumenbelastung entwickelnde exzentrische Hypertrophie, welche durch ein verstärktes Längenwachstum der Myozyten mit nachfolgender Dilatation der Ventrikel gekennzeichnet ist. Zum anderen die gehäuft nach Druckbelastung auftretende konzentrische Hypertrophie, bei der es zu einer parallel angeordneten Zunahme der kontraktilen Einheiten kommt, also ein Breitenwachstum der Myozyten und Ventrikelwand resultiert (Carabello *et al.* 2003). Beide Hypertrophieformen können sich im Rahmen einer DCM oder HCM auch primär oder „idiopathisch“ entwickeln. Bei beiden kommt es zu typischen Veränderungen der Genexpression.

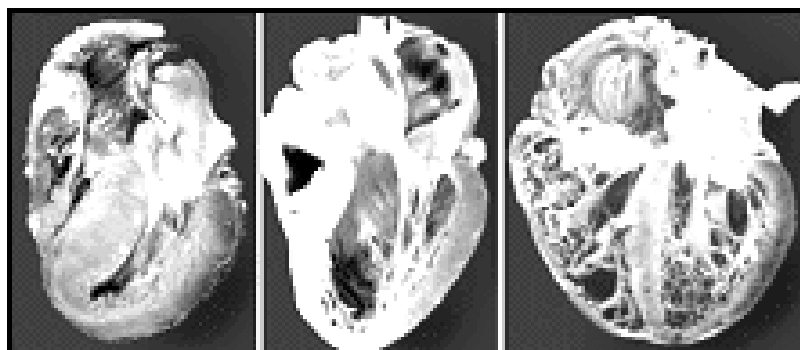


Abb. 1.1: Hypertrophieformen des Herzens (aus Marx 2003), in der Mitte ist ein normales Herz zu sehen, links ein HCM-Herz mit verdickten Ventrikelwänden, rechts ein deutlich vergrößertes DCM-Herz

Exzentrische und konzentrische Hypertrophie führen auf lange Sicht zu weniger effizienter Arbeit der Herzmuskulatur und schließlich zur Herzinsuffizienz. Auch ist das Risiko für Arrhythmien deutlich erhöht (Kahan *et Bergfeldt* 2005).

Initiatoren sich unabhängig von der Hämodynamik entwickelnder hypertropher Reaktionen sind u.a. Insulin, Angiotensin II, Aldosteron und Agonisten am α 1-Adrenozeptor wie Noradrenalin.

Die so genannte physiologische Hypertrophie, wie sie bei Sportlern auftritt, ist durch ein proportionales Wachstum der Muskelzellen ohne verstärkte Expression embryonaler Gene gekennzeichnet, sie führt in der Regel nicht zur Herzinsuffizienz.

1.1.3 Klinik der Kardiomyopathien

1.1.3.1 Klinik der Hypertrophischen Kardiomyopathie

Mit einer Prävalenz der echokardiografisch gesicherten HCM in den USA von ungefähr 0,2 % der Bevölkerung (Towbin *et Bowles* 2002) ist die HCM eine häufige Erkrankung. Das Manifestationsalter liegt meist im 4.-5. Lebensjahrzehnt (Zipes *et al.* 2005, S.1671)

Viele Patienten sind asymptomatisch, die Diagnose somit oft Zufallsbefund. Fakultative Symptome sind Dyspnoe, Angina pectoris-Anfälle und höhergradige ventrikuläre Arrhythmien bis hin zu ventrikulären Tachykardien mit Schwindel, Synkopen und plötzlichen Todesfällen. Über letztgenanntes Phänomen ist die HCM häufige Todesursache bei jungen Leistungssportlern (Sack 2004). Die Prognose hängt unbehandelt entscheidend vom Auftreten ventrikulärer Arrhythmien ab. Die jährliche Letalität liegt bei 3-4 % (Renz-Polster *et Braun* 1999, S.119).

1.1.3.2 Klinik der Dilatativen Kardiomyopathie

Die Prävalenz der DCM beträgt in den USA 40 pro 100 000 Einwohner, die Inzidenz liegt bei 5-8 pro 100 000 Einwohner pro Jahr, das Manifestationsalter bei idiopathischen Formen ist im Mittel zwischen 18 und 50 Jahren (Towbin *et Bowles* 2002).

Die Betroffenen entwickeln eine langsam progrediente Linksherzinsuffizienz mit Belastungsdyspnoe, später kommt es zur Globalherzinsuffizienz. Es treten teilweise ventrikuläre Herzrhythmusstörungen auf.

Die Prognose wird von der noch vorhandenen Ejektionsfraktion des linken Ventrikels bei Diagnosestellung bestimmt. Die jährliche Letalität beträgt ca. 10-20 %; die Patienten versterben zu 50 % an fortschreitender Herzinsuffizienz und zu je 25 % an plötzlichem Herztod und thromboembolischen Komplikationen (Renz-Polster *et* Braun 1999, S.117).

1.1.4 Diagnostik und Therapie der Kardiomyopathien

Sensitive und wegweisende Methode zur Diagnostik der Kardiomyopathien ist die Echokardiografie. Bei der HCM ist insbesondere eine Hypertrophie des Septums zu beobachten. Normwertig ist dieses <12 mm (Voelker 2004), eine HCM ist wahrscheinlich bei Werten >15 mm. Zudem kommt es teilweise zu einer Obstruktion des linksventrikulären Ausflustraktes. Bei der DCM dagegen imponieren eine Dilatation der Herzhöhlen und eine Einschränkung der systolischen Funktion.

Therapeutische Maßnahmen sind abhängig vom Schweregrad der Erkrankung. Eine kausale Therapie ist weder bei der DCM noch bei der HCM möglich, so dass die Maßnahmen symptomatisch orientiert bleiben müssen. Besonders wichtig ist die Behandlung und Vermeidung bedrohlicher Herzrhythmusstörungen.

Als letzte alternative Therapiemöglichkeit bei terminaler Herzinsuffizienz (NYHA-Stadium IV) mit ernster Prognose verbleibt die Herztransplantation. Nachdem 1967 die erste orthotope Herztransplantation beim Menschen von C.N. Barnard durchgeführt wurde, ist die Methode inzwischen zur anerkannten klinischen Therapie geworden. Die Ein- und Fünf-Jahres-Überlebensraten liegen mittlerweile bei 80 % bzw. 75 % (Bohdjalian *et al.* 2004).

1.1.5 Genetik der Kardiomyopathien

Bei primären Kardiomyopathien kann man häufig (s.u.) eine genetische Ursache finden. Der Nachweis krankheitsverursachender Gene erfolgt durch die Kopplungsanalyse bzw. die Untersuchung von Kandidatengen. Bei der molekularen Kopplungsanalyse wird die gemeinsame Vererbung zwischen DNA-Polymorphismen der Mikrosatelliten und einer vererbaren Erkrankung untersucht. Dazu werden eine betroffene Familie und deren Stammbaum benötigt. Über die Kopplung des genetischen Markers mit dem Krankheitsphänotyp kann man dann über Analysen

mithilfe eines zweiten Markers auf die chromosomale Lokalisation schließen (Löffler *et Petrides* 1997 S. 321). Nachteilig ist der große Aufwand und die Notwendigkeit zur Feinkartierung möglichst große Familien mit vielen Betroffenen untersuchen zu müssen.

Als Alternative bietet sich der Kandidatengenansatz an. Dabei werden Gene untersucht, die auf Grund einer Hypothese an der Krankheitsentwicklung beteiligt sein könnten. Es erfolgt eine direkte Untersuchung auf Sequenzveränderungen des entsprechenden Kandidatengens bei möglichst vielen Patienten und Kontrollpersonen. Wenn eine Genvariante in der Patientengruppe signifikant häufiger als bei den Kontrollen auftritt, ist eine Beteiligung des untersuchten Gens am Krankheitsprozess wahrscheinlich. Voraussetzung für dieses Vorgehen ist, dass die Sequenz des Gens bereits bekannt ist. Dies ist mittlerweile durch den Erfolg der Arbeit am Human Genom Project zumeist gegeben. Für die Identifizierung des genetischen Defektes bieten sich Methoden wie SSCP oder eine direkte Sequenzierung des Gens an. Wenn zusätzlich zum Häufigkeitsunterschied eine Kosegregation der gefundenen Veränderung mit der Erkrankung innerhalb einer betroffenen Familie vorliegt und funktionell wichtige Domänen des Proteins betroffen sind, ist die Erhebung des Kandidaten- zum Krankheitsgen möglich.

1.1.5.1 Kandidatengene

Kandidatengene für DCM und HCM sind Gene, die für Proteine kodieren, die im Herzen eine wichtige Funktion ausüben. Das sind Proteine des Sarkomers, wie zum Beispiel das Myosin, und Proteine des Zytoskeletts wie Dystrophin. Die bisher gefundenen krankheitsverursachenden Mutationen betreffen primär diese beiden Proteingruppen. Im Sinne eines Kandidatengens relevant sind auch die Promotorregion und die Enhancersequenz eines Gens, da bei Mutationen in diesen Bereichen die Expressionslevel stark verändert werden können.

Außerdem sind Gene interessant, deren Produkte in die Entstehung kardialer Hypertrophie involviert sind. Dies sind beispielsweise die Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems, Wachstumsrezeptoren, Endothelin1, Zytokine und die jeweils in den abhängigen Signalkaskaden regulierten Proteine. Endothelin1 erhöht beispielsweise die Level von α -Aktin, BNP und dem hhLIM-Protein (Zheng *et al.* 2004).

Melusin, zunächst als Integrin-bindendes Protein isoliert, ist ebenfalls in hypertrophe Signalwege der Herzmuskulatur involviert (Brancaccio *et al.* 2003) und kann somit als Kandidatengenen für die Genese einer DCM bzw. HCM betrachtet werden.

1.1.5.2 Genetik der Hypertrophischen Kardiomyopathie

Bei zwei Dritteln aller HCM-Fälle handelt es sich um familiäre, autosomal-dominant vererbte Formen (Nanni *et al.* 2003). Man kann von einer genetisch heterogenen Erkrankung sprechen, die meisten bekannten Mutationen betreffen jedoch für Sarkomerproteine kodierende Gene. Am häufigsten werden Mutationen im Myosin-Bindungs-Protein C und in der schweren β -Myosin-Kette gefunden.

Bisher sind elf verschiedene Genorte und neun verschiedene Gene bekannt, in denen zahlreiche Mutationen gefunden worden sind, die mit einer HCM assoziiert sind. Penetranz und Ausprägung der klinischen Symptome sind variabel (Maron *et al.* 2004).

Die folgende Auflistung ist dem Übersichtsartikel von Hengstenberg (2003) entnommen.

GDB	Erbgang	Genort	Gen	Literatur
CMH1	AD	14q11–q12	Schwere β -Myosin-Kette	Geisterfer-Lowrance 1990, Tanigawa 1990
CMH2	AD	1q3	Kard. Troponin T	Bonne 1998, Thierfelder 1994
CMH3	AD	15q22.1	α -Tropomyosin	Bonne 1998, Thierfelder 1994
CMH6	AD	7q3	n.b.	MacRae 1995
CMH7	AD	19p13–q13	Kardiales Troponin I	Kimura 1997
CMH8	AD	3p	Leichte Myosinkette (alk. Untereinheit)	Poetter 1996
CMH9	AD	2q24.3	Titin	Satoh 1999
	AD	12q23–q24.3	Leichte Myosinkette (reg. Untereinheit)	Poetter 1996
	AD	11p11	Kardiales Myosinbindungsprotein-C	Carrier 1993, Bonne 1995
	AD	15q14	Kardiales Actin	Mogensen 1999
	AD	20q13.3	Kardiale Myosin-Leichtpeptid-Kinase	Davies 2001

Tab. 1.1: Übersicht über bekannte Genorte und Gene der hypertrophischen Kardiomyopathie; CMH (hypertrophische Kardiomyopathie); AD (autosomal-dominant); GDB (Genome database)

1.1.5.3 Genetik der Dilatativen Kardiomyopathie

Man kennt derzeit vierzehn verschiedene Genorte und acht Gene, in denen verschiedene Mutationen für eine DCM verantwortlich gemacht werden. Es können bis zu 35 % der DCM-Fälle auf eine vererbte Genmutation zurückgeführt werden (Grünig *et al.* 1998). Mehrere bekannte Muta-

tionen in zytoskelettalen und auch sarkomerischen Proteinen führen zu einer DCM, es besteht teilweise eine Assoziation mit Muskeldystrophien (z.B. Muskeldystrophie Duchenne). Meist liegt ein autosomal dominanter Erbgang vor, seltener eine X-chromosomale Form. Ebenfalls wurde ein mitochondrialer Vererbungsmodus beschrieben (Hughes *et* McKenna 2005).

Die nachfolgende Tabelle orientiert sich an dem Übersichtsartikel von Hengstenberg (2003).

GDB	Erbgang	Genort	Gen	Literatur
CMD1A	AD	1p1–q1	Lamin A/C	Kass 1994, Fatkin 1999
CMD1E	AD	3p25–p22	n. b.	Olson <i>et</i> Keating 1996
CMD1F	AD	6q23	n. b.	Messina 1997
CMD1B	AD	9q13–q22	n. b.	Krajinovic 1995
CMD1C	AD	10q21–q23	n. b.	Bowles 1996
CMD1D	AD	1q32	n. b.	Durand 1995
CMD1G	AD	2q31	n. b.	Siu 1999
CMD1H	AD	2q14–q22	n. b.	Jung 1999
CMD1I	AD	2q35	Desmin	Li 1999
CMD1J	AD	6q23–q24	n. b.	Schonberger 2000
	AD	15q14	Kardiales Actin	Olson 1998
	AD	6q12–q16	n. b.	Sylvius 2001
	AD	14q11.2–q13	Kardiales β -Myosin	Kamisago 2000
	AD	1q32	Kard. Troponin T	Kamisago 2000
	AD	5q33–q34	δ -Sarkoglykan	Tsubata 2000
CMD3A	X	Xq28	Tafazzin	Bione 1996
XLDC	X	Xp21	Dystrophin	Muntoni 1993

Tab. 1.2: Übersicht über bekannte Genorte und Gene der dilatativen Kardiomyopathie CMD (dilatative Kardiomyopathie); AD (autosomal-dominant); X (X-chromosomal), GDB (Genome database); n.b. (nicht bekannt)

1.1.5.4 Auswirkung der Mutationen

Die bekannten krankheitsassoziierten Mutationen führen zumeist zu einer alterierten Proteinstruktur. Sie sind unvollständig dominant, das heißt der Kontraktionsapparat besteht aus normalen und veränderten Proteinen, was zu einer Fehlfunktion führt. Solche dominant negativ wirkenden Proteine werden auch als „poison peptides“ bezeichnet (Ganten *et al.* 1998, S. 82). Diese führen zu einer strukturellen wie funktionellen Beeinträchtigung des Kontraktionsapparates. So beobachteten Lankford *et al.* (1995) bei Mutationen in der schweren β -Myosin-Kette in Motilitätsversuchen gegenüber normalem Muskel veränderte Kontraktionseigenschaften.

Die genauen pathogenetischen Mechanismen, die zur Ausprägung eines bestimmten Phänotyps

führen, sind jedoch auch bei nachgewiesener Mutation weitgehend unbekannt. Zudem entwickeln 10 % aller HCM-Patienten im Laufe der Zeit eine DCM. Bei starker Affektion des Kontraktionsapparates ist eine frühere und schwerwiegendere Krankheitsmanifestation zu erwarten als bei leichteren Störungen. „Gen-Dosis-Effekte“ scheinen dabei eine wesentliche Rolle zu spielen. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung wesentlich stärkerer Ausprägung klinischer Beschwerden bei einem für eine Mutation (MYBPC3-R810H) homozygoten Patienten im Vergleich zu einem heterozygot Betroffenen (Nanni *et al.* 2003). Im Tierversuch entwickelten für eine bestimmte Mutation im Myosin-Bindungs-Protein C (MYBPC-3) transgene Mäuse im heterozygoten Falle eine typische HCM, im homozygoten dagegen eine DCM.

Zusätzlich zu der primär krankheitsverursachenden Mutation ist eine Beteiligung von anderen genetisch determinierten Varianten denkbar. Kandidaten für diese Modifikatoren (so genannte „modifier genes“) sind Gene von Komponenten pathogenetisch relevanter Stoffwechselwege. In Frage kommen also sämtliche Gene, die für Proteine aller Hypertrophie-assoziierten Stoffwechselwege kodieren. Hypertrophie ist dabei im Sinne eines Kompensationsmechanismus zum Ausgleich der durch die primär gestörte Anordnung der kontraktilen Filamente oder einer gestörten Calcium-Sensitivität entstandenen Funktionsdefizite zu verstehen (Lim *et al.* 2001).

Varianten in den „modifier genes“ könnten das Manifestationsrisiko der Erkrankung erhöhen (oder auch verringern) beziehungsweise die Ausprägung des Phänotyps beeinflussen (Marian 2002). Beispielsweise wurde eine Variante von TNF α (Tumor necrosis factor) mit einem schweren HCM-Phänotyp assoziiert (Patel *et al.* 2000).

Als Kandidatengen im Sinne der „modifier genes“ bietet sich das Melusin an – ein Protein, das für eine normale hypertrophe Reaktion bei kardialer Druckbelastung von zentraler Bedeutung zu sein scheint (Brancaccio *et al.* 2003).

1.2 Melusin

1.2.1 Gen- und Proteinstruktur

Melusin wurde 1999 von Brancaccio *et al.* als spezifisches Bindungsprotein der Integrinuntereinheiten β 1A und β 1D isoliert.

Das Melusin ist beim Menschen auf Xq12.1-q13 lokalisiert, es besteht aus 11 Exons und 12

Introns (siehe NCBI Acc.nr.: NP_036410.1). Das zytoplasmatische Cystein-reiche Protein enthält 347 AS und ist 38 kDa schwer. Strukturell fand man im C-terminalen Bereich starke Ähnlichkeiten mit den Sequenzen der beiden Proteine Calsequestrin und Calreticulin, bei denen dieser Abschnitt Ca^{2+} -Ionen mit hoher Kapazität und niedriger Affinität bindet. N-terminal besitzt Melusin mehrere Prolin-reiche Motive, die auf eine mögliche Wechselwirkung mit SH3-Domänen hinweisen, und außerdem phosphotyrosinhaltige Stellen, die mutmaßliche Bindungsstellen für SH2-Domänen darstellen (Brancaccio *et al.* 1999). Ebenfalls N-terminal finden sich zwei Cystein- und Histidin-reiche Abschnitte, zwischen denen ca. 90 andere AS liegen (Brancaccio *et al.* 2003). Proteine, die dieses Muster aufweisen werden als CHORD's (für Cystein-Histidin-reiche Domäne) bezeichnet, ihre Spezifität besteht u.a. in ihrer Zn^{2+} -Bindungsfähigkeit (Shirasu *et al.* 1999). Die Integrinbindungsstelle befindet sich im Endbereich des Proteins (AS 211-332). Darin enthalten, AS 217-304, ist eine dem Chaperon p23 homologe Region, die hochkonserviert auch in anderen Proteinfamilien wie den HSP20/ α -Crystallin Proteinen anzutreffen ist (Garcia-Ranea *et al.* 2002).

1.2.2 Kardiale Wirkung

Melusin wird nach Brancaccio *et al.* (1999) ausschließlich in der Skelett- und Herzmuskulatur exprimiert. Abbildung 1.2. verdeutlicht dies.

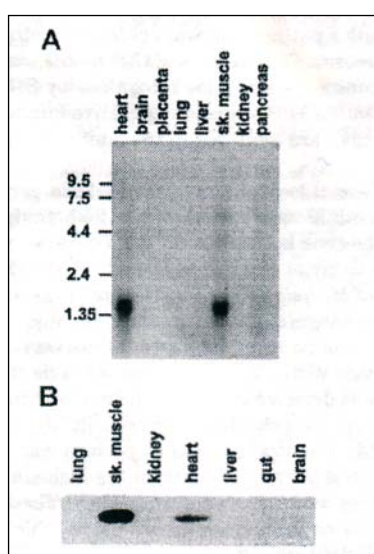


Abb.1.2.: Expressionsmuster des Melusin in menschlichem Gewebe (aus Brancaccio *et al.* 1999)

Die höchsten Expressionsraten wurden in der Skelettmuskulatur von Mäusen nach Traumata der Muskulatur und bei Neugeborenen nachgewiesen. Im Herzen dagegen konnten während der Entwicklung keine Veränderungen der Expression festgestellt werden. Allerdings fanden Acetis *et al.* (2005) nach einwöchiger Druckbelastung des Herzens erhöhte Melusinspiegel bei Mäusen, die eine kompensatorische Hypertrophie entwickelten. Kuncewicz *et al.* (2003) wiesen Melusin auch in Mesangiumzellen der Niere nach.

Innerhalb der Muskelzelle ist, wie in Immunfluoreszenzversuchen gezeigt werden konnte, Melusin in zwei das Aktininband innerhalb der Z-Scheibe flankierenden Reihen angeordnet (Brancaccio *et al.* 1999).

Anlass für die Idee dieser Arbeit waren Ergebnisse, die 2003 von Brancaccio *et al.* veröffentlicht wurden, die dem Melusin eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer konzentrischen Hypertrophie des Herzens bei erhöhter Nachlast, wie sie z.B. bei erhöhtem arteriellen Blutdruck auftritt, zuweisen. Es wurden transgene Melusin-Knockout-Mäuse erzeugt, die sich zunächst normal entwickelten. Herz- und Skelettmuskulatur waren weder funktionell noch morphologisch verändert. Nachdem eine transversale Aortencoarctation (TAC) durchgeführt worden war, zeigten sich jedoch beträchtliche Unterschiede der myokardialen Reaktion im Vergleich zu Melusin-Wildtyp-Mäusen. Der Wildtyp entwickelte eine konzentrische Hypertrophie, die Knockout-Tiere hingegen eine exzentrische Hypertrophie mit sich beständig vergrößerndem linken Ventrikel, was zur Herzinsuffizienz führte und die Letalität signifikant erhöhte. Außerdem wurde eine normale hypertrophe Reaktion nach kontinuierlicher Gabe von Angiotensin II und Norepinephrin in beiden Mäusestämmen gefunden, was verdeutlicht, dass Melusin *selektiv* in die zelluläre Antwort auf erhöhten mechanischen Widerstand eingebunden ist, jedoch in andere, rein biochemische Signaltransduktionswege nicht involviert zu sein scheint.

1.2.3 Signaltransduktion

Weiterhin wurden mögliche Signalwege der Reaktion auf TAC untersucht. Bei den Knockout-Mäusen zeigte sich eine deutlich verminderte Phosphorylierung von GSK3- β serine9. Die dafür responsible Kinase Akt wurde kaum phosphoryliert. Folge ist eine verminderte Inaktivierung der von GSK3- β angestoßenen Signalwege. Die ebenso untersuchten Signalproteine p38 und ERK1/2 waren bei den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp nicht alteriert.

Eine neuere Studie (Acetis *et al.* 2005) mit Melusin überexprimierenden Mäusen wies nach ventrikulärer Druckbelastung eine erhöhte Phosphorylierung von Akt, GSK3- β und auch ERK1/2 im veränderten Mausstamm im Vergleich zu Wildtyptieren nach. Die Mutanten hatten zudem unter normalen Bedingungen eine echokardiografisch nachweisbare leichte HCM, die jedoch ohne funktionelle Konsequenzen blieb. Nach Druckbelastung entwickelten diese Tiere im Gegensatz zum Wildtyp keine DCM und waren so vor Herzinsuffizienz geschützt.

Die folgende Abbildung bietet eine Übersicht über wichtige integrinassozierte hypertrophierelevante Signalwege der Herzmuskulatur nach mechanischer Belastung.

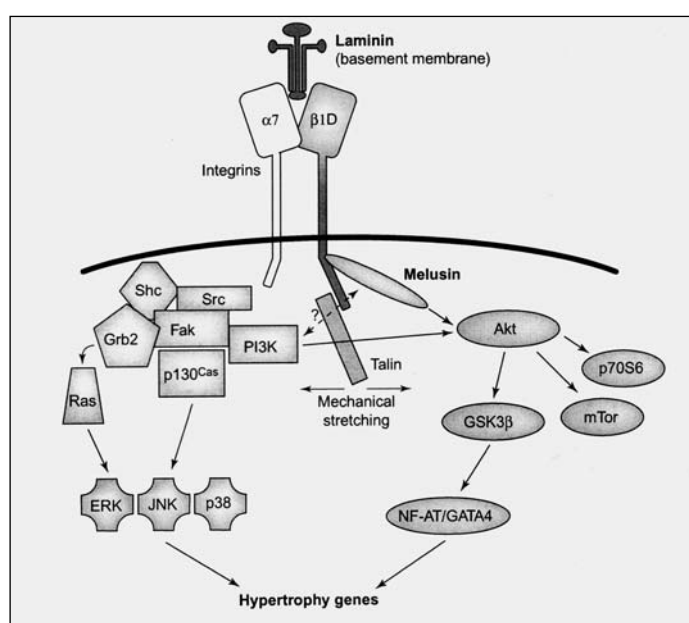


Abb.1.3: Integrinassozierte Signalwege nach mechanischer Druckbelastung des Herzens. (aus Tarone *et al.* 2003)

Die Melusin-Knockout-Mäuse wurden auch hinsichtlich der Fibrosierungs- und Apoptoserate mit den Wildtypmäusen verglichen, die nicht differierten. Brancaccio *et al.* (2003) schließen aus diesen Erkenntnissen, dass die verminderte Inaktivierung von GSK3- β wahrscheinlich zu abnormem Remodeling, also exzentrischer Hypertrophie mit Ventrikeldilatation und nachfolgend zum Herzversagen führt. Eine andere Interpretation der Ergebnisse schlugen Barki-Harrington *et al.* (2003) vor: Nicht die andere Form der Hypertrophie führe zur Verschlechterung der Herzfunktion sondern vielmehr ein verändertes Gleichgewicht zwischen der Aktivierung protektiver und verschlechternder pathophysiologischer Signalwege.

Gesichert erscheint dagegen, dass das Melusin in die biomechanischen Signalwege bei mechanischer Belastung involviert ist, gleichsam als „Sensor“. Im Rahmen dieser Aufgabe kann es das Auftreten einer durch Dilatation des linken Ventrikels hervorgerufenen schweren Herzfunktionsstörung verhindern.

1.3 Herzmuskulatur

1.3.1 Die Herzmuskelzelle – das Sarkomer

Das Sarkomer ist definiert als Wiederholungseinheit einer Myofibrille in Muskelzellen. Es ist zusammengesetzt aus einer geordneten Reihe von Strukturproteinen und kontraktile Proteinen zwischen zwei begrenzenden Z-Scheiben.

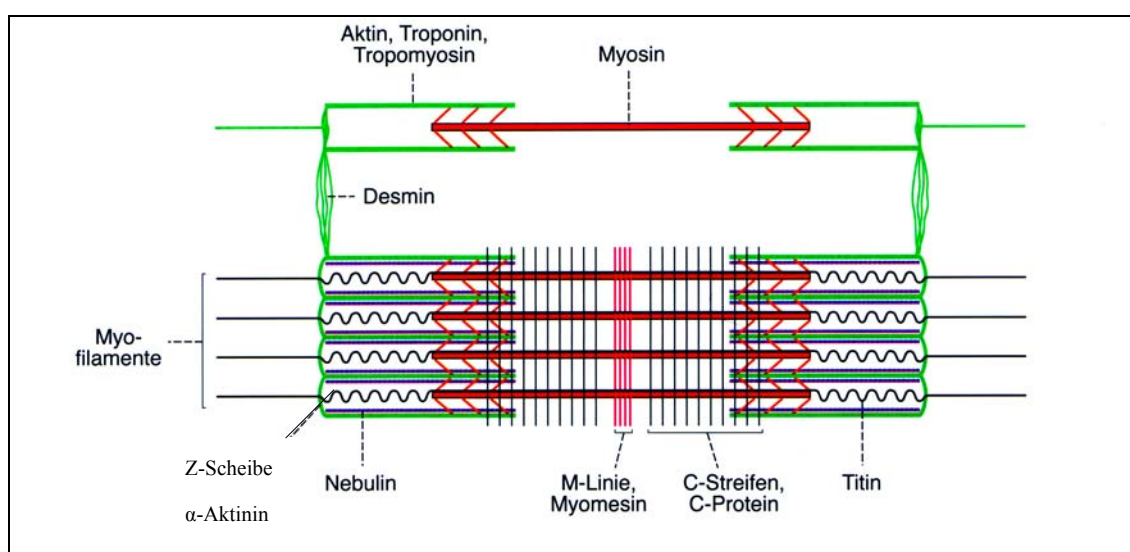


Abb. 1.4: Aufbau eines Sarkomers, Anordnung der kontraktile Proteine und von Strukturproteinen (nach Deetjen *et al.* 1999, S. 156)

1.3.1.1 Kontraktile Proteine

Für das Zustandekommen einer Muskelkontraktion von zentraler Bedeutung sind das dicke Filament, hauptsächlich Myosin, und das dünne Filament, welches primär aus Aktin und Tropomyosin besteht. An das Tropomyosin ist das Regulatorprotein Troponin angelagert.

Die Muskelverkürzung beruht auf einem aneinander Vorbeigleiten der Aktin- und Myosinfilamente (Gleitfilamenttheorie von Huxley). Krafterzeugende Elemente sind dabei Myosin-Aktin-Querbrücken, die durch die ATPase-Aktivität des Myosins in Wechselwirkung mit Aktin zur Entwicklung mechanischer Energie entstehen. Die beiden ein Sarkomer begrenzenden Z-Scheiben bewegen sich aufeinander zu.

Diese Interaktion der beiden kontraktile Proteine wird bei niedrigem zytosolischen Calciumspiegel von Tropomyosin und dem Troponinkomplex gehemmt. Die Muskelkontraktion wird

initiiert, wenn nach einem elektrischen Impuls die Calciumkonzentration innerhalb der Zelle ansteigt. Ionen werden dabei aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) freigesetzt. Mithilfe der von Phospholamban regulierten Ionenpumpe SERCA2 wird das Calcium nach Kontraktionsende wieder in das SR zurückbefördert. Bei steigendem Calciumspiegel bindet Calcium an TnC und setzt dadurch Konformationsänderungen in Gang, an deren Ende die Bindungsstelle des S1-Kopfes des Myosins an Aktin freiliegt und eine Kontraktion ablaufen kann. Der Informationsfluss läuft also über folgende Elemente:

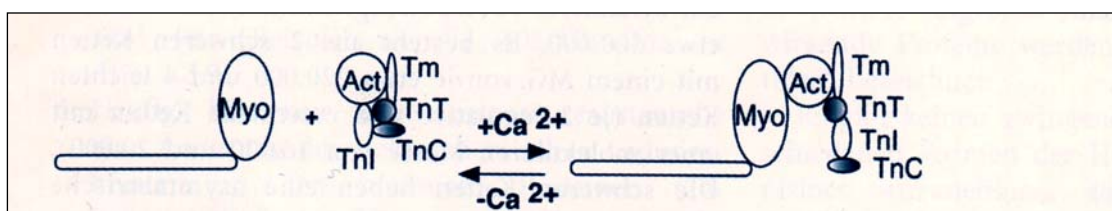


Abb. 1.5: Interaktion von Calcium, dem Troponinkomplex und den kontraktilen Proteinen Aktin und Myosin (aus Ganten *et al.* 1998, S. 84)

1.3.1.2 Strukturproteine

Wie jede Zelle besitzt die Herzmuskelzelle ein Filamentsystem, das der Organisation im Raum und dem mechanischen Kontaktaufbau mit der Umwelt dient – das Zytoskelett. In den Myozyten von zentraler Bedeutung ist die Stabilisierung der Myofibrillen. Daran sind Proteine innerhalb des Sarkomers wie das langgestreckte nichtdehnbare Protein Nebulin und das Riesenprotein Titin, das die Hälfte eines Sarkomers spannt, beteiligt. Außerhalb des Sarkomers wird aus longitudinal und transversal angeordneten Proteinen ein Gittersystem, auch Costamer genannt, gebildet. Die transversal ausgerichteten Proteine verankern im Bereich der Z-Scheibe die freien Enden der Aktinfilamente und die Myofibrillen mit dem Sarkolemm. So wird eine mechanische Kopplung hergestellt. In die Costamere sind viele weitere Proteine einschließlich der Integrine eingeordnet. Titin ist aminoterminal in der Z-Scheibe verankert, wo es an verschiedene Proteine wie α -Aktinin, einem der wichtigsten Proteine der Z-Scheibe, und T-cap bindet. Letzteres ist u.a. mit dem muskulären LIM-Protein (MLP) verbunden (Knöll *et al.* 2002). Das C-terminale Ende interagiert mit dem Myosinbindungsprotein C. Es formt eine dehnbare Verbindung zwischen der Z-Scheibe und dem dicken Filament.

Die Z-Scheibe spielt eine wesentliche Rolle bei der Mechanotransduktion (Knöll *et al.* 2003). Proteine der Z-Scheibe sind in zu Hypertrophie führende Prozesse eingebunden. Mutationen, z.B. im T-cap, wurden bei Kardiomyopathien beobachtet (Hayashi *et al.* 2004).

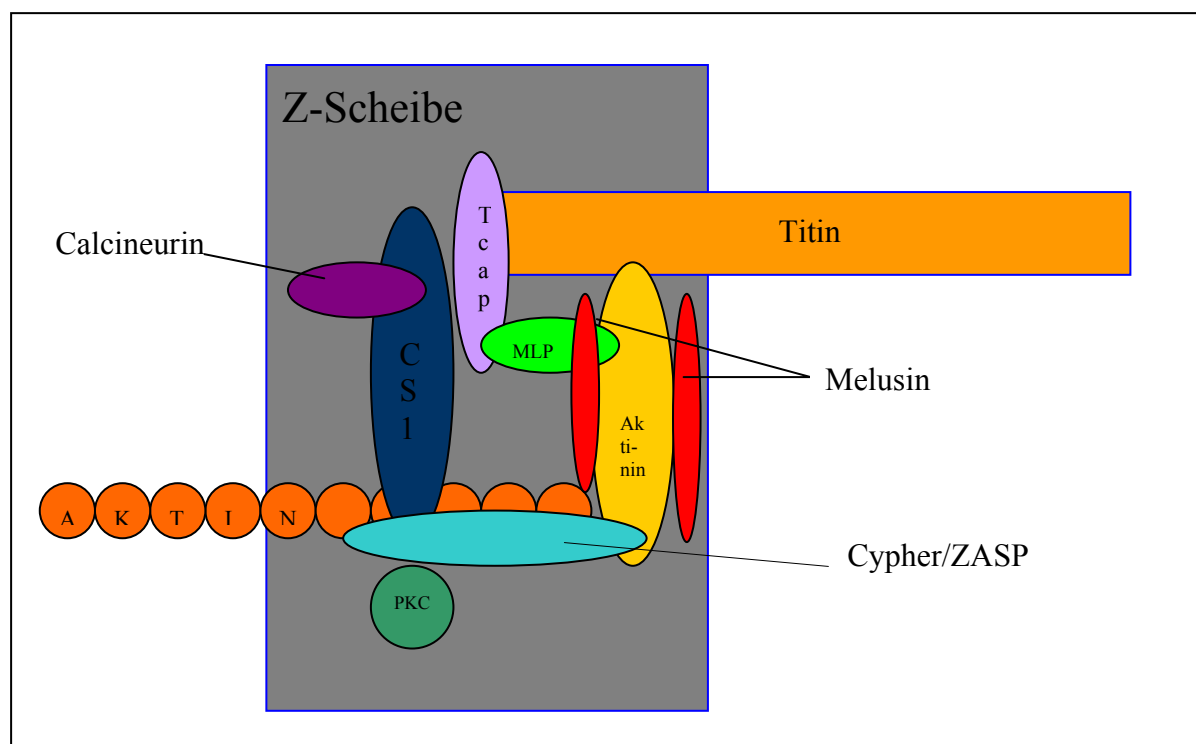


Abb. 1.6: Schema der wichtigsten die Z-Scheibe bildenden Proteine (nach Hayashi *et al.* 2004)
PKC: Proteinkinase C, CS1: Calsarcin-1

1.3.2 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix besteht aus einem komplexen Makromolekülgeflecht, welches den größten Teil des extrazellulären Raumes einnimmt. Fibroblasten bilden sowohl faserförmige Proteine wie Kollagen, Elastin und Laminin als auch die Polysaccharide der ECM. Bei Kardiomyopathien wie auch nach chronischer mechanischer Belastung ist die Konzentration von interstitiellem Kollagen erhöht, die Beweglichkeit der Herzwand vermindert sich.

1.4 Verbindung zwischen intra- und extrazellulärem Raum – Integrine

Die Grundstruktur der Plasmamembran, eine Lipiddoppelschicht, stellt eine hauchzarte Membran dar, die keine größeren Kräfte übertragen kann. Dies wird mittels Ankerproteinen, die starke membrandurchspannende innerhalb der Zelle mit den zugfesten Filamenten des Zytoskelettes verkabelte Strukturen bilden, realisiert. Es gibt drei funktionell unterschiedliche Formen von Ankerverbindungen. Muskelspezifisch ist der Dystrophin-Dystroglycan-Komplex, über den das extrazelluläre Laminin mit Aktin verbunden ist (Hunter *et* Chien 1999). Mutationen in diesem Komplex verursachen beispielsweise die Muskeldystrophie Duchenne. Die anderen beiden Formen der mechanischen Kommunikation der Zelle mit ihrer Umgebung sind ubiquitär anzutreffen. Zum einen kennt man Adhäsionsverbindungen und Desmosomen, die Zellen miteinander verbinden. Sie werden von Transmembranproteinen gebildet, die zur Cadherinfamilie gehören. Zum anderen existiert die Gruppe der Hemidesmosomen und Fokaladhäsionen, die extrazelluläre Matrix und Zelle verbinden. Diese bestehen aus einer weiteren Gruppe von Transmembranproteinen, den Integrinen.

Integrine haben eine zentrale Bedeutung in der Kommunikation zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix. Sie sind sowohl für die Bindung als auch für die Reaktion auf Reize aus dem Extrazellulärraum über die Aktivierung von Signalkaskaden verantwortlich. Auch der umgekehrte Signalweg von intrazellulären Reizen in den Extrazellulärraum wird besprochen. Dabei wird die Affinität der Integrine zu ihren extrazellulären Liganden, z.B. dem Laminin und Fibronectin der Basalmembran, reguliert.

Ein Integrinmolekül besteht aus zwei nicht kovalent verbundenen transmembranen Glykoproteinen, den α - und β -Untereinheiten. Beide kommen in mehreren Subspezies vor, die sich variabel zu einem Molekül verbinden. Es resultiert eine entsprechend große Zahl an verschiedenen Integrinen, die durch alternatives Spleißen einiger Integrin-m-RNAs noch erhöht wird. Ihre Verteilung in verschiedenen Geweben und auch ihr spezifisches Bindungsverhalten variieren. Eine β -Untereinheit knüpft dabei üblicherweise intrazellulär an verschiedene Ankerproteine wie α -Actinin, Talin und Filamin, die ihrerseits wiederum direkt an Aktin oder andere Ankerproteine binden (Tsuji 2004).

Integrine aktivieren intrazelluläre Signalwege, wobei insbesondere die Aktivierung der an die β -Untereinheit angedockten Nichtrezeptortyrosinkinase Fokaladhäsionskinase (FAK) für die Signaltransduktion eine herausragende Bedeutung besitzt. Über diese beeinflussen Integrine die

Aktivität mehrerer u.a. für Hypertrophie relevante Signalmoleküle (s. Abb.1.3). Die Integrin-linked-Kinase (ILK) induziert die Phosphorylierung von Akt und GSK3 (Attwell *et al.* 2003) – Signalwege, die im Zusammenhang mit Melusin von Bedeutung sind (s. 1.2.3).

Die existentielle Bedeutung der Integrine für das Zellwachstum wird durch ein Anoikis genanntes Phänomen verdeutlicht: Nicht mit der Umgebung verknüpfte Zellen stellen ihr Wachstum ein oder sterben durch Apoptose (Anoikis). Diese Abhängigkeit von Umgebungsfaktoren/Verankerung (anchorage dependence) wird über Integrine vermittelt (Kuppuswamy 2002). Heidkamp *et al.* (2002) konnten zeigen, dass eine Suppression der FAK während Hypertrophie-stimulation zu Anoikis führt. Integrine und Wachstumsfaktoren wirken damit oft synergetisch, detaillierte Analysen des Aktivierungsweges der MAP-Kinase haben viele gemeinsame Schnittpunkte aufdecken können, die ein komplexes Interaktionsnetzwerk vermuten lassen (Schwartz *et al.* 2002).

In β 1-Integrin-Untereinheit-Knockout-Experimenten bei Mäusen wurde eine beeinträchtigte kardiale Sarkomerzytoarchitektur beobachtet (Brancaccio *et al.* 1999). Da Veränderungen in diesem Bereich ein Charakteristikum von Kardiomyopathien sind, kann man eine Bedeutung der Integrine und ihrer Bindungspartner, wie z. B. Melusin, für die Genese dieser Erkrankungen vermuten.

1.5 Hitzeschockproteine – Chaperone

Molekulare Chaperone vermitteln die Faltung vieler Proteine, die dadurch eine erhebliche Beschleunigung und Verminderung der Fehlerquote erfährt. Sie gehören zu den bei höheren Temperaturen vermehrt synthetisierten Proteinen, den Hitzeschockproteinen (Hsp).

Die Familie der kleinen Hitzeschockproteine besteht aus mehreren Proteinen mit einem Molekulargewicht von 15-40 kDa. Charakteristisch für sie ist die C-terminal lokalisierte α -Crystallin-Domäne (Haslbeck 2002). Diese Proteine binden bei Beginn einer Denaturierungsreaktion und verhindern bzw. verzögern diese. Das α B-Crystallin wirkt beispielsweise protektiv gegen Effekte ischämischer Noxen, es ist mit Titin assoziiert und erhöht die Stretch-Resistenz (Bullard *et al.* 2003). Exprimiert werden die kleinen Hitzeschockproteine in nahezu allen Geweben, in der Herzmuskulatur macht Hsp 20 ca. 1,3 % der gesamten Proteinmasse aus (Bukach *et al.* 2004)

p23 wirkt als Cochaperon bei der Faltung verschiedener Regulatorproteine, es interagiert mit dem Hitzeschockprotein Hsp90. *In vitro* verhindert p23 die Aggregation von teilgefalteten Proteinen (Garcia-Ranea *et al.* 2002).

Hsp 90 ist ein ubiquitär in Zellen vorhandenes Protein, es macht ca. 5 % des gesamten Proteingehaltes aus. Es übernimmt gemeinsam mit diversen Cochaperonen wichtige Aufgaben bei der Faltung und Regulation vieler Proteine, darunter mehrere Signaltransduktionsmoleküle (Picard 2002). Kürzlich wurde auch eine extrazelluläre Wirkung von Hsp 90 beschrieben (Picard 2004).

Ein weiteres Chaperon ist das im endoplasmatischen Reticulum lokalisierte lösliche Lektin Calreticulin, das Ca^{2+} -abhängig gemeinsam mit Calnexin eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung (Alberts *et al.* 2004, S.469) spielt.

1.6 CHORD - Proteine

Melusin ist ein CHORD-Protein. CHORD steht für Cystidin-Histidin-reiche Domäne. Zuerst wurden die 60 Aminosäuren umfassenden CHORD-Domänen in einem pflanzlichen Krankheitsresistenzgen, Rar1 der Gerste, beschrieben. Es zeigte sich, dass die sich tandemartig wiederholende Sequenz hochkonserviert in Protozoen, Pflanzen und Metazoen vorkommt. Sowohl CHORD-I als auch CHORD-II können jeweils ein Mol-Äquivalent Zn^{2+} binden (Shirasu *et al.* 1999). Evertebraten besitzen ein für ein CHORD enthaltendes Protein kodierendes Gen. In Vertebraten sind zwei solcher Gene vorhanden – das chp1-Gen und das wahrscheinlich im Laufe der Evolution durch Genduplikation entstandene Melusingen (Brancaccio *et al.* 2003).

1.7 Fragestellung

Melusin scheint aufgrund oben genannter Ergebnisse von Brancaccio *et al.* (2003) in die Mechanotransduktion des Herzens involviert zu sein. Mäuse, die Melusin nicht exprimierten, zeigten nach TAC eine im Vergleich zu Kontrolltieren veränderte myokardiale Reaktion und entwickelten eine Dilatation des Herzens mit Herzinsuffizienz. Die von Wildtyp-Tieren gezeigte kompensatorische konzentrische Hypertrophie fehlte.

Melusin ist aufgrund dieses Eingebundenseins in hypertrophe Signalwege der Herzmuskulatur Kandidatengenen für die Entwicklung einer Kardiomyopathie. Die Zielstellung dieser Arbeit war daher zum einen die Etablierung einer geeigneten Screeningmethode für Melusinmutationen und zum anderen ein Mutationsscreening bei Patienten mit einer primären Kardiomyopathie. Für die Methodenetablierung wählten wir eine Kombination aus PCR, SSCP und Sequenzierung. Das Mutationsscreening auf Vorliegen einer Mutation in den 11 Exonen des Melusin führten wir bei Patienten mit einer primären Kardiomyopathie, sowohl HCM als auch DCM, durch. Wir wählten Patienten aus, da wir aufgrund oben genannter Ergebnisse von Brancaccio *et al.* (2003) vermuteten, dass eine Veränderung im Melusingen zu Veränderungen der Wachstumseigenschaften des Myokards führen könne. Dies wiederum könnte die Entwicklung einer primären Kardiomyopathie befördern. Nach erfolgter Mutationssuche untersuchten wir gesunde Kontrollpersonen, um die Häufigkeiten der gefundenen Veränderungen bei von einer Kardiomyopathie Betroffenen und Gesunden zu vergleichen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war also, die Rolle des Melusins bei der Genese von kardialer Hypertrophie im Rahmen der primären Kardiomyopathien zu eruieren.