

## 4 Diskussion

Für das Protein Melusin konnte im Tierversuch eine negative Beeinflussung kardialer konzentrischer Hypertrophie bei Druckbelastung nachgewiesen werden. Melusin-Knockout-Mäuse entwickelten nach Transversaler Aortencoarctation (TAC) eine Dilatation des Herzens (Brancaccio *et al.* 2003). Da für die Genese von Kardiomyopathien Hypertrophie-Signalwege eine wesentliche Rolle spielen, könnten Varianten im Gen des Melusin für die Entwicklung dieser Erkrankungen von Bedeutung sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese untersuchten wir 192 an einer primären HCM bzw. DCM erkrankte, nicht verwandte Probanden auf Vorliegen einer Mutation in den 11 Exons des Melusin-Gens. Dazu wurde die SSCP-Methode verwendet. Bei einer der insgesamt 106 HCM-Patienten fanden wir eine Mutation, die aufgrund eines Aminosäureaustauschs funktionelle Relevanz besitzen könnte. In einem Intron wurde eine weitere Mutation bei einem HCM-Patienten entdeckt. In der Gruppe der untersuchten DCM-Patienten fand sich keine Variante.

### 4.1 Methode

Zum Auffinden von Mutationen in den 11 Exons des Melusin-Gens kombinierten wir die SSCP-Methode mit der direkten Sequenzierung der PCR-Produkte, die bei begründetem Verdacht auf eine Variante im SSCP-Gel durchgeführt wurde. Die Sequenzierung ist aufgrund ihrer nahezu 100%igen Detektionsrate die Idealmethode zur Mutationssuche. Da Zeit- und Materialaufwand jedoch enorm sind, ist dieses Verfahren für die Untersuchung größerer Probandengruppen allerdings eher ungeeignet. Als gute und effiziente Alternative bietet sich die SSCP-Methode an. Diese beruht auf dem Laufverhalten denaturierter DNA im elektrischen Feld – Fragmente, die sich in nur einer einzelnen Base unterscheiden, haben durch eine andere Konformation ein von unveränderten DNA-Stücken differierendes Laufverhalten und können erkannt werden.

Die SSCP-Methode ist erstmals 1989 von Orita *et al.* beschrieben worden und seitdem zu einer häufig verwendeten und etablierten Methode geworden.

Die Sensitivität ist abhängig von mehreren Faktoren wie Gelzusammensetzung, Temperatur und Fragmentgröße, letztere liegt idealerweise bei 150-350 bp (Hayashi *et al.* 1993). Bei Fragmenten mit einer Länge bis zu 200 bp liegt die Spezifität bei 70-90 %, je größer die Fragmente

werden, desto kleiner wird sie (Grompe *et al.* 1993). Nach Highsmith *et al.* (1999) ist der GC-Gehalt der DNA die entscheidende Determinante der Detektionssensitivität. Lugovtsev *et al.* präsentierten jedoch 2004 eine Studie nach der die Diskriminationspotenz von Mutationen im SSCP hauptsächlich von Gelzusammensetzung und Temperatur abhängt; Anzahl und Art von Mutationen und DNA-Länge spielten lediglich eine untergeordnete Rolle.

Yamanoshita *et al.* (2005) erreichten bei der Mutationssuche im p53 Tumor-Suppressorgen in Ösophagustumorgewebe mittels SSCP eine Sensitivität von 81 % und eine Spezifität von 97 %.

Durch die Kombination von zwei verschiedenen Laufbedingungen kann die Sensitivität auf über 98 % erhöht werden. Daher wählten wir zur Optimierung zwei verschiedene Temperaturen und führten für jede Probe die Untersuchung einmal bei 4 °C und einmal bei Raumtemperatur durch. Die Einheitlichkeit der Untersuchungsbedingungen war dabei nur für die 4 °C-Experimente gegeben, die Raumtemperatur unterlag Schwankungen. Da stets eine ausreichende Temperaturdifferenz bestand und eine optimierte Gelzusammensetzung gewählt wurde (s. 2.3), kann von einer hohen Sensitivität ausgegangen werden.

#### **4.2 Melusin als Kandidatengen für die Genese von Kardiomyopathien**

Die Genese von Kardiomyopathien ist nicht vollständig geklärt. Es wurden mehrere Gene identifiziert, bei denen Mutationen mit unterschiedlicher Penetranz und klinischem Schweregrad als krankheitsverursachend angenommen werden dürfen (s. 1.1.5.2 und 1.1.5.3). Genaue pathophysiologische Signalwege sind jedoch nicht bekannt. Die meisten bekannten Mutationen betreffen die kontraktilen Proteine und Elemente des Zytoskeletts.

Wie schon aus der Morphologie kardiomyopathisch geschädigter Herzen (s. Abb. 1.1) zu vermuten ist, sind für die Entstehung von Kardiomyopathien auch in hypertrophe Signalwege involvierte Proteine relevant. Eine veränderte Wachstumsregulation der Myozyten kann sowohl bei der Krankheitsprogression familiärer Formen als auch bei der Pathogenese sekundärer Formen von Bedeutung sein. Dabei ist eine strikte Trennung in primäre und sekundäre Signalwege nicht sinnvoll. So wurden in Herzen mit primärer HCM im Vergleich zu normalen Herzen erhöhte Expressionslevel vieler Proteine, die eigentlich im Kontext mit durch Druckbelastung ausgelöster sekundärer Hypertrophie bekannt sind, gefunden (Lim *et al.* 2001). Es existiert also ein enger funktioneller Zusammenhang zwischen den einzelnen Signalwegen. Entsprechend geeignete

Kandidatengene könnten demnach für die Genese sekundärer Herzveränderungen sowie auch für die Genese primärer Störungen pathogenetisch relevant sein. Vorstellbar ist dies im Sinne von „modifier genes“, die zwar nicht hinreichend für eine pathologische Entwicklung sind, aber unter bestimmten Umständen, wie z.B. dem gleichzeitigen Vorhandensein einer anderen Mutation, bei immunologischen Reaktionen oder unter veränderten hämodynamischen Bedingungen, bedeutsam werden. Ihr zum Teil drastischer Einfluss auf die kardiale Funktion und das Überleben wurde in einem Tiermodell für DCM nachgewiesen (Le Corvoisier *et al.* 2003).

Ebenso denkbar ist eine monogenetische Vererbung einer eine Kardiomyopathie verursachenden Mutation in einem in Wachstumsprozesse involvierten Protein. Dazu müsste eine strukturelle Alteration zu ständig veränderter Aktivität des Proteins führen und somit dauerhaft die, im Normalfall erst unter mechanischer Druckbelastung (beispielsweise) initiierten, hypertrophen Signalwege stimulieren. Das könnte auf lange Sicht betrachtet zur Manifestation einer HCM führen. Sinnvoll ist die Untersuchung der Exons, Exon/Intron-Übergänge und eventuell der Promotorsequenz, die regulatorische Funktion auf die Genexpression ausübt. So sind beispielsweise Mutationen in der Promotorregion des LDL-Rezeptors für eine Hypercholesterinämie ursächlich (Francová *et al.* 2003). Die weitaus überwiegende Anzahl der krankheitsverursachenden Mutationen liegen jedoch in Exons. Beim Melusin untersuchten wir diese einschließlich der Exon/Intron-Übergänge.

#### 4.3 Mutation Intron 6

Wir fanden eine Veränderung in der Basensequenz des Melusin an Position 14 im Intron 6 bei einem an einer HCM erkrankten männlichen Probanden. Thymin wird durch Guanin ersetzt.

Introns sind nicht kodierende Sequenzen und werden im Rahmen der posttranskriptionalen Modifikation entfernt. Dieser Vorgang wird Spleißen genannt. Notwendig ist dies, da das primäre RNA-Transkript meist noch kein funktionsfähiges Molekül darstellt. Mutationen in Introns sind somit häufig nicht relevant. Eine wichtige 15 % aller krankheitsverursachenden Mutationen betreffende (Krawczak *et al.* 1992) Ausnahme stellen genetische Veränderungen an den Spleißstellen und das durch Mutation mögliche Entstehen zusätzlicher Spleißstellen innerhalb eines Introns dar. Da beides für die gefundene Mutation nicht zutrifft, ist eine funktionelle Auswirkung auf das Protein unwahrscheinlich.

Stumme Mutationen in Exons können allerdings die mRNA-Stabilität beeinflussen (Duan *et al.* 2003), was wiederum zu quantitativ veränderter Proteinsynthese führen kann. Inwieweit ein solcher Mechanismus auch für das primäre Transkript möglich ist, ist nicht bekannt. Von Harland *et al.* (2005) wurde eine mit dem Auftreten von malignen Melanomen assoziierte Mutation in einem Intron gefunden, bei der keinerlei Einfluss auf den Spleißvorgang eruiert werden konnte. Das könnte auf bisher unbekannt weitere Mechanismen hinweisen.

Es ist also nicht ausgeschlossen, dass die gefundene Mutation funktionelle Bedeutung besitzt. Da die Wahrscheinlichkeit dafür jedoch sehr gering ist, verzichteten wir auf weitere Untersuchungen.

#### **4.4 Mutation Exon 1**

In der 106 Patienten umfassenden Gruppe der HCM-Patienten wurde bei einer weiblichen Probandin eine heterozygote Punktmutation an AS-Position 37 im Exon 1 entdeckt. Cytosin wird durch Thymin im Sinne einer Transition ersetzt. Dies bewirkt einen Aminosäureaustausch, anstelle von Histidin wird Tyrosin in das Protein eingebaut.

Um einen Polymorphismus auszuschließen, untersuchten wir eine 190 unbekannt Blutspender umfassende Kontrollgruppe, in der die Mutation nicht detektiert werden konnte.

##### **4.4.1 Klinische Daten**

Die Indexpatientin erkrankte im Alter von 38 Jahren an einer HCM, die klinisch durch Herzrhythmusstörungen mit Synkopen imponiert. In der Familie der Indexpatientin wurde bei einem subklinisch erkrankten Bruder ebenfalls die beschriebene Melusin-Mutation gefunden. Der Patient war bei Diagnosestellung wie seine Schwester 38 Jahre alt und klinisch unauffällig. Die Kinder der Indexpatientin sind klinisch und echokardiografisch gesund. Sowohl die Tochter (28 Jahre) als heterozygote Merkmalträgerin wie auch der für die beschriebene Melusin-Mutation hemizygot Sohn (31 Jahre) der Indexpatientin sind beide jünger als es die Indexpatientin und ihr Bruder bei Diagnosestellung waren. Eine Prognose bzgl. der eventuellen Entwicklung einer HCM kann derzeit nicht abgegeben werden. Selbst bei bekannter HCM-verursachender Mutation

wie z.B. in der schweren  $\beta$ -Myosin-Kette kann über die Penetranz und den Schweregrad der Erkrankung oftmals keine Vorhersage gemacht werden (Maron *et al.* 2004). Der hemizygot betroffene Sohn hatte im EKG vereinzelte ventrikuläre Extrasystolen. Dies ist kein pathologischer Befund, kann jedoch früher Hinweis auf eine kardiale Erkrankung sein und ist im weiteren Verlauf zu beobachten. Aufgrund der geringen Anzahl der einer klinischen wie genetischen Untersuchung zugänglichen Familienmitglieder und der nicht vorhersehbaren klinischen Entwicklung der von der Mutation betroffenen Kinder der Indexpatientin kann hier keine genaue Aussage bzgl. eines Kausalzusammenhangs zwischen dieser Mutation im Melusin und der Entwicklung einer HCM getätigt werden. Es ist jedoch zu vermuten, dass ein solcher besteht.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wären weitere, im Rahmen dieser Arbeit nicht zu leistende, Untersuchungen notwendig. Diese könnten die Untersuchung weiterer HCM-Patienten beinhalten, funktioneller Natur sein oder, am aussagekräftigsten und aufwendigsten, die Entwicklung eines Tiermodells.

#### 4.4.2 Troponin T

Bei der Indexpatientin und ihren beiden Kindern, die ebenfalls Träger der beschriebenen Mutation im Melusin sind, ist eine weitere Mutation bekannt. Dabei handelt es sich um eine Variante in der 3'-untranslatierten Region (3'UTR) des Troponin T-Gens.

Troponin T ist als Tropomyosin-bindender Bestandteil des Troponin-Komplexes ein wichtiges Protein bei der Calcium-Regulation während der Muskelkontraktion (s. 1.3.1.1). Mutationen im Troponin T-Gen sind sowohl bei HCM als auch DCM als krankheitsverursachend beschrieben worden, zuerst von Thierfelder *et al.* (1994). Der primäre pathogenetische Mechanismus scheint dabei eine veränderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation bzw. eine alterierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Empfindlichkeit der Kraftentwicklung zu sein (Harada *et al.* 2003). Letztere ist bei den meisten der bekannten mit HCM assoziierten Mutationen erhöht, bei einer zu DCM führenden Mutation erniedrigt (Lu *et al.* 2003). Bisher veröffentlichte Studien beschreiben sequenzverändernde Troponin T-Mutationen (Gomes *et al.* 2004). Wie sich quantitative Proteinveränderungen auswirken könnten, ist nicht bekannt. Daher kann auch keine Hypothese zur funktionellen Auswirkung der hier genannten Mutation aufgestellt werden. Die Mutation könnte beispielsweise als modifizierender Faktor wirken. Obwohl die familiäre HCM zu den klassischen monogen vererbten Erkrankungen zählt,

ist der persönliche „genetic background“ für Ausprägung und Verlauf der Erkrankung wesentlich (s. 1.1.5.4).

Da beide Mutationen bei der Indexpatientin vorliegen, erscheint eine funktionelle Interaktion beider denkbar. Davon spricht man bei Gen-Loci, die häufiger gemeinsam auftreten als es nach dem Zufallsprinzip zu erwarten wäre. Dies geschieht entweder durch enge Nachbarschaft auf einem Chromosom oder durch einen evolutionären Vorteil bei gemeinsamer Vererbung der beiden Loci. Die Frage stellte sich, ob letzteres für die oben beschriebenen Melusin-Mutation und die Mutation im Troponin T vorliegen könnte. Für eine genaue statistische Auswertung sind allerdings die Fallzahlen zu gering. Wir vermuten, dass keine funktionelle Interaktion vorliegt, da der echokardiografisch an einer HCM erkrankte Bruder der Indexpatientin die Veränderung der 3'UTR des Troponin T nicht besitzt. Er ist nur Träger der Melusin-Mutation. Dies deutet auf eine unabhängig von der Gleichzeitigkeit dieser beiden Mutationen auftretende Pathogenese der HCM hin. Melusin könnte krankheitsverursachend sein oder eine andere, bisher nicht bekannte Mutation begleiten.

Wenn man Melusin als monogen krankheitsverursachendes Protein betrachten wollte, müsste man von einem X-chromosomal dominanten Vererbungsmuster sprechen, da sowohl die heterozygote Indexpatientin als auch ihr hemizygot von der Mutation betroffener Bruder erkrankt sind. Bei dieser Vererbungsform sind erkrankte Männer im Allgemeinen schwerer betroffen; ein Faktum, was man für die gegebene Konstellation derzeit nicht konstatieren kann.

#### **4.4.3 Mögliche Auswirkungen der Mutation**

Die beschriebene Mutation bewirkt einen Aminosäure-Austausch. Tyrosin wird anstelle von Histidin in das Genprodukt eingebaut. Beide Aminosäuren haben eine aromatische Seitenkette, die jedoch unterschiedliche Ladungen aufweisen. Histidin ist positiv, Tyrosin dagegen negativ geladen. Daher haben die einzelnen Aminosäuren eine differente, vom pH-Wert abhängige Wasserlöslichkeit. Histidin reagiert im basischen, Tyrosin im sauren Milieu hydrophil. Inwieweit diese unterschiedlichen Eigenschaften der Aminosäuren eine veränderte Struktur und nachfolgend veränderte Funktionalität des gesamten Proteins bewirken, lässt sich derzeit nur vermuten. Die von der Mutation betroffene Domäne wird unter 4.8 näher besprochen werden.

Mutationen können einen Verlust oder Gewinn von Genproduktfunktion bewirken (gain or loss of function). Im Falle des Melusins kann man diesbezüglich nur hypothetische Aussagen treffen, da über die Genfunktion bisher wenig bekannt ist. Das Involviertsein des Melusins in zu Hypertrophie führende Signalwege bei mechanischer Belastung des Herzens ist durch oben (s. 1.2.2) aufgeführte Ergebnisse von Brancaccio *et al.* (2003) gesichert. Das Vorhandensein der hier beschriebenen Mutation in einer Familie mit an primärer HCM erkrankter Patienten lässt eine Bedeutung in der Genese von kardialer Hypertrophie auch beim Menschen vermuten. Auch die Tatsache, dass die Mutation in einer evolutionär stark konservierten Region liegt (s. 3.3.1.6), lässt auf eine Bedeutung als Krankheitsfaktor schließen.

Auf bisher bekannte Signalwege und Pathomechanismen, die im Zusammenhang mit Kardiomyopathien und Hypertrophieentwicklung interessant sind und von Melusin wahrscheinlich mit beeinflusst werden, soll im Weiteren eingegangen werden.

#### 4.5 Hypertrophie und Herzinsuffizienz

Zentrales Merkmal von Hypertrophie ist die Zunahme der Zellgröße. Im Herzen ändert sich zudem die Genexpression, es werden vermehrt fetale Gene reexprimiert. Man unterscheidet exzentrische und konzentrische Hypertrophie (s.1.1.2).

Hypertrophie und Herzversagen sind Charakteristika erkrankten Myokards, die in einem engen und komplexen Verhältnis zueinander stehen. Bei der prognostisch günstigen kompensatorischen konzentrischen Hypertrophie kommt es annähernd zu einer Normalisierung der Wandspannung, wodurch der linke Ventrikel trotz erhöhtem Druck noch ein normales Herzzeitvolumen aufrechterhalten kann. Bleibt diese kompensatorische Hypertrophie aus, resultiert bei zunehmender Belastung Dilatation und Herzinsuffizienz. Dementsprechend ergaben sich bzgl. der Herzfunktion und des Überlebens bei den Melusin-Knockout-Tieren *ohne* konzentrische Hypertrophie nach TAC signifikante Nachteile gegenüber den Wildtyp-Tieren *mit* konzentrischer Hypertrophie.

Auch nach Norton *et al.* (2002) ist konzentrische Hypertrophie nach Druckbelastung von Vorteil. Bei 20 Wochen nach suprarenalem Aortenbanding untersuchten Ratten konnten sie zwei Gruppen voneinander abgrenzen: eine mit Herzinsuffizienz und eine ohne. Die linken Ventrikel waren dabei an Masse vergleichbar, die myokardiale Kontraktilität ebenfalls. Der Unterschied bestand in der Art der Hypertrophieentwicklung: die herzinsuffizienten Tiere hatten eine exzentrische,

die anderen eine konzentrische Hypertrophie entwickelt. Außerdem war der Kollagengehalt in der herzinsuffizient gewordenen Gruppe signifikant höher. Die Hintergründe der Verteilung in die beiden Gruppen wurden nicht exploriert. Anzunehmen ist, dass ein unterschiedlicher „genetic background“ bei den untersuchten Tieren vorlag.

Experimente von Eposito *et al.* (2002) stellen jedoch das Dogma der „guten“ (kompensatorisch konzentrischen) Hypertrophie nach Druckbelastung in Frage. Sie entwickelten zwei genetisch alterierte Mausmodelle, die nach TAC kaum Hypertrophie entwickelten und dennoch im Gegensatz zum Wildtyp keine oder nur eine geringe Verschlechterung der kardialen Funktion erlitten. Eine erhöhte Wandspannung ist also nicht per se für die Verschlechterung der kardialen Funktion verantwortlich. Auch bei von Takimoto *et al.* (2005) untersuchten Tieren mit Inhibition des cGMP-Abbaus durch Sildenafil, war eine geringere Hypertrophieentwicklung mit einer besseren Herzfunktion gekoppelt.

Die obenstehenden Erkenntnisse sind nicht eindeutig interpretierbar, werfen durch ihre Widersprüchlichkeit Fragen auf. Die zentrale Frage ist, wie konzentrische Hypertrophie zu bewerten ist. Denkbar wäre, dass sie als eine Art „Zwischenstadium“ auf dem Weg zur Herzinsuffizienz gesehen werden kann. In diesem „Zwischenstadium“ wäre die Herzfunktion besser als bei Individuen ohne kompensatorische Zellvergrößerung. Im weiteren Verlauf würde sich dies dann ändern. Einen ähnlichen Verlauf kennt man vom „Hochdruckherzen“ bei arterieller Hypertonie (Schannwell *et al.* 2005).

Auch nach der Framingham-Studie ist kardiale Hypertrophie als prognostisch negativ einzustufen, stellt sie doch einen unabhängigen Risikofaktor bzgl. der kardiovaskulären Mortalität dar (Lips *et al.* 2002). Die enorme Bedeutung der involvierten Signalwege erklärt sich daraus. Detaillierte Kenntnisse der Pathomechanismen würden Optionen für Prävention und Therapie eröffnen. Diesbezüglich waren See *et al.* (2004) erfolgreich: Durch eine Inhibition der in hypertrophe Signalkaskaden eingebundenen p38 MAPK nach Myokardinfarkt bei Ratten verminderten sie das Remodeling und erreichten so eine bessere kardiale Funktion. Takimoto *et al.* (2005) konnten im Tierversuch mittels kontinuierlicher Gabe von Sildenafil, einem Inhibitor von PDE5A (eine cGMP-Esterase), eine kardiale Hypertrophie nach Druckbelastung verhindern. Klinisch bewährt ist seit einigen Jahren die Anwendung von ACE-Hemmern, Angiotensin II-Rezeptorantagonisten und  $\beta$ -adrenergen Rezeptorblockern; sie vermögen eine bestehende Hypertrophie partiell zu reduzieren (Hardt *et al.* Sadoshima 2004). In diesem Sinne könnte, genauere biochemische Kenntnisse vorausgesetzt, auch das Melusin Zielmolekül eines Pharmakons sein.



Unklar bleibt, welche Unterschiede zwischen den Signaltransduktionswegen zu physiologischem versus pathologischem Remodeling führen und ob es möglicherweise Übergänge zwischen beiden gibt. Fraglich auch, ob allein der Remodeling-Prozess den Verlauf bestimmt.

Derzeit ist eine Vielzahl von Signalwegen bekannt, die in der Herzmuskulatur eine hypertrophe Reaktion auslösen können. Initiator kann eine direkte Erhöhung hypertropher Stimuli wie z.B. Angiotensin II und Stimulation der  $\alpha$ -Adrenozeptoren sein oder auch eine Reduktion von anti-hypertrophen Signalen wie beispielsweise unter Einflussnahme der  $\beta$ -Adrenozeptoren. Ebenfalls möglich ist ein verminderter Abbau von bereits vorhandenen Proteinen wie dies z.B. mittels von Schilddrüsenhormonen und dem Neuropeptid Y geschieht (Schlüter *et* Wollert 2004). Die einzelnen Signalwege sind dabei in einem komplexen Netzwerk miteinander verbunden und beeinflussen sich gegenseitig („crosstalk“). Im ausgewachsenen Herzen besteht normalerweise ein Gleichgewicht zwischen pro- und anti-hypertrophen Faktoren. Wenn sich dieses verschiebt, resultiert entweder Hypertrophie oder Dilatation.

Wichtiger extrinsischer Auslöser kardialer Hypertrophie ist neben Ischämie mechanische Belastung des Herzens. Auf die Transformation mechanischer Stimuli in intrazelluläre Signale, also auf die Signalwege der Mechanotransduktion, in die, wie bereits mehrfach erwähnt, das Melusin eingebunden ist, soll im nächsten Abschnitt näher eingegangen werden.

#### **4.6 Mechanotransduktion der Herzmuskulatur**

Als Reaktion auf akute Steigerung des ventrikulären Druckes kann die Herzmuskulatur die kontraktile Kraft mithilfe des Frank-Starling-Mechanismuses erhöhen. Bei chronischer Belastung erfolgt ein langsam einsetzender Remodelingprozess. Allein in Anbetracht der ausgesprochen hohen Prävalenz des arteriellen Hypertonus in westlichen Gesellschaften, liegt die klinische Bedeutung der Reaktion auf kontinuierliche mechanische Überlastung des Herzens auf der Hand.

Chronische mechanische Belastung des Herzens induziert neben Apoptose vor allem eine zunächst kompensatorisch zu nennende Hypertrophie der Myozyten. Dies beruht zum Teil auf der Freisetzung von auto- und parakrinen wachstumsstimulierenden Faktoren (Sussmann *et al.* 2002). Wesentlich ist jedoch die Fähigkeit unabhängig von humoralen oder neuronalen Faktoren auf mechanische Stimuli zu reagieren. Jede einzelne Zelle kann so als Mechanosensor verstanden werden (Ingber 2002). Der genaue Mechanismus der Übertragung der extrazellulären physi-

kalischen Signale in intrazelluläre elektrochemische Signale ist derzeit noch unbekannt. Es existieren mehrere Theorien, die beispielsweise das Durchsickern der Information über eine Zufallsreihe bei über einer bestimmten Schwelle liegender Informationsmenge („percolation“-Modell), die kontinuierliche Weiterleitung vom elastischen Zellkortex zum viskösen Zytoplasma (Kontinuum-Modell) oder das an ein Architekturmodell angelehnte Zusammenspiel von kompressionsresistenten und spannungsproduzierenden Strukturen im „tensegrity“-Modell in den Vordergrund der Betrachtung stellen (Calaghan *et al.* 2004).

Knöll *et al.* (2003) unterscheiden zwei parallel existierende, kommunizierende Modelle: Das zentralisierte und das dezentralisierte Modell. Ersteres beschreibt in unmittelbarer Nähe der Plasmamembran ablaufende Vorgänge, letzteres Abläufe, die vom Zytoskelett transmittiert räumlich verteilt überall innerhalb der Zelle simultan stattfinden. Zum zentralisierten Modell gehören dehnungsaktivierte Ionenkanäle (z.B. für  $\text{Ca}^{2+}$ ), direkt durch mechanische Belastung aktivierte second messengers (Tyrosinkinase vom Nichtrezeptortyp wie Src) und Integrine. Integrine interagieren unter anderem mit der Fokaladhäsionskinase (FAK), die ihrerseits eine große Anzahl verschiedener Signalmoleküle (Grb2, Akt, ERK1/2 etc.) beeinflusst. Dies ist essentiell zur Hypertrophie- und Fibroseentwicklung nach mechanischer Belastung (Wakatsuki *et al.* 2004). Die Bindung an intrazelluläre Ankerproteine prädisponiert die Integrine außerdem zu einem Bindeglied zwischen zentralisiertem und dezentralisiertem Modell, auf dessen Elemente im Folgenden näher eingegangen werden soll.

#### 4.6.1 Z-Scheibe und Zytoskelett

Wichtigste Struktur des dezentralisierten Modells der Mechanotransduktion ist die Z-Scheibe (s. Abb.1.6). Die darin verankerten Moleküle sind in der Lage, mechanische Informationen aufzunehmen und dadurch die myokardiale Funktion dynamisch zu beeinflussen. Diese Proteine sind demzufolge auch im Zusammenhang mit Kardiomyopathien von größtem Interesse. Mutationen führen zu einem Netzwerkdefekt, sie zeigen Wichtigkeit und Vulnerabilität des Systems auf. So fand man Kardiomyopathien verursachende Mutationen in mehreren Genen für mit der Z-Scheibe assoziierten Zytoskelettproteinen. Beispiele hierfür sind beschriebene Kardiomyopathien durch Defekte in MLP, in T-cap und in Cypher/ZASP.

Letzteres ist an  $\alpha$ -Aktinin in der Z-Scheibe gebunden und besitzt C-terminal eine mit der Proteinkinase C assoziierte LIM-Domäne. In diesem Protein wurde von Arimura *et al.* (2003) in einer 96 DCM-Patienten umfassenden Studie eine Mutation gefunden, die höchstwahrscheinlich krankheitsverursachend für eine spät einsetzende DCM (>50 Jahre) ist. Durch diese wird die Affinität der LIM-Domäne für die Proteinkinase C erhöht.

Ein sehr interessantes Protein ist das MLP (muscle lim protein). Durch ein MLP-Knockout-Mausmodell konnte ein der menschlichen DCM sehr ähnliches Krankheitsbild erzeugt werden. Die Z-Scheibe ist bei diesen Tieren desorganisiert. Interessanterweise entwickeln Doppelnull-Mäuse MLP/Phospholamban (s. 1.3.1.1) keine DCM (Minamisawa *et al.* 1999), die Z-Scheibe ist nicht verändert (Knöll *et al.* 2002). Offenbar existiert zwischen Zytoskelett und Calcium-Homöostase der Zelle ein funktioneller Zusammenhang. Dies illustriert die Verknüpfung der einzelnen Signalwege zu einem untrennbar nur gemeinsam denkbaren Wirken auf Form, Struktur und Funktion der Myozyten. Die vorgenommene Einteilung dient der leichteren Betrachtbarkeit, muss jedoch letztendlich artifiziell bleiben.

Ganz im Sinne dieses „crosstalks“ zwischen den Signalwegen steht folgende Beobachtung von Heineke *et al.* (2005): MLP ist für die stressinduzierte Calcineurin-NFAT-Aktivierung (s. 4.7) erforderlich. Ein gestörter MLP-Calcineurin-Signalweg in den Z-Scheiben (bei MLP<sup>+/-</sup>-Mäusen nach Myokardinfarkt) ist mit vermindertem transversalen Myozytenwachstum, verstärkter Ventrikeldilatation und kontraktiler Dysfunktion verbunden. Könnte Melusin ebenfalls in den Calcineurin-Signalweg involviert sein? Die Beobachtung beeinträchtigter Hypertrophieentwicklung sowohl bei den MLP- als auch den Melusin-Knockout-Mäusen lässt dies nicht unmöglich erscheinen. Unterstützung erfährt diese Hypothese durch den bestehenden Antagonismus von GSK-3 $\beta$  gegenüber den Calcineurinwirkungen (Antos *et al.* 2002). MLP und Melusin sind also eventuell funktionell miteinander gekoppelt.

Wichtiger Schauplatz und Drehpunkt der Mechanotransduktion scheint ein von Titin, T-cap, MLP, CS-1 und  $\alpha$ -Aktinin gebildeter Komplex zu sein. Dies suggerieren Analysen von Mutationen im MLP und im T-cap. Eine mit einer DCM assoziierte MLP-Mutation führt zu einer defekten Interaktion zwischen MLP und T-cap (Knöll *et al.* 2002). In T-cap selbst wurden Genmutationen sowohl bei Patienten mit HCM als auch mit DCM gefunden. Funktionelle Untersuchungen ergaben, dass im Falle der HCM-Mutationen eine erhöhte Interaktion von T-cap mit Titin und CS-1 vorliegt. Bei der DCM-Mutation dagegen kommt es zu einer verminderten Interaktion mit Titin, CS-1 und MLP (Hayashi *et al.* 2004). Diese Ergebnisse verdeutlichen die zent-

rale Bedeutung der Z-Scheibe. Zukünftigen Studien obliegt die Klärung der Frage, ob Melusin Element dieses Komplexes ist.

Auch auf das Riesenprotein Titin soll noch einmal kurz eingegangen werden. Es ist in seiner Funktion als mechanische Feder im Sarkomer entscheidend für dessen Compliance. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass im insuffizienten Herzen veränderte Titinisoformen exprimiert werden und zu Kardiomyopathien führende Mutationen im Titin beschrieben worden sind (Gerull *et al.* 2002). Das Verhalten der Sarkomere auf Belastung dürfte in diesen Fällen verändert sein. Dies kann weitreichende Konsequenzen haben, im heranwachsenden Fetus z.B. erleichtern fetale Titinformen durch eine erhöhte Compliance der Sarkomere die Myofibrillogenese (Walker *et Tombe* 2004).

Ebenfalls nicht zu vergessen in der Pathogenese von Kardiomyopathien im Zusammenhang mit zytoskelettalen Strukturen ist der Dystrophin-Dystrophin-Komplexes (s. 1.4).

Wie soeben erläutert, dient das Zytoskelett also nicht nur der mechanischen Stabilität und Informationsübertragung der Zelle. Es findet auch eine unmittelbare Beeinflussung metabolischer Vorgänge statt, deren Komponenten flexibel in der Gerüststruktur des Zytoskeletts verankert sind. So fungiert die Z-Scheibe als Zwischenstation für Calcium-Signalproteine wie Calcineurin, Kinasen, Phosphatasen und auch für transkriptionsrelevante Proteine, die sich zwischen der Z-Scheibe und dem Nucleus bewegen (Pyle *et Solaro* 2004). Zusätzlich interagiert das Zytoskelett mit bestimmten Typen von Ionenkanälen, deren Besonderheit es ist, auf mechanische Stimuli reagieren zu können (SACs – stretch-activated channels). Sie werden von der Beschaffenheit des Zytoskeletts beeinflusst, so dass dessen Struktur über die SACs auch indirekt Einfluss auf den Ionengehalt der Zelle nimmt (Calaghan *et al.* 2004).

Die nicht unbedeutende Rolle der kleinen Hitzeschockproteine (sHsp) an der Strukturhaltung des Zytoskeletts soll unter 4.9 näher beleuchtet werden.

Obenstehende Ergebnisse geben Einblick in die enorme Bedeutung des zellulären Gerüsts für die strukturelle und funktionelle Integrität des Herzens. Melusin, das  $\alpha$ -Aktinin beidseitig flankiert, ist als Bestandteil der Z-Scheibe möglicherweise unentbehrlich für die adaptive kardiale Reaktion auf mechanische Druckbelastung. Als Bindungspartner der Integrine ist Melusin Element der Integrin-vermittelten Mechanotransduktion in Herzmuskelzellen.

Auch von diesen ist, bei niederen Säugetieren, eine Lokalisation in Höhe der Z-Scheibe bekannt. Es gibt allerdings Hinweise auf eine unterschiedliche räumliche Anordnung in verschiedenen

Spezies. Sætersdal *et al.* (2002) untersuchten die Verteilung der  $\beta$ 1-Untereinheit der Integrine in menschlichem Myokard. Ihr Ergebnis war eine verstreute Lokalisation auf dem Sarkolemm, nicht nur in der der Z-Scheibe gegenüberliegenden Membranregion. Dies relativiert einmal mehr die direkte Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Tierversuchen auf den Menschen. Nichtsdestotrotz soll im nächsten Abschnitt die Bedeutung der Integrine besprochen werden, unabhängig von ihrer genauen Lokalisation in den Myozyten.

Zuvor jedoch noch die kurze Anmerkung, dass nach Aquila *et al.* (2004) trotz der ausgeführten Bedeutung des Zytoskeletts die histomorphologische Regeneration eines alterierten Zytoskeletts nicht direkt die kardiale Funktion komplett wiederherstellen kann. Diese Hypothese wurde nach Untersuchungen an mit LVAD behandelten Patienten aufgestellt.

#### 4.6.2 Integrine

Ross *et al.* konnten 1998 erstmals eine direkte Beteiligung der  $\beta$ 1-Integrin-Untereinheit an hypertrophen Signalwegen der Herzmuskulatur nachweisen. Daraufhin zeigten Pham *et al.* (2000), dass insbesondere die Integrinuntereinheit  $\beta$ 1D und die FAK in die hypertrophe Reaktion von Kardiomyozyten eingebunden sind. Weitere Studien offenbarten ausgeprägte Synergieeffekte zwischen Integrinen und Wachstumsfaktorrezeptoren (Ross 2004).

Integrine wirken als Mechanozeptoren. Akute Druckbelastung aktiviert initial die an die zyttoplasmatische Integrinseite gebundene FAK, chronische Druckbelastung verstärkt u.a. die Expression von mehreren Integrinuntereinheiten wie beispielsweise der  $\beta$ 1-Untereinheit. Daraus resultiert eine stabilere Vernetzung von ECM und Zytoskelett (Babbitt *et al.* 2002). Die Signalgebung in Richtung Hypertrophie wird durch mehrere Mechanismen angestoßen. Als wichtigste (s. Abb. 1.3) seien einerseits die von der FAK regulierten MAP-Kinasen ERK, JNK und p38 sowie die unter 4.6.4 ausführlich zu besprechende Kinase Akt genannt. Letztere wird u.a. von der mit den Integrinuntereinheiten  $\beta$ 1 und  $\beta$ 3 interagierenden Integrin-linked-Kinase (ILK) phosphoryliert und aktiviert (Attwell *et al.* 2003). Da Melusin ebenfalls  $\beta$ 1-Bindungspartner ist und involviert in den Akt-Signalweg, wäre es interessant herauszufinden, ob die ILK und Melusin interagieren.

Integrine sind außerdem durch mechanische Reizung der  $\beta$ 1-Untereinheit aktivierbare  $Cl^-$ -Kanäle direkt am mechano-elektrischen Feedbackmechanismus beteiligt (Browe *et Baumgarten* 2003).

Noch ein anderer Integrin-Signalweg ist im Gespräch: Es wird vermutet, dass mechanische Stimuli direkt die Genexpression verändern können. Die Information soll dabei von der zytoplasmatischen Seite der Integrine über dort gebundene Elemente des Zytoskeletts eine Veränderung in der Kernhülle und von dort über Laminin Konformationsänderungen direkt im Chromatin bewirken können (Iqbal *et al.* 2005).

In all die erwähnten Signalwege, die integrinassoziiert eine hypertrophe Reaktion auslösen, sind weitere Proteine eingebunden. Das so genannte SLIM1/FHL1 beispielsweise, das Skelettmuskel-LIM-Protein 1, wird in Abhängigkeit von der Ligandenbindung an  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine exprimiert. Auch scheint es in die Pathogenese der Kardiomyopathien einbezogen zu sein, so findet bei HCM eine signifikante Hochregulation, bei DCM eine signifikante Herabregulation statt (McGrath *et al.* 2003).

Ein direkter Link der  $\beta_1$ -Untereinheit zu Kardiomyopathien ist durch die Experimente von Shai *et al.* (2002) evident geworden. Die  $\beta_1$ -Untereinheit kardial nur minimal exprimierende Mäuse entwickelten im Alter von 6 Monaten eine dilatative Kardiomyopathie; sie zeigten eine myokardiale Fibrose, die Apoptoserate war nicht erhöht. Erhöhter mechanischer Belastung nach TAC waren sie nicht gewachsen und starben signifikant häufiger als genetisch nicht veränderte Mäuse nach TAC. Dies verdeutlicht wiederum die Bedeutung der Integrine für Mechanotransduktionsvorgänge und Hypertrophie.

#### 4.6.3 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (ECM) spielt für die mechanischen Eigenschaften des Herzens eine wesentliche Rolle. Chronische Drucküberlastung führt zu erhöhter interstitieller Kollagenkonzentration. Die größeren Kollagenmengen werden von Myofibroblasten produziert, welche sich bei mechanischer oder parakriner Stimulation aus Fibroblasten differenzieren (Wakatsuki *et al.* 2004). In Konsequenz der Fibrose sinkt die myokardiale Elastizität, die Herzfunktion verschlechtert sich. Wesentlicher Faktor der Fibroseentwicklung ist Angiotensin II (Lips *et al.* 2002), das neben Endothelin I und anderen auto- bzw. parakrinen Faktoren als Stressantwort von Fibroblasten ausgeschüttet wird (Sussmann *et al.* 2002).

Die Reaktion der Fibroblasten auf Druckbelastung, d.h. die Aktivierung der MAP-Kinase und die Expression von Kollagen I, erfolgt interessanterweise in Abhängigkeit von der Zusammen-

setzung der Umgebungsmatrix (Atance *et al.* 2004). Durch die stattfindenden Veränderungen bei chronischer Druckbelastung entsteht so wahrscheinlich ein Feedback-Mechanismus.

Weiterer Langzeiteffekt der strukturellen Umbauvorgänge in der ECM ist, dass sich, bedingt durch eine stärkere Verknüpfung von ECM und Zelle, die zytoskelettale Mechanik und Funktion ändert. Verantwortlich ist auf Seite der ECM ein stark erhöhter Gehalt an Fibronectin, einem  $\beta$ 1-Integrin-Bindungspartner, und, zellulär, eine erhöhte Integrindichte (Heling *et al.* 2000).

Inwieweit das Melusin an diesen Interaktionen möglicherweise Anteil hat, ist derzeit noch vollständig unbekannt.

#### 4.6.4 Involvierte Signaltransduktionsmoleküle

In zu Hypertrophie führende Mechanotransduktionsvorgänge sind mehrere Signaltransduktionswege eingebunden. Zu erwähnen sind die Wege über G-Proteine, insbesondere  $G_{\alpha q}$ , die Proteinkinase C, die Janus-assoziierten Kinasen (JAKs) und die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen. Letztere werden in drei Subfamilien eingeteilt: die extrazellulär-regulierten Kinasen (ERK), die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und die p38 MAP Kinase (Lammerding *et al.* 2004). Baba *et al.* (2003) untersuchten die Änderungen im Aktivitätslevel einiger Signaltransduktionsmoleküle vor und nach Einsetzen eines LVAD bei aufgrund einer DCM bzw. ICM herzinsuffizienten Patienten. Besonders MEK/Erks und Akt/GSK-3 $\beta$  zeigten sich responsibel auf die veränderten mechanischen Bedingungen. (GSK-3 $\beta$  wurde aktiviert, die anderen signifikant inaktiviert.) Nach Wakatsuki *et al.* (2004) gehören diese zu den vorteilhaften, physiologische Hypertrophie auslösenden Signalmolekülen. Zu pathologischem Remodeling führen dagegen  $\beta$ -adrenerge Stimulation, Angiotensin II und der Calcineurin/NFAT-Signalweg.

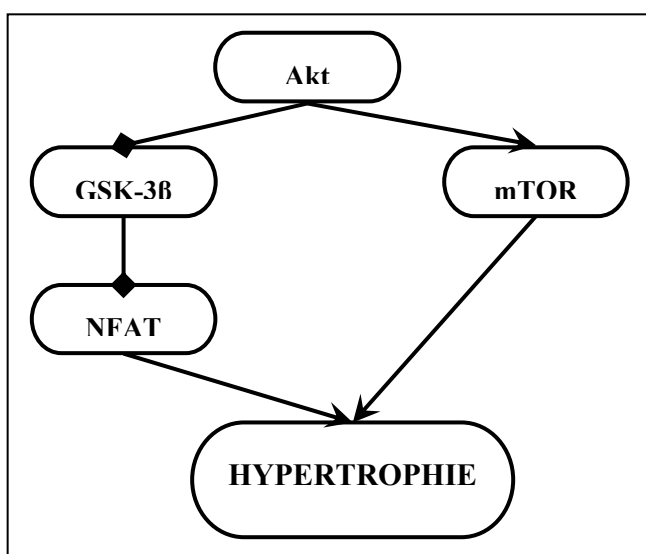
Es besteht eine gewisse Koinzidenz zwischen den durch mechanische Belastung und den durch Wachstumsfaktoren und anderes gesteuerten Signalwegen.

Da im Kontext der bei den Melusin-Knockout-Mäusen erfolgten Untersuchungen nach TAC eine gegenüber dem Wildtyp veränderte Aktivierung von Akt und der Serin/Threonin-Kinase GSK-3 $\beta$  (Glycogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$ ) gefunden wurde, soll im Folgenden ausführlicher auf diesen Transduktionsweg eingegangen werden.

#### 4.6.4.1 Beeinflussung des Zellwachstums durch Akt und GSK-3 $\beta$

Die Proteinkinase B, üblicherweise Akt genannt, wird als Induktor physiologischer Hypertrophie betrachtet. Ihre Aktivität erhöht sich nicht nur nach mechanischer Belastung sondern auch nach Hypoxie und diversen biologischen Stimuli wie z.B. Insulin. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz ist sie dauerhaft erhöht (Matsui *et al.* 2004). Akt hat antiapoptotische Effekte und starke Wirkung auf das Zellwachstum. Letzteres wird hauptsächlich über mTOR und GSK-3 $\beta$  vermittelt. mTOR scheint für die Hypertrophieantwort auf Druckbelastung des Herzens nicht unwesentlich zu sein, da diese durch den mTOR-Inhibitor Rapamycin gehemmt werden kann (Shioi *et al.* 2003). GSK-3 $\beta$  wird von Akt phosphoryliert und damit inaktiviert, was wiederum die GSK-3 $\beta$ -abhängige Signalgebung über Transkriptionsfaktoren wie NFAT (nuclear factor of activated T cells) negativ beeinflusst.

Untenstehendes, grob vereinfachtes Schema soll die eben genannten Signalwege illustrieren.



**Abb.4.1:** Schema zur Akt/ GSK-3 $\beta$  Hypertrophie-Regulation, (Akt hemmt GSK-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$  hemmt die NFAT, welche wie mTOR direkt die Hypertrophie stimulieren)

GSK-3 $\beta$  ist demzufolge negativer Regulator von Hypertrophie. Michael *et al.* (2004) erzeugten ein transgenes Mausmodell, in dem die Tiere unverändertes GSK-3 $\beta$  in verstärktem Maße exprimieren. Diese Tiere sind im postpartalen Kardiomyozytenwachstum und der Kontraktilität des Herzens dramatisch beeinträchtigt. Im Ca<sup>2+</sup>-Haushalt zeigen sich Veränderungen, die auf einer Herabregulation der Ca<sup>2+</sup>-ATPase des Sarkoplasmatischen Reticulums (SERCA2a) beruhen. Die erhöhte zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration kann dabei wesentlich zu einer diastolischen Funktionsstörung (Relaxationsstörung) beitragen.



Antos *et al.* (2002) experimentierten ebenfalls mit Mäusen, die eine erhöhte Aktivität der GSK-3 $\beta$  aufweisen. Nach Druckbelastung und chronischer  $\beta$ -adrenerger Stimulation zeigten diese Tiere eine gegenüber Kontrolltieren verminderte hypertrophe Reaktion. Auch bei den Melusin-Knockout-Mäusen bestand nach TAC eine verstärkte Aktivität der GSK-3 $\beta$ ; sie entwickelten analog Obenstehendem eine Dilatation des Herzens.

Kontinuierliche herzspezifische Überexpression von Akt, die also mit einer verminderten Aktivität der GSK-3 $\beta$  einhergeht, führt erwartungsgemäß zu konzentrischer Hypertrophie. Allerdings geht diese bei einigen Individuen in eine DCM über (Matsui *et Rosenzweig* 2004).

Bei einer genetischen Veränderung, die die Aktivität von Akt dauerhaft erhöht und GSK-3 $\beta$  dauerhaft beeinträchtigt, wäre eine ähnliche Verlaufsform vorhersehbar. Dies stellt ein denkbares Szenario für die unter 4.4 beschriebene Mutation dar und erklärte die bereits unter normalen hämodynamischen Bedingungen zustande kommende Hypertrophie. Die Klärung der Frage inwieweit dies lediglich ein Gedankenexperiment darstellt, ist zukünftigen Experimenten vorbehalten.

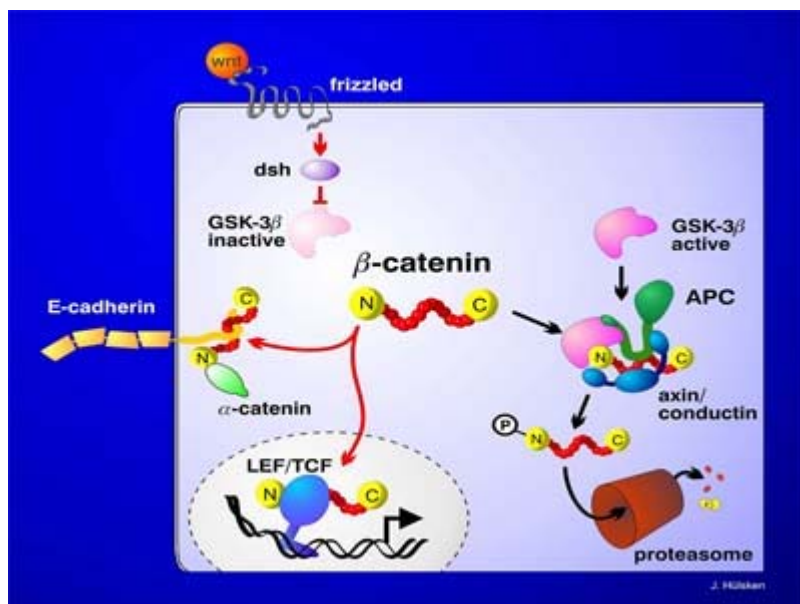
Die Signalwege, die von GSK-3 $\beta$  angestoßen werden, sollen Gegenstand des nächsten Abschnittes sein.

#### 4.6.4.2 Signalgebung durch GSK-3 $\beta$

GSK-3 $\beta$  hat zweierlei Funktionen: Zum einen als Komponente des Wnt/Wingless-Signalweges, zum anderen als Mediator von dem Wachstumsfaktorsignalweg zugeordneten Kaskaden. Reguliert wird das Enzym durch die bereits besprochene Kinase Akt oder alternativ durch GBP (GSK-3-bindendes Protein). Eine verminderte Aktivität von GSK-3 $\beta$  führt zu abnehmender Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin, welches dadurch via geringerer Ubiquitinierung vor dem proteosomalen Abbau geschützt wird und akkumuliert. Das Protein  $\beta$ -Catenin ist üblicherweise vergesellschaftet mit Cadherinen und in diesem Kontext bei der, auch mechanisch relevanten, Zell/Zell-Adhäsion aktiv. Diese Zellverbindungen determinieren die Plastizität der Zellausrichtung nach mechanischem Stress – ein Faktum, das im Zusammenhang mit dem bei HCM auftretenden „disarray“ der Myozyten Aufmerksamkeit erregt (Matsuda *et al.* 2005). Ebenso wichtig ist die zweite Funktion des  $\beta$ -Catenins: Es ist transkriptionelles Regulatorprotein. Bei nach entsprechender Signalgebung erhöhter Konzentration und freiem Vorkommen im Zytosol kann  $\beta$ -Catenin in den Kern eintreten. Dort findet eine negative Wechselwirkung mit dem auf Genregu-

latorproteine hemmend wirkenden LEF-1/TCF-Komplex statt, in dessen Folge mit der Transkription von Wnt-Zielgenen begonnen wird (Rochat *et al.* 2004). Zu diesen zählt u.a. das für den wirkungsvollen Zellwachstum- und Proliferationstimulator c-Myc kodierende *c-myc*-Gen (Alberts *et al.* 2004, S.1043).

Folgende Abbildung illustriert die beschriebenen Signalwege.



**Abb.4.2:** Schema zur Regulation des Wnt-Signalweges über GSK-3β (von J. Hülsken, Quelle: [http://www.em2.molmed.uni-erlangen.de/de/Projekte/Proj\\_wnt\\_dt.htm](http://www.em2.molmed.uni-erlangen.de/de/Projekte/Proj_wnt_dt.htm); Download 10.05.2005)

Im hypertrophierten Herzen wurden von Masuelli *et al.* (2003) in beschriebenem Sinne veränderte  $\beta$ -Catenin und GSK-3 $\beta$ -Spiegel gefunden. Sie untersuchten  $\delta$ -Sarcoglykan-Knockout-Hamster, bei denen ein verminderter Spiegel von GSK-3 $\beta$  und eine Akkumulation von  $\beta$ -Catenin in den Glanzstreifen gefunden wurden. Die erhöhten  $\beta$ -Catenin-Spiegel waren dabei nicht auf eine erhöhte Transkription sondern auf einen verminderten Abbau des Proteins zurückzuführen.

Auch bei einer gänzlich anderen Erkrankung, der Adenomatösen Polyposis Coli, wird  $\beta$ -Catenin durch einen anderen pathophysiologischen Weg kaum abgebaut und führt nachfolgend zu unkontrolliertem Zellwachstum.

Ebenso bedeutsam sind die über Calcium regulierten Signaltransduktionswege, auf die unter 4.7 näher eingegangen werden wird.

Zum Abschluss dieses Kapitels zur Mechanotransduktion soll erwähnt werden, dass diese bemerkenswerterweise keineswegs nur zur adaptiven Bewältigung von neu aufgetretenem mechan-

ischem Stress wichtig ist. Auch in der Entwicklung spielen diese Vorgänge eine entscheidende Rolle. So waren bei Zebrafischembryos, deren Blutfluss verändert wurde, die Herzdrehung und die Klappenmorphologie pathologisch affiziert (Huang *et al.* 2004).

#### 4.7 Calcium – Regulator des Myozytenwachstums

Für die Kopplung von Excitation und Kontraktion und auch für die Relaxation der Herzmuskulatur ist Calcium unerlässlich (s. 1.3.1.1). Aber das ist nicht alles: Überdies wirkt das intrazelluläre Calcium entscheidend an der Hypertrophieregulation mit. Die beteiligten Signaltransduktoren sind die Proteinkinase C und die beiden Calcium/Calmodulin abhängigen Kinasen Calcineurin und Proteinkinase II (CaMK) (Lammerding *et al.* 2004). Calcineurin ist höchst potenter Induktor von kardialer Hypertrophie, der infolge ansteigender Calciumkonzentration über eine Aktivierung von Mitgliedern der NFAT-Transkriptionsfaktorenfamilie mit nachfolgender Translokation in den Nucleus arbeitet. Die Calcineurin-Effekte können von Cyclosporin A und FK-506 antagonisiert werden (Baines *et al.* 2004).

Der intrazelluläre Calciumspiegel ist Teil der Modulationen im Rahmen der Mechanotransduktion: Er steigt bei mechanischer Belastung an. Primär erhöht sich daraufhin die Kontraktilität, sekundär wird jedoch über oben erwähnte Signalproteine eine hypertrophe Reaktion ausgelöst (Sussmann *et al.* 2002) und Apoptose induziert (Liao *et al.* 2003). In diesem Zusammenhang sei kurz erwähnt, dass laut Cheng *et al.* (2004) die  $\beta$ 1-Integrin-Untereinheiten die Regulation des Calciumhaushaltes über L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle beeinflussen. Die Wechselwirkung von Integrinen und ECM ist also auch hierbei bedeutsam.

Im insuffizienten Herzen ist die Calcium-Homöostase nachhaltig gestört, was sich in zahlreichen Abnormitäten bei Rezeptoren, Ionenpumpen, und anderen für die Regulation des Calciumhaushaltes bedeutsamen Proteinen widerspiegelt (Braunwald *et al.* 2000). Dies prädispositioniert zu Arrhythmien und behindert sowohl systolische wie diastolische Funktion nachhaltig. Besonders die beiden Proteine Phospholamban und SERCA2 sind Knotenpunkte der Kontrolle kardialer Kontraktilität. Expressionsveränderungen finden sich auch nach Stimulation mit bestimmten Signalmolekülen, beispielsweise der GSK-3 $\beta$  (s. 4.6.4.1).

Bei DCM ist eine erhöhte Aktivität von Calcineurin bekannt (Diedrichs *et al.* 2004).

*In vitro* Bindungsexperimente zeigten, dass die Interaktion von Melusin und den Integrinen nur

in Abwesenheit von Kationen stattfindet. Dies suggeriert eine Regulation durch die intrazelluläre Calciumkonzentration. Calcium könnte die Konformation dergestalt ändern, dass die Integrin-bindungsstelle im Endbereich des Proteins nur bei geringem Calciumgehalt freiliegt. (Brancaccio *et al.* 1999). Bei höherem Calcium-Spiegel wird Calcium dann wahrscheinlich am carboxy-terminalen Ende des Melusins gebunden. Dort befindet sich eine auch in Calsequestrin und Calreticulin vorhandene Domäne, die bei diesen Proteinen für eine mit hoher Kapazität und niedriger Affinität versehene Calcium-Bindung verantwortlich ist.

Aufgrund dieser partiellen Strukturähnlichkeiten sollen einige Bemerkungen zu Calreticulin und Calsequestrin folgen. Ersteres gehört zu den Chaperonen und ist im embryonalen Herzen über Interaktion mit Calcineurin bei Wachstumsprozessen hochbedeutsam; im adulten Herzen ist Calreticulin u.a. wichtig für die Calcium-Homöostase (Michalak *et al.* 2002).

Calsequestrin ist ein mit der SR-Membran verankertes Protein des SR-Lumens. Calsequestrin-Überexpression führt im Tierversuch zu konzentrischer Hypertrophie, die nach wenigen Lebenswochen in eine dilatative Kardiomyopathie übergeht. Die Ausschüttung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR ist beeinträchtigt, die folgende verminderte zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bedingt eine Abnahme der kardialen Funktion. Interessanterweise ist diese durch (einen Anstieg der Calciumkonzentration bewirkende) Inhibition von Phospholamban reversibel (Kiriazis *et al.* 2000).

Zurück zum Melusin. Bei erhöhter mechanischer Belastung steigt der Calciumspiegel. Gleichzeitig wird mithilfe des Melusins eine kompensatorische hypertrophe Reaktion in Gang gesetzt. Der erhöhte Calciumspiegel führt mutmaßlich zum Abdiffundieren des Melusins vom Integrin. Dies könnte Bedingung für das Einsetzen der Hypertrophie sein. Das gebundene Melusin wäre inaktiv, das freie aktiv. Dies würde eine positive Beeinflussbarkeit der Melusin assoziierten Reaktion auch durch andere Calcium-erhöhende Signale implizieren. Demgegenüber würde eine Calciumverminderung eine Beeinträchtigung der Hypertrophiefähigkeit der Myozyten auf Druckbelastung bedeuten. Letzteres stünde im Einklang mit den oben beschriebenen Beobachtungen nach Calsequestrin-Überexpression.

#### 4.8 CHORD-Domäne

Die in dieser Arbeit beschriebene Mutation befindet sich in der CHORD I-Domäne des Melusins. Häufig bewirkt ein AS-Austausch eine Änderung des elektrochemischen Ladungsmusters in

dem mutierten Protein. Damit können signifikante Struktur- und Funktionsänderungen der betroffenen Region erwartet werden. Die funktionelle Bedeutung der hier zur Disposition stehenden Region, der CHORD-Domäne, ist allerdings noch nicht umfassend erforscht.

Bei *C.elegans* wurde von Shirasu *et al.* (1999) eine Beeinflussung der Entwicklung durch das CHORD-enthaltende Protein 1 (Chp1) nachgewiesen. Bei Pflanzen besteht eine funktionelle Bedeutung bei der Resistenz gegen Erkrankungen.

Nach Wu *et al.* (2005) interagiert Chp1 mit dem Hitzeschockprotein Hsp90, ist wahrscheinlich als Co-Chaperon aktiv. Die in diesem Protein wie auch im Melusin vorhandene CS-Domäne, die hohe Homologien zu den Proteinen p23 und Hsp20/ $\alpha$ -Crystallin aufweist (Garcia-Ranea *et al.* 2002), dient dabei als Bindungsstelle. Die CS-Domäne des Chp1 ist für die Interaktion mit Hsp90 notwendig jedoch nicht ausreichend. Für eine Bindung wird die CHORD II-Domäne benötigt. CHORD I scheint nicht unbedingt notwendig zu sein. Bei den Hsp90-Co-Chaperonen Sgt1 und p23 ist dagegen allein die CS-Domäne ausreichend (Lee *et al.* 2004). Bei dem pflanzlichen Gen Rar1 hingegen wurde eine Interaktion mit Hsp90 nachgewiesen, die ausschließlich von CHORD I abhängig ist (Takahashi *et al.* 2003). Aus diesen heterogenen Daten kann nicht ohne weiteres für das Melusin geschlossen werden. Es erscheint jedoch möglich, dass die beschriebene Mutation in der CHORD I-Domäne über eine Strukturänderung eine veränderte Funktionalität bewirkt, die eine, zurzeit lediglich hypothetische, Interaktion mit Hsp90 signifikant beeinflussen könnte.

Die Bedeutung der Hitzeschockproteine im Myokard soll im Folgenden näher betrachtet werden.

#### 4.9 Hitzeschockproteine – Chaperone

Zwischen den Hitzeschockproteinen und der strukturellen Identität des Zytoskeletts bestehen enge Zusammenhänge. Deshalb sind diese Proteine auch im Zusammenhang mit der Entwicklung von Herzerkrankungen wie den Kardiomyopathien von Interesse. So ist eine Missense-Mutation im sHsp  $\alpha$ B-Crystallin mit einer Desmin-assoziierten Kardiomyopathie vergesellschaftet (Sanbe *et al.* 2004).  $\alpha$ B-Crystallin ist normalerweise als Chaperon und Bindungspartner von Desmin, Titin und Aktin an der Aufrechterhaltung der Intermediärfilamentstruktur beteiligt. Bei der eben genannten Erkrankung sammelt sich nicht abgebautes amyloidähnliches Material in (bisher als Charakteristikum von neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer bekannten) Aggresomen; die Erkrankung ist also eine kardiale Amyloidose.

Auch andere Mitglieder der sHsp-Familie sind mit Komponenten des Zytoskeletts assoziiert. Hsp20 und  $\alpha$ B-Crystallin sind beispielsweise mit Aktin kolokalisiert, was eine Modulation der zytoskelettalen oder kontraktilen Dynamik seitens der sHsps vermuten lässt. In der Tat kann nach Hinzufügen von phosphoryliertem Hsp20 ein vergrößertes Shortening und eine schnellere Calciumaufnahme ins SR detektiert werden (Pipkin *et al.* 2003). In glatten Muskelzellen sinkt nach durch Kontraktionsstimuli ausgelöster Phosphorylierung von Hsp20 die dynamisch-räumliche Interaktion von Hsp20 mit Aktin und  $\alpha$ -Aktinin, woraus Relaxation resultiert (Tessier *et al.* 2003).

Protektive Effekte für die Z-Scheibe haben, zumindest in der Skelettmuskulatur, Hsp25 und  $\alpha$ B-Crystallin. Dies schließen Koh *et Escobedo* (2003) aus direkt nach repetitiver Längenkontraktion durchgeführten Untersuchungen, bei denen eine Verlagerung von Proteinen der Z-Scheibe wie  $\alpha$ -Aktinin und gleichzeitig eine Translokation und Phosphorylierung von Hsp25 und  $\alpha$ B-Crystallin zur Z-Scheibe hin festgestellt wurden.

In der Herzmuskulatur kann man eine vergleichbare Reaktion nach Ischämie beobachten: Eine wahrscheinlich kardioprotektiv wirksame Verlagerung und Phosphorylierung von  $\alpha$ B-Crystallin zur Z-Scheibe hin (Eaton *et al.* 2001).

Nach Inhibition der Proteasomen resultiert ebenso eine Translokation von sHsps, die auf die Aktinfilamente des Zytoskeletts schützend wirken soll (Verschuure *et al.* 2002). Zusammenfassend kann man also von einer Protektion der strukturellen Identität des Zytoskeletts durch die sHsps ausgehen.

An dieser Stelle soll noch einmal erwähnt werden, dass das Melusin eine hochkonservierte homologe Region gemeinsam mit Hsp20, den  $\alpha$ -Crystallin-Proteinen und p23 besitzt (Garcia-Ranea *et al.* 2002).

Auch im Zusammenhang mit der Mechanotransduktion sind die Hitzeschockproteine zu nennen: Zu der frühen Antwort auf hämodynamische Belastung des Herzens gehört die Induktion ihrer Expression (Ruwhof *et van der Laarse* 2000). In Chondrozyten wurde beispielsweise eine spezifische Hsp90-Induktion durch hydrostatischen Druck ausgemacht (Elo *et al.* 2003).

Das Hsp90 besitzt besondere Bedeutung, es bildet gemeinsam mit vielen Cochaperonen einen Proteinkomplex. Zu dessen „Klienten“, unter denen sich auffällig viele in die zelluläre Wachstumsregulation und Onkogenese involvierte Signaltransduktionsmoleküle befinden, gehört auch die Kinase Akt. Die Bindung an Hsp90 schützt sie vor inaktivierender Dephosphorylierung, d.h. Akt wird von Hsp90 positiv reguliert (Sato *et al.* 2000). Diese Interaktion hat wahrscheinlich

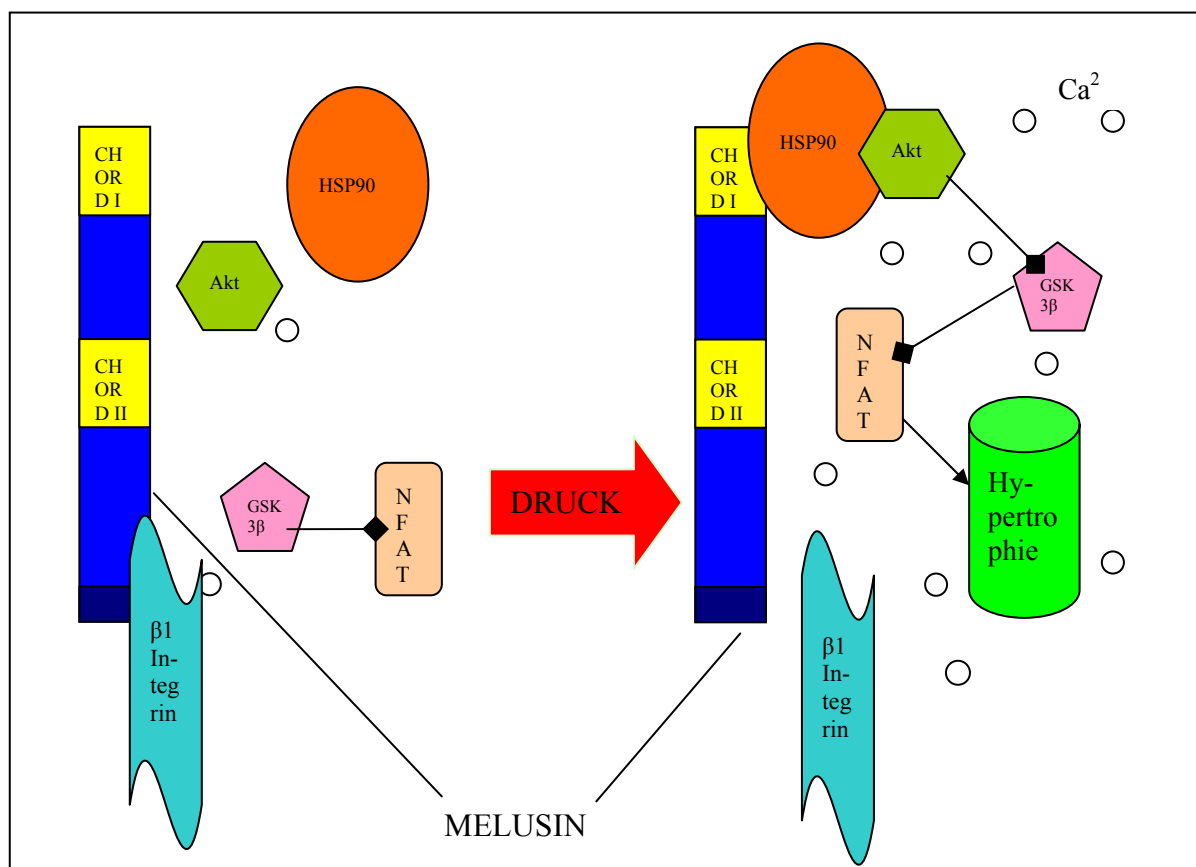
nicht unwesentliche funktionelle Auswirkungen. So sind Mäusekardiomyozyten, die aufgrund einer Überexpression von HSF1 u.a. einen vermehrten Gehalt an Hsp90 aufweisen, resistenter gegen Ischämie/Reperfusionstraumata als nicht veränderte Tiere. Hauptursache ist, laut Zou *et al.* (2003), eine erhöhte Aktivität der Akt.

Hsp90 ist als ATP-Sensor außerdem in der Lage, die Wachstumsfaktorantwort nach aktueller metabolischer Situation zu regulieren (Peng *et al.* 2005). Es bindet wie die sHsps an Zytoskelettelemente, bekannt ist eine die Dynamik des Zytoskeletts modulierende  $\text{Ca}^{2+}$ - und ATP-abhängige Interaktion mit Aktinfilamenten. Besonders in gestressten Zellen ist dies wahrscheinlich vorteilhaft (Gray *et al.* 1999). Inhibitoren des Hsp90-Proteinkomplexes führen zu rascher Ubiquitinierung mit nachfolgendem Abbau der gebundenen Klienten (Zhang *et Burrows* 2004).

#### **4.9.1 Melusin als möglicher Interaktionspartner von Hsp90**

In Anbetracht der oben genannten Erkenntnisse zur Funktionalität der CHORD-Domäne und des Hsp90 kann man folgende Hypothese eines möglichen Signaltransduktionsweges des Melusins aufstellen:

Bei hohem Hsp90-Level aufgrund von zellulären Stressoren wie Hitzeschock (Sato *et al.* 2000) oder auch mechanischem Stress interagiert die CHORD-Domäne des Melusin mit Hsp90. Die Kinase Akt wird dadurch aktiviert und Hypertrophie resultiert. Zur Illustration umseitig stehende schematische Abbildung:



**Abb.4.3:** Schematische Darstellung eines hypothetischen Signalweges nach mechanischer Belastung. Melusin diffundiert aufgrund erhöhten Calciumspiegels vom Integrin ab und interagiert mit Hsp90, welches über Akt-Aktivierung zur Induktion von Hypertrophie beiträgt

Da die Melusin-Knockout-Mäuse vor TAC weder funktionell noch strukturell beeinträchtigt waren, ist diese hypothetische Interaktion von Hsp90 und Melusin wahrscheinlich erst bei erhöhtem Hsp90-Level aufgrund von Stress bedeutsam. Auch denkbar wäre eine im Rahmen dauerhaft erhöhter Calciumkonzentration stattfindende Interaktion (s. 4.7).

Die unter 4.4 beschriebene Mutation könnte die Affinität des Melusin zu Hsp90 verstärken. Es würde eine chronische leichte Erhöhung der Akt-Aktivität resultieren, die in der Summation über Jahre zur Entwicklung einer HCM einen entscheidenden Beitrag leisten könnte.



#### 4.10 Hypertonus und Melusin

Die Null-Mutation des Melusin bei Mäusen wurde erst unter veränderten hämodynamischen Bedingungen (nach TAC) relevant. Es ergibt sich die Frage, ob sich beim Menschen eine Variante des Melusin unter verstärkter Druckbelastung des Herzens ebenso auswirkt. Der verstärkten Druckbelastung nach TAC im Tierversuch entspricht beim Menschen die verstärkte Druckbelastung wie sie bei arteriellem Hypertonus auftritt. Ein Drittel bis die Hälfte aller Hypertonuspatienten haben eine linksventrikuläre Hypertrophie (Kahan *et* Bergfeldt 2005). Auch bei einem Teil dieser Patienten könnte eine Variante im Melusingen als „genetic background“ vorliegen, die sie zur Entwicklung von Hypertrophie prädispositioniert oder auch davor schützt. Melusin müsste man dafür im Sinne eines „modifier gene“ betrachten, das bei der Entwicklung sekundärer Kardiomyopathien den zur Pathologieentwicklung notwendigen zweiten Faktor darstellt. Eine erhöhte „Empfindlichkeit“ des Melusins könnte Induktor von Hypertrophie sein, eine verminderte „Empfindlichkeit“ umgekehrt verantwortlich für eine Dilatation des Herzens. Nach einer solchen konditionalen Mutation wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht gesucht; weiterführende Erkenntnisse wären aus Studien mit Hypertonikern zu erwarten. Analog zum Tiermodell könnte eine solche Mutation unter permissiven Bedingungen, das heißt bei Normotension, ohne Auswirkungen bleiben. Erst bei zusätzlichem Auftreten von arteriellem Hypertonus wäre eine Wendung hin zum Pathologischen zu erwarten.

#### 4.11 Zusammenfassung

Mit vorliegender Arbeit wurde das Zytoskelett-assoziierte Protein Melusin als Kandidatengen primärer Kardiomyopathien untersucht. Melusin ist wesentlich involviert in die Hypertrophieentwicklung nach mechanischer Belastung. Bei Kardiomyopathien sind hypertrophe Reaktionen von größter pathogenetischer Wichtigkeit. Daher etablierten wir zunächst eine auf PCR, SSCP-Analyse und Sequenzierung beruhende Screening-Methode des Melusin-Gens und untersuchten daraufhin 192 an einer primären HCM bzw. DCM erkrankte, nicht verwandte Probanden auf Vorliegen einer Mutation im Melusin. Unter den 106 HCM-Patienten fanden wir eine Mutation, die aufgrund eines Aminosäureaustauschs funktionelle Relevanz besitzen könnte. In der Familie

der betroffenen Patientin wurden weitere Merkmalsträger identifiziert. Eine eindeutige Zuordnung zur klinischen Ausprägung einer HCM konnte nicht beobachtet werden, was allerdings an der Altersabhängigkeit des Auftretens von initialen Krankheitssymptomen oder einer inkompletten Penetranz liegen könnte. In einem Intron wurde eine weitere Mutation bei einem HCM-Patienten entdeckt. In der Gruppe der untersuchten DCM-Patienten fand sich keine Variante. Auch das Fehlen weiterer genetischer Alterationen im Melusin-Gen ist wichtiges Ergebnis vorliegender Untersuchung. So kann man aufgrund der genetisch hohen Konservierung von einer besonderen Bedeutung des Melusin in Kardiomyozyten ausgehen. Die Rolle des Melusin bei der Genese von Hypertrophie im Rahmen der primären Kardiomyopathien kann mittels vorliegender Ergebnisse nicht abschließend beurteilt werden. Ein Eingebundensein des Melusin in die Hypertrophie-Pathogenese in humanem Myokard erscheint jedoch wahrscheinlich; um Licht in die genaue Bedeutung des Melusin zu bringen, sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig. Interessante Studienziele sind u.a. eine mögliche Interaktion des Melusin mit Hsp90, dem Calcineurin-Signalweg und dem Komplex um T-cap/MLP. Zur Regulierung des Melusin werden Informationen über das Bindungsverhalten ans Integrin *in vivo* benötigt. Diesbezügliche Erkenntnisse könnten nicht nur zum näheren Verständnis der Signalwege sondern auch bezüglich einer therapeutischen Beeinflussung kardialer Hypertrophie, die nicht nur bei Kardiomyopathien klinisch von höchster Relevanz ist, hilfreich sein.