



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Das Zytoskelett des menschlichen Ventrikelmyokards und dessen Veränderungen aufgrund von Herzversagen“

Verfasserin

Stankiewicz Luiza

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 439

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Zoologie

Betreut von:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Manfred G. Walzl

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Diplomarbeitsbetreuer Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Manfred G. Walzl, Dr. Elisabeth Ehler vom King's College London (UK) und Ao. Univ. Prof. Dr. Johann Wojta von der Medizinischen Universität Wien, herzlich für die Ermöglichung dieser Diplomarbeit bedanken. Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Manfred G. Walzl möchte ich insbesondere auch dafür Danken, dass er mich - vor allem nach der Geburt meines Sohnes - nicht aus den Augen verloren hat. Ebenso besonderen Dank für seine großartige Unterstützung und Geduld. Dr. Elisabeth Ehler möchte ich dafür Danken, dass Sie mich mit allen Antikörpern und diversen andere Reagenzien versorgt hat und den Zugang zum Laborequipment, sowie die Chance für die Nutzung des Labors in der Abteilung The Randall Division of Cell and Molecular Biophysics (Kings College, London) ermöglicht hat. Ebenso möchte ich mich für ihre Geduld bei der Beantwortung all meiner Fragen und großartigen Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Diplomarbeit ganz herzlich bedanken. Ao. Univ. Prof. Dr. Johann Wojta, sowie seiner Arbeitsgruppe, möchte ich dafür danken, dass sie mir nichttransplantierbare humanen Myokardproben zur Verfügung gestellt und den Zugang zum Laborequipment ermöglicht haben. An dieser Stelle auch vielen Dank an Dr. Stefan Pfaffenberger für die Zurverfügungstellung der größtenteils in Paraffin eingebetteteten humanen Myokardproben.

Meinem liebevollen und verständnisvollem Lebensgefährten Clemens Hanserl, möchte ich für seine Liebe, seine Unterstützung und seinen immerwährenden Glauben an mich danken. Ein riesiges Dankeschön gebührt meinen einfach großartigen Eltern und meiner mittlerweile sehr große Familie, welche mich während dem Studium kontinuierlich bestmöglich unterstützt und entlastet haben. Vielen Dank auch an Kathrin Holzer für die großartige Hilfestellung und die guten Ratschläge, vor allem in Notsituationen. An dieser Stelle auch ein riesiges Dankeschön an meine Freunde - insbesondere Barbara Ruplitsch und Katharina Diwold - für ihre tolle Motivation, das Zuhören, Reden, Ablenken und Lachen. Ebenso ein herzliches Dankeschön an meinen Arbeitgeber, Kollegen und vor allem sehr guten Freund Thomas Köberl für all sein Verständnis und seine Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Kardiomyopathien.....	1
1.2. Proteine des Zytoskeletts einer Herzmuskelzelle	4
1.2.1. Die kontraktile Filamente	5
1.2.2. Das sarkomere Zytoskelett	5
1.2.3. Das nicht-sarkomere Zytoskelett.....	10
1.2.4. Membran assoziierte Proteinkomplexe	11
1.2.5. Proteine der Interkalierenden Scheiben (ID).....	12
1.3. Zielsetzung dieser Diplomarbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Humane Herzgewebeprobe	15
2.2. Mausherzprobe.....	15
2.3. Herstellung von Immunfluoreszenzpräparaten und Konfokale Mikroskopie	17
2.3.1 Herstellung und Immunfärbung von Kryoschnitten für die Konfokale Mikroskopie	17
2.3.2. Herstellung und Immunfärbung von Paraffinschnitten für die Konfokale Mikroskopie	18
2.3.3. Fluoreszierende Reagenzien und Antikörper für die Immunfluoreszenz.....	19
2.3.4. Konfokale Mikroskopie und Bildbearbeitung	21
2.4. Immunoblots	21
2.4.1. Herstellung von SDS-Proben aus Gewebestücken für die SDS-PAGE	21
2.4.2. SDS-PAGE	21
2.4.3. Western-Blot.....	23
2.4.4. Semidry Blot.....	25
2.4.5. Immunoblots Analyse und Statistik.....	25
3. Ergebnisse.....	27
3.1. Charakterisierung der morphologischen Veränderungen der linksventrikulären Kardiomyozyten bei der MLP Knockout Maus, einem transgenen Tiermodell für die Dilatative Kardiomyopathie	27
3.1.1. Negativkontrollen der Gewebeschnitte von MLP Knockoutmaus und WT Maus für die Immunfluoreszenz	29
3.2. Charakterisierung der morphologischen Veränderungen im ventrikulären Myozytengewebe infolge einer Herzerkrankung.....	29
3.2.1. Charakterisierung von morphologischen Eigenschaften des ventrikulären humanen Spendergewebes bezüglich Myozytenform und Anordnung.....	29
3.2.2. Negativkontrollen der Gewebeschnitte für die Immunfluoreszenz.....	34
3.2.3. Veränderungen in der Morphologie von ventrikulären Kardiomyozyten in extraplatantierten Herzen von Patienten mit Herzversagen im Endstadium	37

3.3. Proteine des Sarkomers in versagenden menschlichen Herzen.....	40
3.4. Veränderungen an den Interkalierenden Scheiben (ID).....	45
3.4.1. Linksventrikuläre Veränderungen in der Organisation von Adherens Junctions (AJ) und der Expression von β -Catenin bei Herzerkrankungen	45
3.4.2. Linksventrikuläre Veränderungen in der Organisation von Gap Junctions (GJ) und der Expression von Connexin43 bei Herzerkrankungen	52
3.4.3. Charakterisierung der Links- und rechtsventrikulären Organisation der Adherens und der Gap Junctions des gleichen Patienten anhand konfokaler Mikroskopie.....	56
3.4.4. Nebulin-verwandtes Protein (N-RAP).....	62
3.4.5. Cardiac Muscle LIM Protein (MLP)	69
3.5. Das Intermediärfilament Protein Desmin und das A-Banden Protein MyBP-C.....	73
3.6. Expression der humanen EH (embryonalen Herz)-Myomesin Isoform bei Kardiomyopathien	86
4. Diskussion	88
4.1. Generelle morphologische Befunde der immunfluoreszenten Proben	88
4.2. Morphologische Veränderungen in Anordnung und Form der Kardiomyozyten bei Herzerkrankungen.....	89
4.3. Proteine des Sarkomers in versagenden menschlichen Herzen.....	91
4.4. Veränderungen in den Kardialen MLP Proteinleveln bei Menschen mit Herzversagen im Endstadium.....	92
4.5. Veränderungen an den Interkalierenden Scheiben bei Herzerkrankungen	94
4.5.1. Veränderungen an den Interkalierenden Scheiben bei Kongenitalen Herzfehlbildungen bei Kindern	95
4.5.2. Veränderungen an den Interkalierenden Scheiben bei dilatativer Kardiomyopathie.	100
4.6. Das Intermediärfilament Desmin	104
4.7. Expression der humanen EH-Myomesin Isoform bei Kardiomyopathien.....	104
5. Schlussfolgerung.....	104
Literaturverzeichnis.....	106
Anhang	115
Zusammenfassung	115
Abstract.....	117
Lebenslauf.....	119

Abkürzungsverzeichnis

a	Jahre
ACE	A. carotis externa
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat (ein Polymerisationsinitiator)
aDCM	akute dilatative Kardiomyopathie
AFIB	<i>med.</i> , Vorhofflimmern; <i>engl.</i> Atrial Fibrillation
AI	<i>med.</i> , Aortenklappeninsuffizienz
AICD	<i>med.</i> , Automatic implantable cardioverter defibrillator
AJ	Adherens Junctions
AKE	<i>med.</i> , Aortenklappenersatz
ARVD	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie, <i>engl.</i> Arrhythmogenic right ventricular dysplasia; auch bezeichnet als ARVC/D
ARVC/D	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie/ Dysplasie, <i>engl.</i> Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/ dysplasia
AS	<i>med.</i> , Aortenstenose
AV-Block	<i>med.</i> , teilweise oder dauerhafte Unterbrechung der Erregungsleitung am Atrioventrikularknoten
BSA	Bovine serum albumin
CABG	<i>med.</i> , Koronare Bypass OP, <i>engl.</i> coronary artery bypass graft
COPD	<i>med.</i> , Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CNI	<i>med.</i> , chronische Niereninsuffizienz
CPR	<i>med.</i> , Cardiopulmonale Reanimation
CRP	Cystein-reiche Proteine
CRP3/CSRP3	cystein-reiches Protein 3, auch bezeichnet als MLP
CRT	<i>med.</i> , Cardiac resynchronization therapy (bei schwerer Herzinsuffizienz)
DAPI	4,5 Diamino-2-phenylindoldihydrochlorid
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DM	Diabetes mellitus
DGC	Dystrophin Glycoprotein Komplex
ECM	Extrazelluläre Matrix
ECMO	<i>med.</i> , Extrakorporale Membranoxygenierung; <i>engl.</i> extracorporeal membrane oxygenation
EH-Myomesin	<i>engl.</i> embryonic heart-Myomesin
F-Aktin	filamentöses Aktin
FDCM	familiäre dilatative Kardiomyopathie

FHCM	familiäre hypertrophe Kardiomyopathie
Fontan-OP	<i>med.</i> , chirurgische Korrektur bei komplexen angeborenen Herzfehlern mit einem Single Ventrikel
G	<i>engl.</i> , Goat
G-Aktin	globuläres Aktin
GB	Gold buffer
GJ	Gap Junctions
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HF	Heart Failure, Herzversagen
HTN	<i>med.</i> , Hypertonie
HLP	<i>med.</i> , Hyperlipidämie
HRHS	<i>med.</i> , Hypoplastisches Rechtsherz Syndrom
HRP	<i>engl.</i> Horseradish, eine Meerrettichperoxidase (als Marker Enzym beim Immunoblotten)
ICD	<i>med.</i> , Implantierbarer cardioverter Defibrillator
iCMP	ischämische Kardiomyopathie
ID	<i>engl.</i> , Intercalated Disk, Interkalierende Scheibe (Glanzstreifen)
iDCM	idiopathische dilatative Kardiomyopathie
IF	Immunfluoreszenz
k.A.	keine Angaben
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	Knockout
LFG	Lipofuszingranula
LS	Low Salt
LV	linker Ventrikel
LVF	<i>med.</i> , Linksventrikuläre Funktion
LVEF	<i>med.</i> , Linksventrikuläre Auswurffraktion
LVNC	Linksventrikuläre Non-Compaction-Kardiomyopathie
m.	männlich
MI	<i>med.</i> , Mitralklappeninsuffizienz
mM a	<i>engl.</i> monoklonal Mouse Antibody anti, monoklonaler Maus Antikörper gegen
MK	Myokarditis
MKE	<i>med.</i> , Mitralklappenersatz
MLC	Myosin-light chain
MHC	Myosin-heavy-chain
MLP	Muscle limb protein
MLP -/-	MLP Knockoutmaus
MyBP-C	Myosin binding protein C

NGS	Normal goat serum
NIDDM	Nicht Insulinabhängige Diabetes mellitus, <i>engl.</i> non insulin dependent diabetes mellitus
N-RAP	Nebulin-related-anchoring protein
NSTEMI	<i>med.</i> , Nicht-ST-Strecken-Elevations-Myokardinfarkt
NYHA	New York Heart Association Klassifikation von Herzversagen in 4 Klassen
PA	Pulmonalatresie
PBS	Phosphate buffered saline
PDCM	perinatal manifestierte dilatative Kardiomyopathie; auch bezeichnet als PPCM
PE	<i>med.</i> , Pulmonalembolie
PPCM	Peripartum- oder auch Postpartum Kardiomyopathie
RCM	Restriktive Kardiomyopathie
pR a	<i>engl.</i> polyklonal Rabbit Antibody anti, polyklonaler Kaninchen Antikörper gegen
RT	Raumtemperatur
RV	rechter Ventrikel
RVOT	<i>med.</i> , rechts- und linksventrikuläre Ausflusstrakt-VT
SDS-Page	<i>engl.</i> sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>st. p.</i>	<i>med.</i> , <i>status post</i> (Zustand nach)
TA	Triskupidalatresie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (ein Polymerisationskatalysator)
TGA	<i>med.</i> , Transposition der großen Arterien
TI	<i>med.</i> , Triskuspidalklappeninsuffizienz
TOT Maus	Tropomodulin overexpressing Maus
VA	Ventrikulo-Atriale Verbindung
VT	<i>med.</i> , ventrikuläre Tachykardie
VWI	<i>med.</i> , Vorderwandinfarkt
w.	weiblich
WT	Wildtyp

Zusammenfassung

Die Herzfunktion wird durch präzise regulierte Interaktionen zwischen Proteinen des Muskelzytoskeletts und den essentiellen kontraktile Proteinen gewährleistet. Kardiomyopathien führen zu fortschreitendem Herzversagen und stellen die häufigste Erkrankung dar, die eine Herztransplantation notwendig macht. Mittlerweile ist bekannt, dass durch Mutationen verursachte Störungen dieser präzise regulierten Protein-Protein Interaktionen des Muskelzytoskeletts zu einer veränderten Proteinzusammensetzung führen, was in Folge zur Entwicklung von Kardiomyopathien beiträgt.

Ziel dieser Diplomarbeit war es die subzelluläre Organisation verschiedener Proteine der Kardiomyozyten, die durch Studien an Tiermodellen als mögliche frühe Marker für Kardiomyopathien vorgeschlagen worden waren, in versagenden menschlichen Herzen im Vergleich zu Kontrollproben zu charakterisieren. Dazu wurden spezifische Antikörper gegen diese Proteine zur Immunfluoreszenzfärbung von Kryo- und Paraffinschnitten mit darauffolgender Analyse durch konfokale Mikroskopie verwendet. Gleichzeitig wurde auch die Morphologie der Proben auf subzellulärer Ebene untersucht. Die Ergebnisse der konfokalen Mikroskopie bestimmten die weitere Richtung der Analyse mit Immunoblots.

Die Resultate deuten darauf hin, dass die Veränderungen in der Komposition und Struktur der Interkalierten Scheiben, die bei der MLP (muscle LIM protein) Knockoutmaus (einem Mausmodell für die dilatative Kardiomyopathie, DCM) zu sehen waren, nur in einigen vererbaren DCM Proben nachgewiesen werden können. Sowohl lichtmikroskopisch als auch an den Immunoblots war dabei eine Hochregulierung des N-RAP (nebulin-related anchoring protein) und des Adherens Junctions Proteins β -Catenin sowie eine Herunterregulierung des Gap Junction Proteins Connexin-43 zu erkennen. In den meisten anderen Proben mit DCM im Endstadium zeigte sich jedoch ein heterogenes Bild. Für die vergleichende Analyse sind dabei natürlich die heterogene genetische Herkunft, das weit variierende Alter, sowie eine unterschiedliche Medikation erschwerend. Trotzdem war auffallend, dass die Kontrollen bei der Analyse der Expression von Proteinen der Interkalierten Scheiben eine relativ geringe Variabilität untereinander aufwiesen.

Die erneute Expression des humanen EH-(embryonales Herz)-Myomesin, welches als Marker für eine DCM vorgeschlagen wurde, konnte in den meisten versagenden humanen Herzproben nachgewiesen werden. Nachdem das Protein am stärksten bei einer Arrhythmogenen Rechtsventrikulären Dysplasie hochreguliert war erscheint es allerdings als spezifischer Marker für DCM ungeeignet.

In dieser Arbeit wurde auch erstmals die subzelluläre Verteilung des N-RAP, eines aktinbindenden Proteins der Interkalierten Scheibe, im humanen Ventrikelmyokard beschrieben. Das N-RAP war, entgegen der bisher an Mäusen beschriebenen Lokalisierung, im humanen Ventrikelmyokard nicht nur an den Interkalierten Scheiben sondern auch unterschiedlich stark an den Z-Scheiben der Myozyten, bevorzugt in der Peripherie aber auch in der Nähe des Zellkerns zu finden.

Nachdem die präzise Funktion von MLP und auch dessen Rolle in Herzerkrankungen bei Tiermodellen und Mensch ungeklärt ist, wurden Immunoblot Analysen der Proteinnengen von MLP in Proben von Patienten mit Herzversagen im Endstadium durchgeführt. Die Expressionslevel von MLP im LV der Patienten mit Herzversagen im Endstadium mit einer durchschnittlichen linksventrikulären Auswurffraktion (LVEf) von 15% waren gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Daraus lässt sich ableiten, dass eine Hochregulierung nicht ausschließlich auf eine Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) zutrifft, sondern dass ein Anstieg der Expression mit verminderter LVEf korreliert ist.

Auch wenn in dieser Arbeit kein universal gültiger Marker für eine DCM gefunden werden konnte, kann die Immunfluoreszenzfärbung mit hochspezifischen Antikörpern Einblicke in die auf subzellulärer Ebene stattfindenden Veränderungen gewährleisten. Jene gehen weit über die Information der histologischen Standardfärbungen hinaus und können für den beobachteten Phänotyp durchaus erklärend sein.

1. Einleitung

Das Zytoskelett einer Kardiomyozyte stellt ein äußerst komplexes System dar, mit einer mittlerweile kontinuierlich wachsenden Anzahl von entdeckten Proteinen und präzise regulierten Protein-Protein Interaktionen (Lange et al., 2006; Gautel, 2011).

Neue genetische und molekularbiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass durch Mutationen hervorgerufene Störungen der eng regulierten funktionellen Interaktionen der einzelnen Komponenten von Myofibrillen, als auch eine veränderte Proteinzusammensetzung zu Störungen und Versagen des kontraktilen Apparates führen können, was zur Entwicklung von Kardiomyopathien und/oder Muskeldystrophien führt (Frank & Kuhn 2006).

1.1. Kardiomyopathien

Kardiomyopathien sind, nach der letzten World Health Organisation Definition, Erkrankungen des Myokards, die mit kardialer Dysfunktion assoziiert sind. Sie werden klassifiziert als dilatative Kardiomyopathie (DCM), hypertrophe Kardiomyopathie (HCM), restriktive Kardiomyopathie (RCM), und arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (auch bezeichnet als arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie, ARVC/D). Als gesondert werden die spezifischen Kardiomyopathien geführt. Dabei handelt es sich um Erkrankungen des Herzmuskels, die mit spezifischen kardialen oder systemischen Störungen assoziiert sind und ebenfalls zu einer Hypertrophie oder Dilatation des Myokards führen können. Diese ventrikuläre Dysfunktion kann z.B. aufgrund einer Erkrankung der Herzkranzgefäße (KHK), durch Verlust an Myokardgewebe, oder einer Herzklappenerkrankung, durch abnormale Volumen- bzw. Druckverhältnisse, entstehen. Weiters kommen als Ursachen verschiedene metabolische Erkrankungen (wie z.B. Diabetes mellitus), entzündliche Erkrankungen des Herzmuskels und Muskeldystrophien in Frage (WHO Report, Richardson et al., 1996).

Die Klassifizierung von Kardiomyopathien hat sich als besonders schwierig erwiesen da es sich dabei um äußerst komplexe heterogene Erkrankungen handelt, deren Ursachen bisher nicht vollständig erforscht sind.

Maron et al., 2006 haben eine Klassifizierung von Kardiomyopathien entwickelt, die auf neueren genetischen und molekularen Erkenntnissen basiert. Als primäre Kardiomyopathien werden u.a. fünf verschiedene Erkrankungen aufgeführt: HCM, DCM, ARVC/D, RCM und Linksventrikuläre Non-Compaction-Kardiomyopathie (LVNC), die in Folge in genetische/vererbliche, nichtgenetische/nichtvererbliche und gemischte Formen unterteilt werden. Weiters fallen unter die primäre Form, erworbene Kardiomyopathien wie Myokarditis und Peripartum-Kardiomyopathie (PPCM). Die sekundären Kardiomyopathien beinhalten großteils jene systemischen Erkrankungen, die früher unter dem Begriff „spezielle Kardiomyopathie“ geführt wurden.

Bei der Dilatativen Kardiomyopathie (DCM) handelt es sich um eine sehr häufige und sowohl genetisch als auch morphologisch und pathologisch heterogene Erkrankung, die primär durch eine

kompensatorische Dilatation (d.h. Anstieg des Kammervolumens) des linken Ventrikels (LV) und systolische Dysfunktion charakterisiert ist. Oft ist sekundär der RV ebenfalls betroffen und eine diastolische Dysfunktion ausgebildet (Towbin & Jefferies, 2011).

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an Genmutationen mit einer DCM in Verbindung gebracht. Bei einer DCM kommen überwiegend Mutationen in Genen vor, die Proteine des Zytoskeletts (wie Dystrophin, Desmin, Metavinculin, δ -, β -Sarcoglycan etc.) kodieren und demnach eine Störung in der Kraftübertragung verursachen. Mutationen in Genen die Proteine des Sarkomers (wie β -MHC, MyBP-C, Titin, Aktin, sowie Z-Scheiben Proteine wie MLP und α -Aktinin etc.) kodieren, die eine Störung in der Kraftgenerierung verursachen, wurden jedoch auch beschrieben (siehe Übersichtsartikel von Towbin & Jefferies, 2011).

Histologisch sind bei einer DCM eine Vergrößerung des Nukleus, sowie oftmals eine Zunahme in der Länge der Myozyten, ein starker Verlust an Myofibrillen innerhalb der Myozyten (was zu auffälliger Vakuolisierung der Myozyten führt), ein deutlicher Anstieg von T-Lymphozyten und Makrophagen im Gewebe, ein Absterben der Myozyten durch Apoptose als auch Nekrosen und folglich starke interstitielle Fibrosen zu erkennen. Hypertrophierte Myozyten können ebenfalls vorkommen. Alle diese histologischen Veränderungen variieren allerdings stark von Fall zu Fall, und es handelt sich um keine spezifischen morphologischen Kennzeichen (Hughes, 2006; Seidman & Seidman, 2001; Davies, 2000).

Unter einer Myokardialen Fibrose ist ein anhaltender Prozess von zunehmender Kollagenkonzentration zu verstehen und jene ist nicht einfach als eine Antwort auf verschiedene myokardiale Verletzungen anzusehen. Grundsätzlich ist zwischen reaktiver und reparativer Fibrose zu unterscheiden, welche jedoch während des ventrikulären „*Remodelling*“ koexistieren. Die reparative Fibrose findet aufgrund von Verlusten an Herzzellen durch Apoptose oder Nekrose statt und ist hauptsächlich interstitiell, wohingegen die reaktive Fibrose in Abwesenheit eines Zellverlustes durch Entzündung oder bei Veränderungen in der myokardialen Füllung beobachtet wird (Anand & Florea, 2011).

Eine familiäre dilatative Kardiomyopathie (FDCM), liegt dann vor, wenn mindestens zwei nah verwandte Familienmitglieder ebenfalls an einer idiopathischen DCM erkrankt sind, d.h. eine alkoholische, primär valvuläre, entzündliche oder toxisch-verursachte DCM oder ein kongenitaler Herzdefekt ausgeschlossen werden kann und die DCM über Generationen vererbt wird (Hershberger, 2005). Bei 30-40% der an DCM erkrankten Patienten ist ein familiärer Hintergrund vorhanden (Towbin & Bowles, 2002). Eine ausgeprägte phänotypische und genetische Heterogenität, welche ebenso für die anderen Kardiomyopathien kennzeichnend ist, charakterisiert die FDCM (siehe Übersichtsartikel von Burkett et al. 2005).

Eine DCM kann auch infolge einer viralen Myokarditis (MK), d.h. eine Entzündung des Myokards verursacht durch eine Virusinfektion, entstehen. Eine Myokarditis ist ein pathologischer Prozess welcher eine Entzündung des Myokards verursacht und in Folge zu zellulärer Nekrose und

myokardialer Dysfunktion führt. Eine zelluläre Nekrose führt zur Abnahme der ventrikulären Kontraktilität und somit zu gestörter diastolischer Füllung und vermindertem Kardialen Output (Vincent & Dooley, 2007). Es existieren Beweise, welche darauf hindeuten, dass eine virale Myokarditis und eine genetisch bedingte DCM, basierend auf den betroffenen Proteinen, dieselben Erkrankungsmechanismen haben (Towbin & Jefferies, 2011).

Ebenso kann eine DCM in Folge einer Skelettmuskelerkrankung entstehen. Fast alle Gene, die bisher als Ursache für eine vererbte DCM identifiziert wurden, sind auch dafür bekannt eine Skelettmypathie in Menschen und/oder Mausmodellen zu verursachen (Towbin & Jefferies, 2011).

Die Peripartum- (auch bezeichnet als perinatal manifestierte dilatative Kardiomyopathie, PDCM), **oder Postpartum-Kardiomyopathie (PPCM)** ist eine seltene Erkrankung, die sich im dritten Trimester der Schwangerschaft oder innerhalb der ersten 5 Monate postpartum bei der Mutter manifestiert. Im LV kommt es zu einer Dilatation, assoziiert mit LV systolischer Dysfunktion und in Folge zum Herzversagen unbekannter Ursache. Die klinische Manifestierung unterscheidet sich von den bisher beschriebenen Kardiomyopathien. PPCM tritt am häufigsten bei fettleibigen Frauen, die einen Bluthochdruck in der Schwangerschaft entwickeln (Präeklampsie) und ein Alter von über 30 Jahren aufweisen, auf (Maron et al., 2006).

Die Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist eine komplexe Erkrankung mit spezifischen pathophysiologischen Kennzeichen, jedoch oft unterschiedlichen morphologischen und klinischen Merkmalen, die am häufigsten bei jungen Menschen vorkommt. Die Erkrankung zeichnet sich primär durch eine assymetrische oder symmetrische Hypertrophie, d.h. Größenzunahme der Kardiomyozyten durch Zufügung von Sarkomeren, daraus resultierender Zunahme der ventrikulären Wanddicke und Abnahme der Kammergröße, überwiegend des LV aus. Eine systolische Hyperkontraktion mit diastolischer Dysfunktion ist ausgebildet und eine Obstruktion des Blutflusses aus dem LV in die Aorta kann auftreten. Eine HCM kann auch beim chronischen Herzversagen in eine DCM übergehen (Towbin & Bowles, 2002).

Bei einer familiären hypertrophen Kardiomyopathie (FHCM) kommt es hauptsächlich (schätzungsweise bei 70% der Fälle) zu Mutationen in Genen die für Proteine des Sarkomers kodieren (wie β -MHC, beide ventrikuläre MLC, kardiales Troponin T, α -Tropomyosin, kardiales Aktin, MyBP-C, Titin etc.), d.h. zu einer Störung in der Kraftgenerierung (siehe Übersichtsartikel: Towbin & Bowles, 2002; Towbin & Jefferies, 2011).

Histologische Kennzeichen einer HCM sind hypertrophierte Myozyten, ein *Myocyte Disarray* und erhöhte interstitielle Fibrose. Der Begriff *Myocyte Disarray* beschreibt eine bizarre, unregelmäßige, oftmals spitz zulaufende Form der Myozyten und architektonisch unorganisierte Gewebestellen, bei denen die Myozyten eine abnormale Zell-Zellverteilung aufweisen, d.h. nicht parallel zueinander sondern schief oder senkrecht um Zentren von interstitiellem Kollagen angeordnet sind. Oftmals sind auch innerhalb der Zellen die Myofibrillen desorganisiert (Varnava et al., 2000; Seidman & Seidman, 2001; Hughes, 2006).

Linksventrikuläre Non-Compaction-Kardiomyopathie (LVNC) wurde vor kurzen charakterisiert durch eine unverwechselbare, deutlich ausgeprägte morphologische Erscheinung des linken Ventrikelmyokards. Jenes ist regelrecht schwammig („*Spongy Heart*“). Das Myokard weist an der Innenwand des LV Trabekulae auf und tiefe intertrabekuläre Vertiefungen. Am meisten betroffen ist der distale (apikale) Teil des LV. Es handelt sich um eine seltene, schwer diagnostizierbare Erkrankung, die relativ häufig bei Kindern auftritt und auch bei Erwachsenen beschrieben wurde. Bei ungefähr 20% bis 30% der Fälle wurde eine familiäre Vererbung identifiziert (siehe Übersichtsartikel von: Maron et al., 2006; Towbin & Jefferies, 2011).

Eine LVNC kann assoziiert mit Dilatation, Hypertrophie oder Hypertrophie sowie Dilatation auftreten (Towbin & Bowles, 2002).

Eine Arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie (ARVD) ist eine komplexe arrhythmogene Störung assoziiert mit einer Kardiomyopathie und ist charakterisiert durch progressiven Verlust von Myozyten und deren Ersatz durch Fettgewebe und durch Fibrose. Davon betroffen ist vorwiegend der RV, dessen Gewebeveränderung in Folge zu einer Dilatation und systolischer Dysfunktion führen kann. Der Phänotyp kann sich jedoch auch auf den LV ausbreiten (Towbin & Jefferies, 2011).

Bei ungefähr 40% der Patienten mit ARVD wird die Erkrankung mit einer kausalen Mutation bei Genen welche für desmosomale Proteine (Desmoplakin, Plakophilin-2, Desmoglein-2, Desmocollin-2, Plakoglobin) oder deren Interaktionspartner kodieren, in Verbindung gebracht (Sen-Chowdhry et al., 2007). Desmosomen sind ein Typ von Zell-Zellkontakten, die das Intermediärfilamentsystem des Zytoskeletts verankern.

Nachdem auch alle Tiermodelle für ARVD Veränderungen an den IDs aufweisen und es in vielen Fällen sogar zu einem gänzlichen Verlust von Desmosomen an den IDs kommt, ist gemeinsam mit den Ergebnissen aus der humanen Genetik daraus schlüssig, dass es sich bei ARVD um eine Erkrankung handelt die aus desmosomaler Dysfunktion resultiert (Towbin & Jefferies, 2011).

Asimaki et al., 2009 beschreiben, dass bei einer immunhistochemischen Analyse von Patienten mit ARVD alle ein deutlich reduziertes Signal für Plakoglobin aufwiesen während die Signalintensität von anderen desmosomalen Proteine variierte. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde eine reduzierte Expression von Plakoglobin als möglicher Marker für ARVD vorgeschlagen

1.2. Proteine des Zytoskeletts einer Herzmuskelzelle

Die Proteine des Zytoskeletts einer Herzmuskelzelle können nach ihren strukturellen und funktionellen Eigenschaften in fünf Gruppen unterteilt werden (Kostin et al. 1998):

Die kontraktilen Proteine des Sarkomers,
und Proteine des sarkomeren Zytoskelett, beide gemeinsam bilden das Sarkomer.

Die eigentlichen Zytoskelettproteine, die die Basis des Zytoskeletts bilden, welches aus Mikrotubuli, Aktinfilamenten und Intermediärfilamenten besteht.

Die Membran-assoziierten Proteine, welche in einer engen räumlichen Beziehung mit der zellulären Membran und, über die Integrine mit der extrazellulären Matrix (ECM) stehen.

Proteine der Interkalierenden Scheiben (Intercalated Disks), welche die benachbarten Myozyten in einer longitudinalen Richtung koppeln und dabei helfen den elektrischen Stimulus für Kontraktion weiter zu leiten.

Mittlerweile wurde eine enorme Vielzahl an Proteinen im Zytoskelett einer Herzmuskelzelle entdeckt und auch deren Rolle bei unterschiedlichen Herzerkrankungen beschrieben. Hier werden nur diejenigen diskutiert, die in dieser Diplomarbeit abgehandelt wurden.

1.2.1. Die kontraktilen Filamente

Das Sarkomer repräsentiert die kleinste basale kontraktile Einheit einer gestreiften Muskelfiber und stellt die Region zwischen zwei Z-Scheiben dar. Es wird durch ein höchst organisiertes Netz von spezialisierten Proteinen aufgebaut (Frank & Kuhn, 2006).

Es beinhaltet u.a. die beiden kontraktilen Proteine Aktin und Myosin. Das G-Aktin (globuläres Aktin) bildet das dünne kontraktile Filament, einen Komplex, der auch Troponin und Tropomyosin enthält. Die (plus) Enden des Aktinfilaments in der Z-Scheibe werden durch CapZ und die Enden, die sich innerhalb der A-Bande befinden, durch Tropomodulin abgegrenzt. Die antiparallelen Aktinfilamente befinden sich im isotropen I-Band und sind an den Z-Scheiben durch das sarcomere α -Aktinin verankert (Clark et al., 2002; Craig & Padrón, 2004).

Das Myosin bildet das dicke kontraktile Filament, welches am Zentrum des Sarkomers, der M-Bande, verankert ist und der anisotropen A-Bande entspricht (Clark et al., 2002; Craig & Padrón, 2004). Es ist in bipolaren Filamenten angeordnet, mit Myosinköpfchen an beiden Enden und einer Zone ohne Myosinköpfchen (bezeichnet als "*bare zone*") in der Mitte, wo sich die M-Bande befindet. Zusätzlich befindet sich in der A-Bande das Myosin Binding Protein-C (MyBP-C), das mit dem Großteil der Myosinköpfchen assoziiert ist und einen regulierenden Effekt auf die Muskelkontraktion hat (Ratti et al., 2011).

1.2.2. Das sarkomere Zytoskelett

Sarkomere werden trotz ihrer extrem regulären Erscheinung kontinuierlich erneuert und das mit einer ungefähren Halbwertszeit der Proteine von drei bis zehn Tagen (Martin, 1981). Eine enorme Vielzahl an strukturellen Proteinen wird benötigt um die regelmäßige Anordnung der Sarkomere während der Entwicklung und der gesamten Lebenszeit aufrecht zu erhalten (siehe Übersichtsartikel von: Frank & Kuhn, 2006; Lange et al., 2006; Gautel, 2011).

Die kontraktilen Aktin- und Myosinfilamente werden durch ein Subset von speziellen Zytoskelettproteinen organisiert, welche das sarkomere Zytoskelett bilden. Dieses inkludiert α -Aktinin, Myomesin, M-Protein, MyBP-C und die riesigen Proteine Titin, Obscurin und Nebulin,

welche sowohl gerüstbildende, mechanische als auch signalgebende Aufgaben kombinieren (Gautel, 2011).

Das Titin Molekül (auch bekannt als Connectin) ist ein riesiges, über 1µm langes, und für die gestreifte Muskulatur von Vertebraten spezifisches, flexibles Filament, welches hauptsächlich aus Fibronectin TypIII und dem Immunglobulin ähnlichen Domänen besteht. Es wird lediglich durch ein einziges Polypeptid gebildet und hat einem Molekulargewicht von ungefähr 3000 kDa, weshalb es das größte bekannte Polypeptid ist (Tskhovrebova & Trinick, 2003).

Das Titin-Molekül umspannt die Hälfte des Sarkomers, von der Z-Scheibe bis zur M-Bande. An der Z-Scheibe bindet es mit dem „Z-Repeat“ seines N-terminalen Endes an α -Aktinin, welches die anti-parallel en dünnen Aktinfilamente von benachbarten Sarkomeren quervernetzt und in unmittelbarer Nähe des Randes der Z-Scheibe bindet es auch an das dünne kontraktile Filament selbst. An der M-Bande überlappen die terminalen Enden von Titin mit dem gegenüberliegenden, aus der anderen Hälfte des Sarkomers kommenden, Titin-Molekül. Über das M-Protein und Myomesin interagiert es an der M-Bande und über das MyBP-C innerhalb der A-Bande mit dem dicken Myosinfilament. Titin bildet 25-30% der Masse des dicken kontraktiles Filamentes und trägt somit zum Durchmesser des Filamentes sowie seiner Flexibilität bei. Möglicherweise interagiert es mit seinen Fibronectin-Domänen sogar teilweise direkt mit dem dicken Filament (Tskhovrebova & Trinick, 2003).

Titin stellt wahrscheinlich ein „molekulares Lineal“, bzw. einen Bauplan, für den geordneten Einbau von tausenden Proteinuntereinheiten zu regelmäßig geordneten Sarkomeren dar. Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass die verschiedenen Teile des Titin-Moleküls, die mit den vier Regionen im Sarkomer (M-Bande, A-Bande, I-Band und Z-Scheibe) korrelieren, mechanische und katalytische Funktionen haben können, dass sie aber auch die Fähigkeit besitzen, an eine Vielzahl von anderen Sarkomerproteinen, welche zum Teil auch signalgebende Funktionen besitzen, zu binden. An seinem C-Terminus (das Ende wo sich die Carboxylgruppe befindet) besitzt Titin eine Kinase-Domäne, deren Aktivität mechanisch reguliert wird und eine Signalkaskade zum Nukleus auslösen kann (Lange et al., 2005). Es ist wahrscheinlich speziell an der Festlegung der Struktur und Größe der dicken Filamente - v.a. während der Myofibrillogenese- beteiligt (Tskhovrebova & Trinick, 2003; Lange et al., 2006; Gautel, 2011).

Experimente mit muskelbildenden Zellen die ein defektives Titin-Molekül exprimieren, haben gezeigt, dass diese Zellen nicht dazu fähig sind geordnete Sarkomere, insbesondere die dicken Myosinfilamente, zu bilden (Van der Ven et al., 2000).

Zusätzlich zu seiner Schlüsselrolle beim Zusammenbau von Sarkomeren trägt Titin im reifen Muskel zur strukturellen Stabilität bei, mittels eines Mechanismus der die Elastizität kontrolliert (Tskhovrebova & Trinick, 2003). Titin ist für die Beibehaltung der Elastizität des Muskels und der relativen Position von Myosin- und Aktinfilamenten verantwortlich (Tskhovrebova & Trinick, 2003). Aufgrund seiner Größe ist es wenig überraschend, dass Mutationen im Titin Gen auch zu vererbaren Erkrankungen führen können. Gerull et al. waren 2002 die Ersten, die eine Punktmutation in Titin mit

dem Phänotyp einer DCM im Menschen korrelieren konnten. Kürzlich wurde gezeigt, dass in 27% der Fälle von vererbbarer DCM eine trunkierende Mutation in Titin nachgewiesen werden kann (Herman et al., 2012). Da jedoch auch 3% der Kontrollen ohne irgendwelche Manifestationen von DCM eine Trunkierung von Titin aufwiesen, ist es momentan noch unklar, welche Bedeutung diese Prozentzahlen in Populationen wirklich haben (Herman et al., 2012). Außerdem können Punktmutationen in Titin auch zu reinen Muskeldystrophien führen, ohne dass das Herz betroffen ist (Udd et al., 2005;).

Die Z-Scheiben (auch Z-Linien) stellen die lateralen Grenzen des Sarkomers dar und beinhalten eine Vielzahl an Proteinen, die ein komplexes Netzwerk bilden und zur Verankerung der dünnen Aktinfilamente und der filamentösen Titin- und Nebulin-Moleküle beitragen. Die Z-Scheibe ist auch ein Knotenpunkt zur Wahrnehmung von mechanischem Stress und deren Proteine sind an der Signalübertragung zum Nukleus beteiligt, was zur Beibehaltung der Muskelhomöostase beiträgt (Clark et al., 2002).

Das Protein α -Aktinin, ein Mitglied der Spectrin Überfamilie, ist ein bedeutender Bestandteil der Z-Scheiben. Es verankert die Aktinfilamente sowie die Titinfilamente an der Z-Scheibe und bildet quer zur Axis der Myofibrillen ein Gitter, welches sich bei Kontraktion in seinem Durchmesser ausdehnt (reviewed in Gautel, 2011). Bei Mammaliern wurden vier unterschiedliche und gewebespezifische α -Aktinin Isoformen, die durch vier verschiedene Gene kodiert werden, identifiziert. Die hauptsächlich im Herzen exprimierte Isoform ist das α -Aktinin-2 (Frank & Kuhn, 2006; Otey & Carpen, 2004; Clark et al., 2002).

Das Protein α -Aktinin hat ein Molekulargewicht von ungefähr 97 kDa und existiert als Homodimer, das aus zwei identischen Polypeptiden, welche in gegensätzlicher Richtung angeordnet sind, aufgebaut wird. Das N-terminale Ende enthält eine Aktin-bindende Domäne und vernetzt die dünnen, aus zwei Sarkomeren stammenden, antiparallelen Aktinfilamente in einem regulären Abstand an der Z-Scheibe. Am C-terminalen Ende befindet sich eine Calmodulin-ähnliche Domäne welche mit den N-Terminalen „Z-Repeats“ von Titin interagiert. Der zentrale Stab des Proteins enthält Spectrin-ähnliche Repeats, die mit einer Vielzahl an Proteinen interagieren können (Frank & Kuhn, 2006; Otey & Carpen, 2004; Clark et al., 2002).

Die Anzahl dieser gitterähnlichen Vernetzungen zwischen den Aktinfilamenten, die durch das α -Aktinin geformt werden, variiert je nach Muskeltyp. Die Z-Scheiben der Herzmuskelzellen sind erheblich dicker aufgrund einer höheren Anzahl von α -Aktinin Vernetzungen (Gautel, 2011).

Das α -Aktinin trägt hauptsächlich zur strukturellen Stabilität bei, spielt eine Schlüsselrolle bei der molekularen Vernetzung der Z-Scheiben (Frank & Kuhn, 2006) und scheint außerdem während der Myofibrillogenese, gemeinsam mit Titin und dem M-Banden Protein Myomesin, unentbehrlich für den Aufbau der Myofibrillen in eine geordnete sarkomere Struktur zu sein (Ehler et al., 1999).

Das Myomesin (ca. 185kDa) ist spezifisch für die gestreifte Muskulatur und stellt eine strukturelle Komponente der M-Bande dar. Es verankert die dicken Filamente sowie das elastische Titinfilament

in der Mitte des Sarkomers (Clark et al., 2002; Tkhoverbova & Trinick 2003). Ehler et al. haben 1999 vorgeschlagen, dass Myomesin während der Myofibrillogenese für die Integration der dicken Myosinfilamente mit Titin in Sarkomeren verantwortlich ist.

Myomesin ist in allen gestreiften Muskeln von Vertebraten exprimiert, existiert allerdings je nach Muskeltyp in verschiedenen Isoformen (Agarkova et al., 2000). In embryonalen Herzen von Vertebraten ist das EH(embryonic heart)-Myomesin (ca. 192kDa) in der frühen Entwicklung die hauptsächliche Isoform und wird ca. ab dem Zeitpunkt der Geburt herunterreguliert. Die Sequenz von EH-Myomesin ist identisch mit dem zuvor in der Skelettmuskulatur von Mäusen beschriebenen Sklemin (Price, 1987; Clark et al., 2002; Agarkova et al., 2000). Agarkova et al. 2000, haben vorgeschlagen dass die M-Banden-Region der Kardiomyozyten zumindest während der Embryonalentwicklung eine elastische Eigenschaft aufweisen könnte, da das EH-Segment von EH-Myomesin elastische Eigenschaften analog der PEVK-Region von Titin aufweist. Eine weitere interessante Entdeckung ist, dass EH-Myomesin in Mäusen mit DCM Phänotyp wieder exprimiert wird und demnach vielleicht sogar als ein Marker für eine DCM fungieren könnte (Agarkova et al, 2000).

Das Myosin bindende Protein-C (MyBP-C) ist ein Multidomänenprotein welches, ähnlich wie Titin, Immunglobulin I und Fibronectin Typ III Domänen enthält. Es wurden bisher drei verschiedene MyBP-C Isoformen (jeweils spezifisch für die schnelle oder langsame Skelettmuskulatur, oder kardiale Muskulatur) bei Mäusen und Menschen beschrieben (James & Robbins, 2011).

Die ca. 149kDa großen MyBP-C Proteine befindet sich innerhalb eines Sarkomers in der C-Zone beidseitig der M-Bande in einer Abfolge von 7 bis 9 axialen Bändern welche in einem regelmäßigen Intervall von ungefähr 43nm an dem dicken Myosinfilament, mittels ihrer C-terminalen Region, gebunden vorliegen (James & Robbins, 2011). Dies entspricht dem Abstand der Myosinköpfe der dicken Filamente (Tkhoverbova & Trinick, 2003). Es kann mit allen 3 Filamentsystemen (den kontraktilen Aktin- und Myosinfilamenten, als auch dem elastischen Titin-Filament) des Sarkomers interagieren. Die exakte Beschaffenheit dieser Interaktionen, sowie die funktionellen Konsequenzen der modifizierten Bindungen bleiben ungeklärt. Das MyBP-C scheint sowohl eine wesentliche strukturelle Komponente als auch eine signalgebende Rolle in der Muskelkontraktion zu spielen, die bis heute weitgehend ungeklärt ist (James & Robbins, 2011).

Mutationen im MyBP-C kodierenden Gen gelten neben Mutationen im Gen das für β -MHC kodiert, als die häufigste Ursache für die humane HCM (Marian & Roberts, 2001). Schätzungsweise 42% der FHCM Fälle stehen mit Mutationen im kardialen MyBP-C in Verbindung (Richard et al., 2003). Bei DCM wurden bisher nur bei zwei Patienten Mutationen in MyBP-C beschrieben (Dähmow et al., 2002; Konno et al., 2003).

Das **MLP** (muscle Lim protein), auch bezeichnet als CRP3 bzw. CSRP3 (cystein-rich protein 3), ist ein Mitglied der CRP (Cystein-reichen Protein) Familie. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von evolutionär konservierten Proteinen, die primär aus zwei hintereinanderfolgenden LIM-Domänen

bestehen. CRP-Proteine werden vor allem in Muskelgewebetypen exprimiert werden und interagieren häufig mit dem Aktin Zytoskelett. Alle CRPs binden α -Aktinin und weisen ähnliche biochemische Eigenschaften und subzelluläre Verteilungen auf (Louis et al. 1997). Proteine, die LIM Domänen enthalten, spielen eine wichtige Rolle in einer Vielzahl von fundamentalen biochemischen Prozessen, wie bei der Organisation des Zytoskeletts, der Entwicklung von Organen und bei pathologischen Prozessen (Bach, 2000). Die LIM Domäne ist mittlerweile als ein potenzielles Protein-Protein Interaktions Modul bekannt, welches die spezifischen Kontakte zwischen den Mitgliedern eines funktionellen Komplexes vermittelt und dabei die Aktivität von gewissen Proteinen verändern kann (Bach, 2000; Dawid et al., 1998).

MLP/CRP3 ist spezifisch für die gestreifte Muskulatur und wird sowohl in den embryonalen als auch adulten gestreiften Muskelzellen exprimiert, wobei es jedoch im adulten Skelettmuskel nur in langsam kontrahierenden Fasern exprimiert wird (Arber et al 1997; Schneider et al., 1999).

Arber et al. (1997) haben vorgeschlagen, dass MLP als ein Regulator in der Muskeldifferenzierung fungiert, nachdem Mäuse die homozygot null für MLP sind, zwar neonatal ein normales Herz mit unauffälliger Zytoarchitektur haben, jedoch nach der Geburt starke kardiale Dysfunktionen und Veränderungen in der Architektur der Kardiomyozyten, die dem Phänotyp einer dilatativen Kardiomyopathie ähneln, entwickeln. MLP ist in der Z-Scheibe lokalisiert, welche eine entscheidende Rolle in Organisation und Beibehaltung der Architektur der Kardiomyozyten spielt.

Die subzelluläre Lokalisierung von MLP in Kardiomyozyten ist jedoch nicht auf ein einzelnes Zellkompartiment beschränkt, da mittlerweile bekannt ist, dass es an eine große Vielzahl von muskelspezifischen Proteinen binden kann und mittels eines hervorragend charakterisierten monoklonalen Antikörpers eine Verteilung durch das gesamte Zytoplasma der Herzzellen nachgewiesen wurde (Geier et al., 2008; Gehmlich et al., 2008; Buyandelger et al., 2011). Zusätzlich zu α -Aktinin wurden für MLP Interaktionen mit Telethonin, ein Titin bindendes Protein der Z-Scheibe, N-RAP, ein mit Nebulin verwandtes, Aktin bindendes Protein der Interkalierenden Scheiben, β 1-spectrin von Costameren und sogar mit dem skelettmuskelspezifischen Transkriptionsfaktor MyoD beschrieben (Louis et al., 1997; Kong et al., 1997; Flick & Konieczny, 2000; Ehler et al., 2001; Knöll et al., 2002; Gehmlich et al. 2004). Knöll et al. (2002) haben vorgeschlagen, dass MLP gemeinsam mit Telethonin und Titin als ein direkter Mechano(stress)-sensor agiert. Diese Rolle von MLP ist bisher umstritten, vor allem weil sie nicht einfach mit den Lokalisationsdaten vereinbar ist (Gautel et al., 2011; und Gehmlich et al., 2008). Geier et al. (2008) haben erstmals mit Hilfe eines neu generierten murinen monoklonalen Antikörpers (79D2) gegen MLP, welcher nicht mit den näher verwandten CRP1 und CRP2 kreuzreagiert und weniger zur unspezifischer Reaktivität neigt wie ein polyklonaler Antikörper, gezeigt, dass es sich bei MLP um ein diffuses zytoplasmatisches Protein handelt, welches nicht auf sarkomere Strukturen im Myokard beschränkt ist und einfach in andere zelluläre Kompartments translozieren kann. Beispielsweise kommt es zu einer Akkumulierung von MLP im Zellkern infolge vom Herzversagen verursacht durch myokardiale Infarkte beim Menschen und in

zwei Tiermodellen für Herzerkrankungen (Boateng et al., 2007; 2009). Demnach ist die Rolle von MLP aufgrund seiner geringen Größe und zytoplasmatischen Verteilung, weniger die eines direkten (gemeinsam mit Titin und α -Aktinin fungierenden) Mechanosensors zu verstehen, als eher die eines nachgeschalteten Effektors, welcher das Signal als Antwort auf mechanischen Stress umwandelt (Geier et al. 2008; Gehmlich et al. 2008).

Trotz der Identifizierung von einer großen Anzahl an verschiedenen mit MLP interagierenden Proteinen, ist dessen präzise Rolle noch immer nicht gut definiert. Ebenso ist dessen Rolle bei Herzerkrankungen bis heute nicht völlig geklärt, außer dass Veränderungen in der Expression von MLP im Zusammenhang mit Herzversagen zu beobachten sind und Mutationen im MLP sowohl zur DCM als auch HCM führen können (Zolk et al., 2000; Gehmlich et al., 2008; Boateng et al. 2007; Heinecke et al., 2005; Wilding et al. 2006).

1.2.3. Das nicht-sarkomere Zytoskelett

Wie auch in anderen Zelltypen ist das eigentliche Zytoskelett von Kardiomyozyten auch für seine weitreichenden Funktionen spezialisiert und besteht aus den Mikrofilamenten (Aktin), Mikrotubuli (Tubulin) und den Intermediärfilamenten (Desmin). Der Grossteil des Aktins befindet sich in den Sarkomeren, aber es kommen auch Aktinfilamente in der Nähe der Plasmamembran vor, die vermutlich bei der Organisation der T-Tubuli und der Costamere beteiligt sind und wahrscheinlich aus nichtmuskulären Isoformen des Aktins bestehen (siehe Übersichtsartikel von Dwyer et al., 2012). Mikrotubuli sind vor allem am Transport von zellulären Komponenten beteiligt, z.B. wurde gezeigt, dass die mRNA von Myosin entlang von Mikrotubuli transportiert wird (Perhonen et al., 1998). Außerdem kommt es zu einer veränderten Expression von Tubulin während einer HCM (Ehler & Perriard, 2000). Die Intermediärfilamente der Herzzellen bestehen hauptsächlich aus Desmin.

Desmin ist ein muskelzellspezifisches Protein und wird mit einem Molekulargewicht von 56 kDa durch ein single copy Gen *DES* in allen Vertebraten kodiert (Capetanaki et al., 1984). In Kardiomyozyten bilden die Intermediärfilamente auf der Höhe der Z-Scheiben ein verknüpfendes querverlaufendes Gerüst um die Myofibrillen, das sich über die Costamere zum Sarcolemma aber auch bis zur Kernmembran erstreckt (Capetanaki et al., 1997). Costamere bestehen aus Proteinkomplexen, die Vinkulin, Integrine und Proteine des DGC (Dystrophin Glycoprotein Komplex) enthalten können und die Intermediärfilamente und Aktin Mikrofilamente mit der Plasmamembran verbinden (Ervasti, 2003). In den Kardiomyozyten ist Desmin außerdem stark konzentriert an den Interkalierenden Scheiben (ID) in einem Netzwerk von longitudinal und transversal verlaufenden Intermediärfilamenten zu finden (Ferrans & Roberts, 1973; Thornell et al., 1985; Carlsson & Thornell, 2001).

Desmin ist eines der ersten während der Myogenese nachweisbaren muskelspezifischen Proteine im Säugerembryo, noch bevor das Herz zu Schlagen beginnt. Es ist jedoch am Zusammenbau der Myofibrillen selbst nicht beteiligt, sondern scheint für die Erhaltung der Zytoarchitektur der

Kardiomyozyten essentiell zu sein (Li et al., 1996; Millner et al., 1996; Thornell et al., 1997; Ehler & Perriard, 2000). Desmin Knockout Mäuse entwickeln und reproduzieren sich normal und haben keinerlei Probleme Myofibrillen aufzubauen. Sie entwickeln jedoch postnatal (unter anderem) eine Kardiomyopathie, welche einer DCM, die beim Menschen gefunden wird, ähnelt (Li et al 1996, Milner et al. 1996, Milner et al. 1999, Thornell et al. 1997). Desmin KO Mäuse entwickeln eine Hypertrophie die später zu einer Dilatation mit einer schadhafte systolischen Funktion und Herzversagen führt (Milner et al. 1999). Bei einigen Fällen menschlicher Erkrankungen wurde eine veränderte Desmin Expression beschrieben (Carlsson & Thornell, 2001).

Zusätzlich wurden Herz- und Skelettmuskelyopathien beschrieben, welche mit verschiedenen Mutationen im *DES* Gen oder im $\alpha\beta$ -crystallin *CRYAB* Gen assoziiert sind und deren Kennzeichen abnorme Ablagerungen von Desminaggregaten sind (Goldfarb et al., 2004). Die Symptome einer Desmin-Myopathie sind unter anderem eine Skelettmuskelschwäche, kardiale Arrhythmien, Herzversagen und Akkumulierung von Desmin in Herz und Skelettmuskelzellen (Goldfarb et al., 2004), diese Symptome können jedoch in unterschiedlicher Ausprägung gleichzeitig oder gesondert auftreten und müssen auch nicht beide Muskeltypen betreffen. Zusätzlich wurden Punktmutationen im *DES* Gen in DCM beschrieben (Li et al 1999).

1.2.4. Membran assoziierte Proteinkomplexe

Herzmuskelzellen zeichnen sich im gesunden Gewebe durch eine präzise Abtrennung von Zell-Zell- und von Zell-Matrixkontakten aus (Perriard et al., 2003). Erstere sind exklusiv an den bipolaren Enden, den sogenannten Interkalierenden Scheiben (ID, Glanzstreifen) zu finden, letztere erstrecken sich entlang der lateralen Plasmamembran der Myozyten (d.h. entlang der Längsachse der Zellen) und setzen sich aus den Costameren, rippenartigen Strukturen auf Höhe der Z-Scheiben, die als Markerproteine Vinkulin enthalten, und dem DGC zusammen, der eine Verbindung zwischen dem Aktin-Zytoskelett und dem extrazellulären Matrixprotein Laminin via Dystrophin und Dystrophin assoziierte Glykoproteine darstellt (für Übersichtsartikel siehe Ervasti, 2003 und 2007). Ehler et al., konnten 2001 in einem Mausmodell für DCM, der MLP KO Maus zeigen, dass sich die Anordnung von Vinkulin und somit der Costamere in betroffenen Herzzellen ändert. Statt der regelmäßigen Streifung ist ein punktiertes Muster auf der Innenseite der Plasmamembran zu beobachten (Ehler et al., 2001). Diese Veränderungen setzen sich auch auf der extrazellulären Seite fort, wo es zu einer unorganisierteren Ablagerung von Laminin kommt (Ehler, 2010). Mutationen des Dystrophin führen nicht nur zur Muskeldystrophie sondern können sich auch später im Leben der Patienten als DCM äußern und auch verschiedene Proteine des DGC sind bekannt dafür, dass sie im mutierten Zustand zu vererbbarer DCM führen können (Seidman und Seidman, 2001; Ervasti, 2007).

1.2.5. Proteine der Interkalierenden Scheiben (ID)

Die Interkalierenden Scheiben beinhalten hauptsächlich drei funktionell und strukturell verschiedene Proteinkomplexe, welche die mechanische Kraftübertragung und die elektrische Kopplung von benachbarten Kardiomyozyten gewährleisten. Dabei handelt es sich um die Fascia Adherens (oder auch Zonula Adherens, Adherens Junctions), die Desmosomen (Macula Adherens), und die Gap Junctions.

Die **Gap Junctions** gewährleisten die elektrische Kopplung der Zellen und werden pro Plasmamembran durch zwei aneinanderliegende Konnexone, jeweils bestehend aus 6 verschiedenen Connexin Molekülen, gebildet. Sie bauen Kanäle auf, die durch das Sarcolemma von zwei benachbarten Kardiomyozyten verlaufen und eine direkte Ionenpassage sowie den direkten Austausch von Metaboliten und Signalmolekülen zwischen den benachbarten Kardiomyozyten ermöglichen (Perriard et al. 2003; Estigoy et al., 2009).

In den arbeitenden (kontraktile) ventrikulären Kardiomyozyten aller Säugetiere inklusive dem Menschen ist die Connexin 43 Isoform dominierend. Weiters können in den Kardiomyozyten Connexin 40 und Connexin 45 in geringeren Mengen exprimiert sein, sind jedoch größtenteils auf die spezialisierten Kardiomyozyten des impulserzeugenden und -leitenden Systems beschränkt (Perriard et al., 2003; Severs et al., 2004; Severs et al.; 2008).

Innerhalb der endständigen stufenähnlich angeordneten IDs befinden sich die Gap Junctions überwiegend in den Membransegmenten, welche parallel zur longitudinalen Achse der Zelle ausgerichtet sind (Severs et al., 1989).

Diese und andere Eigenschaften in der Organisation der Gap Junctions sowie Aspekte der Gewebearchitektur wie Zellgröße und Form, wirken zusammen um eine bevorzugte Weiterleitung des Impulses in Richtung der longitudinalen Achse, folglich das normale Muster einer anisotropen Verbreitung des Impulses und eine synchrone Muskelkontraktion im gesunden Ventrikelmyokard sicherzustellen (Severs et al., 2004). Demnach ist es naheliegend, dass Veränderungen in der normalen Komposition der Gap Junctions infolge von Umbauprozessen aufgrund einer kardialen Herzerkrankung eine wesentliche Rolle in der Ausbildung von Arrhythmien spielen (für Übersichtsartikel siehe: Severs et al., 2004 und 2008).

Die **Adherens Junctions** befinden sich in der transversal zur Längsachse der Kardiomyozyte gelegenen Region der Interkalierenden Scheiben. Sie bestehen aus transmembranalen Proteinen der Cadherin Familie, dem N-Cadherin, die den interzellulären Kontakt aufbauen. An der zytoplasmatischen Seite binden an die N-Cadherin Schwänze das β -Catenin oder Plakoglobin. Wiederum durch deren Interaktion mit α -Catenin stellen sie entweder direkt oder indirekt über α -Aktinin den Kontakt zum Aktinzytoskelett her und verankern damit die Sarkomere über die Z-Scheiben an der Membran. Die Adherens Junctions übertragen somit die Kraft, die aus der Kontraktion der Myofibrillen entsteht (Clark et al., 2002; Perriard et al., 2003).

Zusätzlich zu seiner Rolle in Zell-Zellkontakten spielt das β -Catenin eine essentielle Rolle bei der Mesoderm-Differenzierung, da transgene β -Catenin Knockout Mäuse noch vor Entwicklung des Herzens und Ausbildung des Mesoderms sterben (Haegel et al., 1995).

Ein Überschuss an β -Catenin führt bei konditional transgenen Mäusen mit stabilisiertem β -Catenin zur Entwicklung einer DCM (Hirschy et al., 2010). Im Gegensatz dazu ist ein Verlust von β -Catenin in den ID bei konditional transgenen Mäusen mit ventrikelspezifischer Deletion von β -Catenin tolerierbar (Hirschy et al., 2010).

Desmosomen verankern die Intermediärfilamente an der Membran und ermöglichen hauptsächlich die mechanische Stabilität bei Kraftgenerierung. Der desmosomale Komplex wird gebildet durch die transmembranen Proteine der Cadherinfamilie, Desmocollin und Desmoglein, welche die interzellulären Kontakte bilden und einem zytoplasmatischen Proteinkomplex aus Plakoglobin, Plakophilin und Desmoplakin an dessen C-Terminus das Intermediärfilament aus Desmin verankert ist. Die Intermediärfilamente verankern wiederum die Z-Scheiben der Sarkomere (für Übersichtsartikel siehe: Clark et al., 2002).

Wie bereits erwähnt, können Mutationen in desmosomalen Proteinen zu einer ARVD führen (Sen-Chowdhry, et al. 2007).

Das **N-RAP**, ein Nebulin ähnliches Protein, wurde erstmals von Luo et al., 1997 als ein Aktin-bindendes LIM Protein beschrieben, welches in gestreiften Muskelzellen konzentriert an den Myotendinous Junctions bzw. den ID zu finden ist. Nach neuer Sequenzanalyse von humanen N-RAP besitzt es ein Molekulargewicht von ca. 197kDa (Gehmlich et al., 2004). Am C-terminalen Ende von N-RAP befinden sich Nebulin-ähnliche Superrepeats, welche an Aktin und Vinkulin binden, und in der Nähe des N-terminalen Endes befindet sich eine einzelne LIM Domäne, welche an Talin bindet (Luo et al. 1999, Luo et al. 1997). In der Region zwischen der LIM Domäne und der Nebulin-ähnlichen Domäne bindet das MLP an N-RAP (Ehler et al., 2001).

Luo et al. haben 1997 und 1999 erstmals, basierend auf der zellulären Lokalisierung und Bindungsaffinität von N-RAP, die Hypothese aufgestellt, dass N-RAP eine essenzielle Verbindung zwischen den terminalen Aktinfilamenten der Myofibrillen und dem Proteinkomplex, der diese Strukturen mit der Zellmembran verbindet, darstellt. Ultrastrukturelle Studien der gestreiften Skelett- und Herzmuskulatur von Mäusen haben gezeigt, dass N-RAP in den terminalen Aktinbündeln lokalisiert ist, welche die Enden der Myofibrillen mit der Membran verbinden (Herrera et al., 2000; Zhang et al., 2001).

Gehmlich et al., haben 2004 weiters gezeigt dass N-RAP genauso wie das MLP an das Z-Scheiben-Protein das α -Aktinin binden kann. Da potentiell verschiedene Bindungsstellen für MLP und α -Aktinin am N-RAP vorliegen, können alle drei Proteine einen ternären Proteinkomplex bilden.

N-RAP wird auch von der Arbeitsgruppe Horowitz eine wesentliche Rolle in der Myofibrillogenese zugeschrieben (Crawford & Horowitz, 2011).

Bei verschiedenen genetisch modifizierten Mausmodellen, die einen adulten DCM Phänotyp entwickeln (Arber et al., 1997; Sussmann et al., 1998), kommt es bereits in der postnatalen bzw. juvenilen Entwicklung zu einer Hochregulierung von N-RAP Proteinmengen im linken Ventrikelmyokard, d.h. noch bevor der Phänotyp einer DCM ersichtlich ist (Ehler et al., 2001; Perriard et al., 2003). N-RAP könnte demnach einen möglichen frühen Marker für eine DCM darstellen (Ehler et al., 2001). Nachdem es als ein Gerüstprotein mit mehreren Domänen (bezeichnet als *Scaffolding Protein*) mit einer Vielzahl an potentiellen Proteinen interagiert (Luo et al., 1999; Ehler et al., 2001; Lu et al., 2003), können Störungen in der Homöostase der Interaktionen durch auftretende Mutationen der Bindungspartner zu einer geringeren Bindungsaffinität führen. Dies könnte zu einer kompensatorischen N-RAP Hochregulierung führen und in weiterer Folge könnte diese unausgeglichene Expression in das Auslösen eines *Myocyte Disarray* und einer Hypertrophie involviert sein (Gehmlich et al., 2004).

Veränderungen in der Struktur und Komposition der Interkalierenden Scheiben wurden erstmals durch Ehler et al. (2001) mit der Dilatativen Kardiomyopathie in Verbindung gebracht. Anhand zwei verschiedener Mausmodelle die beide Phänotyp einer DCM entwickeln, wurden gleiche Veränderungen in der mechnaischen und elektrischen Koppelung der Myozyten bei adulten Tieren festgestellt. Dabei kam es sowohl bei der MLP Knockout Maus (Arber et al, 1997) und der TOT (Tropomodulin overexpressing) Maus (Sussmann et al., 1998) zu einer Hochregulierung der Proteine der Adherens Junctions, bei unveränderten desmosomalen Proteinleveln, und Runterregulierung des Connexin43 der Gap Junctions.

1.3. Zielsetzung dieser Diplomarbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die subzelluläre Organisation einer ganzen Bandbreite verschiedener Proteine von Kardiomyozyten, die mit Kardiomyopathien assoziiert sind und als mögliche frühe Marker für die Erkrankung vorgeschlagen wurden, in versagenden menschlichen Herzen im Vergleich zu einem Kontrollgewebe zu charakterisieren.

Die Auswahl der hinsichtlich subzellulärer Verteilung und Komposition zu untersuchenden Proteine basiert zum Großteil auf Beobachtungen, die an Mausmodellen für die Dilatative Kardiomyopathie gemacht worden sind (Ehler et al., 2001, Schönauer et al, 2011) und wo vor allem Veränderungen in der Zusammensetzung der spezialisierten bipolaren Zell-Zell Kontakte der Kardiomyozyten, den Interkalierenden Scheiben, beschrieben wurden (Ehler et al., 2001).

2. Material und Methoden

2.1. Humane Herzgewebeproben

Frisches Myokardgewebe wurde ungefähr an der gleichen Stelle in Apexnähe aus dem linken und dem rechten Ventrikel, von explantierten humanen Herzen entnommen, die aufgrund einer Erkrankung nicht transplantierbar waren. Die Proben wurden so schnell wie möglich entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und gelagert. Der Probenumfang im Bezug auf kardiale Erkrankungen wurde weitgehend durch die Zufälligkeit der durchgeführten Transplantationen bei Patienten bestimmt.

Zusätzlich wurde bereits existierendes Probenmaterial vom linken humanen Ventrikelmyokard (aus Apexnähe) verwendet das von Dr. Stefan Pfaffenberger, von der Medizinischen Universität Wien, zur Verfügung gestellt wurde. Bei diesen Proben handelte es sich sowohl um in Paraformaldehyd fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben, als auch um unfixierte Gewebeproben, die bei -80°C gelagert wurden. Aufgrund von Materialknappheit konnten nicht von allen diesen Proben Kryo- bzw. Paraffinschnitte durchgeführt werden. Von allen Proben wurden jedoch Immunoblots gemacht.

Insgesamt wurden 23 Patientenproben verwendet, die sich in Geschlecht, Alter und Erkrankung unterschieden (siehe Tab. 1). Die Proben sind anonymisiert und durch Nummern identifizierbar. Bei den Proben P39 bis P50 handelt es sich um Proben, die im Zuge dieser Arbeit entnommen wurden. Die übrigen Proben (P15, P17, P18, P19, P25, P26, P27, P30, P34, P37, K2, K4) wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Bei den 23 Patientenproben mit Herzversagen im Endstadium handelt es sich um 14 dilatative Kardiomyopathie (DCM) Erkrankungen, 1 idiopathische hypertrophe Kardiomyopathie (HCM), 2 schwere kongenitale Herzdefekte (HRHS, TGA), 2 ischämische Kardiomyopathien (iCMP), 1 Arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie (ARVD), 1 Koronare Herzkrankheit mit Aortenstenose und bereits durchgeführten Bypass (KHK) sowie 2 Kontrollproben aus nicht transplantierten Spenderherzen.

Drei von den insgesamt 14 DCM Proben weisen eine eindeutige positive familiäre Anamnese (FDCM) auf und sind demnach primäre Erkrankungen mit genetischer Ursache. Weiters sind zwei Fälle von perinatal manifestierter DCM und drei erworbene DCM *status post* Myokarditis enthalten. Bei den übrigen sechs DCM Proben (P42, P44, P17, P19, P25, P26) handelt es sich um größtenteils wahrscheinlich sekundär verursachte ischämische DCM Erkrankungen.

2.2. Mausherzproben

Zum Vergleich der Ergebnisse am humanen linken Ventrikelmyokard wurden 9 Monate alte genetisch manipulierte Mäusemännchen herangezogen. Dabei handelte es sich um die MLP Knockout Maus (Arber et al., 1997), welche einen DCM Phänotyp entwickelt und die Wildtyp Maus als Kontrolle. Das Herzgewebe wurde sofort nach Entnahme aus Apexnähe in flüssigen Stickstoff gefroren.

Tab.1. Verwendete humane Proben aus dem linken und seltener rechten Ventrikelmyokard. 14 DCM Proben, 2 kongenitale Herzdefekte (TGA, HRHS), 2 ischämische Kardiomyopathien (iCMP), 1 Arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie (ARVD), 1 KHK mit Aortenstenose , 1 HCM, 2 Proben vom nichttransplantierten Spendergewebe. (k.A.) keine Angaben, (st.p.) *status post*

Patienten-nummer	Geschlecht	Alter	Grund-krankheit	Zusatz-diagnose	NYHA	Infarkt/ Reanimation	Assistent-device	Diabetes	Kryo-schnitte	Paraffin-schnitte	Immuno-blots
P39	w	12	HRHS mit Pulmonalatresie & Triskupidalatresie	st.p. Fontan-OP	k.A.	k.A.	nein	nein	LV, RV	/	X
P40	m	16	aDCM, Myokarditis, li Ventrikelthrombus	st.p. Pulmonalembolie, Muskeldystrophie (Becker)	k.A.	k.A.	ECMO	nein	LV, RV	/	X
P41	m	14	TGA (diskordante Ventrikulo-arterielle Verbindung)	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	nein	LV, RV	/	X
P42	m	64	DCM	permanentes AFIB, MI	III	k.A.	AICD-Implant	nein	LV, RV	/	X
P43	m	64	DCM, st.p. Myokarditis	Myokarditis m. 30a	III	k.A.	ICD mit mehrfachen Schocks	NIDDM	LV, RV	/	X
P44	w	64	DCM, st.p. AKE & MKE	AKE, MKE, COPD, CNI III	k.A.	k.A.	CRT-ICD	DM II, NIDDM	LV	/	X
P45	w	15	FDCM	MI II, VTs	k.A.	k.A.	ECMO	nein	LV	/	X
P46	m	67	KHK, AS	CABG, art. Hypertonie, HLP	III	Reanimation, HWI, NSTEMI, AV-Block	ICD	DM II, NIDDM	LV, RV	/	X
P47	w	68	ARVD	art.Hypertonie, rezidivierende VTs	k.A.	k.A.	ICD	nein	LV, RV	/	X
P48	w	58	iCMP, Vorhofflimmer-arrythmie	art. Hypertonie, AFIB, HLP, CNI	IIIb-IV	CPR	ICD	DM II, NIDDM	LV	/	X
P50	w	55	iCMP	Defi-implant		VWI	ICD	nein	LV	/	X
P15	w	56	FDCM (seit 27a bekannt)	AI, MI III-IV, deshalb Mitralklappenrekonstruktion, Rest II-III	IV	k.A.	nein	nein	LV	LV	X
P17	w	56	DCM	TI, relative MI, Hypercholesterinämie	k.A.	k.A.	nein	nein	/	LV	X
P18	m	48	DCM, st.p. Myokarditis (m. 19a)	latente Hypothyreose	III	k.A.	nein	DM II	/	LV	X
P19	w	58	DCM, diffuse sklerose der Coronar Art.	MI* III-IV, HLP, globale respirative Insuffizienz		k.A.	nein	nein	/	LV	X
P25	m	54	DCM	Sklerose der Bauchaorta, 40% Sklerose der ACE, hypercholesterinämie	k.A.	k.A.	nein	nein	/	LV	X
P26	m	57	DCM	st.p. mechan. AKE	k.A.	k.A.	ICD	nein	/	LV	X
P27	w	22	PDCM		k.A.	k.A.	nein	nein	/	LV	X
P30	w	20	PDCM, intermittierendes Vorhofflimmern	beim Kind der Patientin liegt ebenfalls eine DCM vor	k.A.	k.A.	nein	nein	/	/	X
P34	m	12	HCM	MI II-III, v.a. Soffwechselstörung	k.A.	k.A.	nein	nein	/	LV	X
P37	w	8	FDCM		k.A.	k.A.	ECMO	nein	/	/	X
K2	m	35	Spender 2	LVF normal, HTN, leicht LV-Hypertrophie					LV	/	X
K4	m	k.A.	Spender 4	unbekannt					LV	LV	X

2.3. Herstellung von Immunfluoreszenzpräparaten und Konfokale Mikroskopie

2.3.1 Herstellung und Immunfärbung von Kryoschnitten für die Konfokale Mikroskopie

Von 12 verschiedenen Proben und zwei Kontrollproben wurden Kryoschnitte aus dem linken Ventrikelmyokard hergestellt. Dabei handelte es sich um P39, P40, P41, P42, P43, P44, P45, P46, P47, P48, P50, P15 und die Kontrollen K4 und K2 (Tab.1.). Von P39, P40, P41, P42, P43, P46, P47 wurden zusätzlich Kryoschnitte aus dem rechten Ventrikelmyokard angefertigt.

Von der im flüssigen Stickstoff gelagerten Myokardgewebeprobe wurde ein ungefähr 5x5mm großes Stück abgebrochen und in Tissue Tek® bei -20°C eingebettet. Dabei wurde rasch gearbeitet um ein Auftauen zu vermeiden. Der Kryostat wurde auf eine Schneidetemperatur von -20°C, eine Objekttemperatur von -25°C und eine Schnittdicke von 11µm eingestellt.

Die Schnitte wurden auf Superfrost® Plus (weiß, adhäsiv und geschliffen 90°, CELLO von Laborchemie GmbH.) Objektträgern aufgenommen. Zwischendurch wurde mittels einer Schnellfärbung mit einer Hämatoxylin-Lösung (modifiziert nach Gil III für die Mikroskopie von Merck) kontrolliert ob im Schnitt genügend Stellen mit longitudinal geschnittenen Herzmuskelzellen vorhanden sind. Die Gefrierschnitte wurden dann für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur zum Antrocknen am Objektträger stehen gelassen. Ein Teil der Gefrierschnitte wurde bei -80°C gelagert und bei Bedarf direkt aus dem Kühlschrank ohne Auftauen fixiert.

Nach dem Antrocknen wurden die Schnitte bei -20°C für 5 min in Azeton fixiert. Dabei handelt es sich um eine sehr sanfte Form der Fixierung, bei der die Proteine nicht vernetzt werden, was die Reaktion mit Antikörpern beeinträchtigen könnte. Die Proteine fallen chemisch aus und gleichzeitig wird die Zellmembran permeabilisiert. Nach der Fixierung wurde zweimal in PBS gewaschen, anschließend für 1 Minute in 0,2% TritonX-100/PBS permeabilisiert, um die semipermeable Zellmembran für die Antikörper durchlässig zu machen, und wieder zweimal in PBS gewaschen. Dann wurden die Schnitte mit einem Wachsstift (Dako) voneinander abgegrenzt und mit 5%NGS in 1%BSA/Gold Buffer (GB) für 30 Minuten geblockt, wodurch die unspezifische Bindung der Antikörper an freie Bindungsstellen verhindert werden sollte. Im Allgemeinen wird für diesen Schritt Serum von jenem Tier verwendet, in welchem der zweite Antikörper hergestellt wurde.

Nach dem Blocking wurde ohne zu waschen die erste Antikörperlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Alle Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer auf einem Schüttler durchgeführt.

Bevor die zweite Antikörperlösung (ebenfalls in 1% BSA/GB verdünnt) auf die Schnitte aufgetragen wurde, wurde dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen, um nichtgebundene Primärantikörper zu entfernen. Mit der zweiten Antikörperlösung, die mit Fluorochromen gekoppelte Antikörper gegen den ersten proteinspezifischen Antikörper enthielt, wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. In weiterer Folge wurden die Schnitte dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen, in Lisbeth's Medium (Messerli et al., 1993) eingebettet, mit Nagellack versiegelt und bei 4°C im Dunkeln gelagert, um ein Verblässen der Fluoreszenz zu verzögern.

Die Zusammensetzung der Gold Buffer (GB) Stammlösung für die Herstellung von 1% BSA/GB ist: 20mM Tris-Base, 155mM NaCl, 2mM EGTA, mit pH 7,5,; Lagerung bei RT.

Als Waschlösung wurde Phosphate Buffered Saline (Dulbecco A) von Oxoid (BR0014G) verwendet. Dabei wurde eine PBS Tablette, für eine einfache Lösung, auf 100ml Aqua Bidest. verdünnt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Als Einbettmedium wurde Lisbeth's Medium verwendet, welches ein zu rasches Ausbleichen der angefärbten Schnitte verhindern soll. Dieses setzt sich wie folgt zusammen aus: 35ml 100% Glycerin, 2,5ml n-propyl Gallate und 15ml 0,1M Tris Base, mit pH von 9,5. Gelagert wird es bei -20°C

2.3.2. Herstellung und Immunfärbung von Paraffinschnitten für die Konfokale Mikroskopie

Die in Paraffin eingebetteten Proben vom linken und rechten humanen Ventrikelmyokard (in Apexnähe) wurden von Dr. Stefan Pfaffenberger von der Medizinischen Universität Wien zur Verfügung gestellt. Die Gewebestücke waren mit Formalin fixiert und ausschließlich maschinell in Paraffinblöcke eingebettet worden. Die Paraffinblöcke wurden bei RT gelagert.

Von 8 verschiedenen Proben und einer Kontrollprobe wurden Paraffinschnitte hergestellt. Dabei handelte es sich um P15, P18, P25, P26, P17, P19, P27, P34 und die Kontrolle K4 (Tab.1.).

Die Paraffinblöcke wurden bei -20°C, für das Schneiden am Microtom RM 2255 vorgekühlt. Das Microtom besaß einen Kühl-Blöckchenhalter, so dass der Gewebblock während dem Schneiden gekühlt wurde. Die Schnittdicke der Paraffinschnitte betrug 6µm. Die Schnitte wurden in einem Wasserbad, gefüllt mit Millipore, bei 40-45°C gestreckt und auf Poly-L-LysinTm beschichtete Objektträger (von Thermo Scientific Menzel Gläser) aufgezogen und getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht oder für 3 Stunden in einem Brutschrank bei 60°C gebacken, um sie auf dem Objektträger zu fixieren. Die Lagerung der Schnitte fand bei RT statt.

Da das Gewebe für die Antikörper auf den Paraffinschnitten durch den Wachsfilm nicht zugänglich wäre, mussten die Schnitte entparaffinisiert werden. Das Paraffin wurde mittels Xylolersatz (Roticlear[®] von Carl Roth GmbH und CoKG) entfernt, indem die Objektträger 2mal für jeweils 10min in Roticlear[®] eingetaucht wurden. Anschließend wurde das Xylol mit einer absteigenden Ethanolreihe aus dem Gewebe entfernt. Die Schnitte wurden 2mal für 5min in 100% Ethanol, 1mal für 5min in 96% Ethanol, 1mal für 5min in 80% Ethanol, 1mal für 5min in 70% Ethanol gegeben und anschließend für 5min in Millipore gewaschen.

Als nächster Schritt wurden die Schnitte demaskiert, um die Bindungen, die im Gewebe durch die Formalinfixierung entstanden sind, zu spalten. Anderenfalls würden Epitope von den Antikörpern nicht erreicht werden.

Die Schnitte wurden im vorgewärmten Citratpuffer mit pH 6 (10mM Tri-Natrium-Dihydrat mit 10N HCL auf pH6 eingestellt und bei 4-8°C gelagert) für 3mal 5min bei 600 Watt in der Mikrowelle gekocht und anschließend für 20 Minuten auf RT abgekühlt. Dann wurden die demaskierten Schnitte kurz in PBS-T (PBS mit 0,3% Triton-X) gespült, die Schnitte mit dem Wachstift (DAKO) voneinander abgegrenzt und in die Blockierlösung (5% NGS in 1%BSA/GB) gegeben. Die

anschließende Färbung mit Primär- und Sekundärantikörpern und das Einbetten der Präparate wurde genau wie bei den Kryoschnitten durchgeführt.

2.3.3. Fluoreszierende Reagenzien und Antikörper für die Immunfluoreszenz

Neben den zwei mit Fluorochromen gekoppelten sekundären Antikörpern, die gegen die ersten spezifischen monoklonalen Antikörper von Maus und polyklonalen Antikörper vom Kaninchen gerichtet waren, wurden zwei fluoreszente Substanzen verwendet, die spezifisch mit einer zellulären Organelle reagierten. Dabei handelte es sich um DAPI von Sigma (1mg/ml; Verdünnung 1:100), für die Kernfärbung da es an eine reiche A-T Region der DNA bindet, und Alexa Fluor® 633- Phalloidin von Invitrogen (Verdünnung 1:50), das Gift von *Amanita phalloides*/ ein *Phallotoxin* welches spezifisch an das filamentöse Aktin (F-Aktin) bindet und da es mit einem Fluorochrom gekoppelt ist am Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden kann. Das Alexa 633- Phalloidin ergibt ein dunkelrotes Signal (Anregung/Emission: 632/647 nm), DAPI ein blaues Signal (Anregung/Emission 359/461 nm), der fluoreszente Cy3-G a M Sekundärantikörper von Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (anti IgG H+L) (Verdünnung 1:500) ein rotes (Anregung/Emission 550/570 nm) und der Cy2-G a R Sekundärantikörper von Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (Verdünnung 1:100) ein grünes Signal (Anregung/Emission 492/510 nm) am Konfokalen Mikroskop.

Die Kryoschnitte aus dem linken Ventrikelmyokard der 9 Monate alten Mausmännchen (WT, MLP/-) wurden mittels einer dreifachen Immunfluoreszenzfärbung für die Analyse am konfokalen Mikroskop angefärbt. Neben den zwei mit Fluorochromen gekoppelten sekundären Antikörpern, die gegen die ersten spezifischen monoklonalen Antikörper von Maus und polyklonalen Antikörper vom Kaninchen gerichtet waren, wurde zusätzlich nur eine Kernfärbung mittels DAPI von Sigma (Verdünnung 1:100) durchgeführt. Es wurden die gleichen Primär- und Sekundärantikörper wie bei den humanen Proben verwendet.

Folgende die verschiedenen Komponenten des Sarkomers erkennende monoklonale Maus Primärantikörper wurden verwendet: gegen Myomesin (B4 Klon, im Labor produzierter Hybridomüberstand Grove et al., 1984; Verdünnung 1:5), welcher der die M-Bande anfärbt; gegen sarkomeres α -Aktinin (EA53 Klon, von Sigma; Verdünnung 1:500), der die Z-Scheiben anfärbt; gegen Titin T12 (im Labor produzierter Hybridomüberstand, Fürst et al., 1988; Verdünnung 1:5), der den N-Terminus von Titin, d.h. die Z-Scheiben anfärbt und gegen Desmin (D33 Klon, von DAKO, Verdünnung 1:200), der die Intermediären Filamente anfärbt.

Folgende polyklonale Kaninchen Primärantikörper wurden gegen Proteine des Sarkomers verwendet: gegen das sarkomere α -Aktinin (RbaA653, Gehmlich et al., 2004; Verdünnung 1:200), der die Z-Scheiben anfärbt; gegen das MyBP-C (produziert im Labor von Prof M. Gautel; Gautel et al., 1998; Verdünnung 1:50), der die A-Bande anfärbt und gegen das Titin m8 (produziert im Labor von Prof M. Gautel; Obermann et al., 1996; Verdünnung 1:50), der den C-Terminus von Titin, d.h. die M-Bande anfärbt.

Für die Darstellung der Interkalierenden Scheiben wurden polyklonale Kaninchen Primärantikörper gegen das β -Catenin (von Sigma, C2206; Verdünnung 1:250), der die Adherens Junctions anfärbt; gegen Connexin-43 (von Zymed; Verdünnung 1:50), wodurch die Gap Junctions sichtbar werden und gegen das N-RAP (produziert im Labor von Dr. E. Ehler; Verdünnung 1:100), ein mit den Interkalierenden Scheiben assoziiertes LIM Domänenprotein, verwendet.

Tab.2. Überblick über die verwendeten primären und sekundären Antikörper bei der Immunofluoreszenz Färbung der Gewebeschnitte für die Konfokale Mikroskopie.

Immunfluoreszenz von Gewebeschnitten			
<i>Primärantikörper</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Beschreibung</i>
pR a sark. alpha-Aktinin	RbaA653; Gehmlich et al., 2004	1 zu 200	Z-Scheiben
pR a Connexin 43	Abcam	1 zu 100	GJ
pR a Connexin 43	Zymed	1 zu 50	GJ
pR a beta-Catenin	Sigma, Cat#C2206	1 zu 250	AJ
pR a MyBP panC	Gautel et al., 1998	1 zu 50	A-Bande
pR a Titin m8	Obermann et al., 1996	1 zu 50	C-Terminus von Titin, d.h. M-Bande
pR a N-RAP	Produziert im Labor Dr. E. Ehler	1 zu 100	IDs assoziiertes Protein
mM a Desmin	DAKO, clone D33	1 zu 200	Intermediäre Filamente
mM a sark. alpha-Aktinin	Sigma, clone EA53, Cat#A7811	1 zu 500	Z-Scheiben
mM a Myomesin B4	Grove et al., 1984	1 zu 5	M-Bande
mM a Titin T12	Fürst et al., 1988	1 zu 5	N-Terminus von Titin, d.h. Z-Scheiben
<i>Sekundärantikörper</i>			
Cy3-G a M	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. 115-165-146 Ig (H+L)	1 zu 500	
Cy2-G a R	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. 11-225-144 Ig	1 zu 100	
DAPI	Sigma	1 zu 100	
Alexa 633-Phalloidin	Invitrogen, Cat# A22284	1 zu 50	

Weiters wurden immer Negativkontrollen durchgeführt, indem der Schnitt anstatt mit der primären Antikörperlösung lediglich mit 1%BSA/GB inkubiert wurde.

Die Paraffinschnitte wurden mit einer vierfachen Immunofluoreszenz-Färbung angefärbt. Als monoklonaler Antikörper wurde nur mM a Desmin (D33, von Dako; Verdünnung 1:200) verwendet, da bekannt ist, dass die anderen bei der Färbung der Kryoschnitte verwendeten monoklonalen Antikörper auf Wachsschnitten nicht funktionieren. Folgende polyklonale Antikörper wurden verwendet: pR a MyBP-C (produziert im Labor von Prof. M. Gautel; Gautel et al., 1998; Verdünnung 1:100), ein A-Banden Protein; pR a β -catenin von Sigma (Verdünnung 1:250), ein Protein welches in den Adherens Junctions zu finden ist; pR a connexin-43 von Zymed (Verdünnung 1:50) und connexin-43 von Abcam (Verdünnung 1:100), ein Protein der Gap Junctions und pR a N-RAP (produziert im Labor von Dr. E. Ehler), ein LIM Domänen Protein welches mit den Interkalierenden Scheiben assoziiert ist. Als Sekundärantikörper wurden Cy3-G a M (Verdünnung 1: 500) und Cy2-G a R (Verdünnung 1: 100) gegen die Primärantikörper (beide von Jackson ImmunoResearch Laboratories

Inc.), für die Kernfärbung DAPI (Verdünnung 1:100) von Sigma und für die Färbung von F-Aktin Alexa Fluor 633-Phalloidin (Verdünnung 1:50) von Invitrogen verwendet.

Es wurden von jeder Färbung Negativkontrollen durchgeführt indem anstatt mit der primären Antikörperlösung nur mit der Antikörperverdünnungslösung (1%BSA/GB) inkubiert wurde.

Alle verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 2 aufgelistet.

2.3.4. Konfokale Mikroskopie und Bildbearbeitung

Die Analyse der immungefärbten Gewebeschnitte wurde an einem Zeiss LSM 510 META Konfokalen Mikroskop durchgeführt. Für die Aufnahmen wurde ein 63x/NA 1.4 Öl-Immersionsobjektiv mit einem 2fach digitalen Zoom und zum Teil für Übersichtsaufnahmen mit einem 1fach digitalen Zoom verwendet. Das Mikroskop war mit einem Blue Diode (405 nm) Laser und mit Argon (488 nm) und Helium Neon Lasern (546 nm, 633 nm) ausgestattet. Die Aufnahmen die am konfokalen Mikroskop gemacht wurden, wurden in Falschfarben im Tiff Dateiformat abgespeichert. Die einzelnen Kanäle einer Aufnahme wurden mittels *ImageJ 1.41k* im RGB-Modus zusammengefasst und die restliche Bildbearbeitung sowie das Zusammenstellen der Figuren wurde mit *Photoshop CS4 11.0* durchgeführt.

Die Ergebnisse der konfokalen Mikroskopie bestimmten weitgehend die Richtung der weiteren Analyse durch Immunoblots.

2.4. Immunoblots

Alle verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 3 aufgelistet.

2.4.1. Herstellung von SDS-Proben aus Gewebestücken für die SDS-PAGE

Ganze Gewebeproben wurden, nachdem sie direkt aus dem flüssigen Stickstoff entnommen wurden, mit einem in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Metallmörser mechanisch in feinen Staub zerschlagen. Das gefrorene Pulver wurde anschließend durch Zugabe vom zelllyisierendem Puffer (Blue Wonder; 300µl pro mm³), der zugleich das für die Proteinvorbereitung notwendige SDS enthielt, in die Pipettenspitze aufgenommen und in ein Eppendorfgefäß (auf Eis) transferiert. Danach wurden die Proben für genau 2min gekocht, gleich wieder auf Eis gekühlt und bei -20°C gelagert.

Das Blue Wonder setzt sich in seiner endgültigen Konzentration aus folgenden Inhaltsstoffen zusammen: 3,7M Harnstoff, 134,6mM Tris Base von pH 6,8; 2,3% NP-40; 4,45% β-Mercaptoethanol; 4% Glycerin und 6 mg/100ml Bromphenolblau. Es wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.4.2. SDS-PAGE

Zunächst wurden die SDS-Proteingemische mittels Elektrophorese auf einem 7,5%igen Polyacrylamid Minigel (von Bio-Rad Laboratories) nach Molekulargewicht aufgetrennt, um die richtige Lademenge der Proben für die Immunoblots zu bestimmen.

Das 7,5%ige Polyacrylamid Minigel (Separationsgel) setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: 4,85ml Millipore; 2,5ml Lower Buffer (aus 1,5M Tris Base mit pH 8,8 und 0,4% SDS); 1,7ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid; 50µl 10% APS, als Polymerisationsinitiator und 5µl TEMED, als Polymerisationskatalysator. Es wurde für eine Stunde zum Auspolymerisieren bei RT stehen gelassen, worauf dann das Ladegel, mit den Ladekämmen, gegossen wurde.

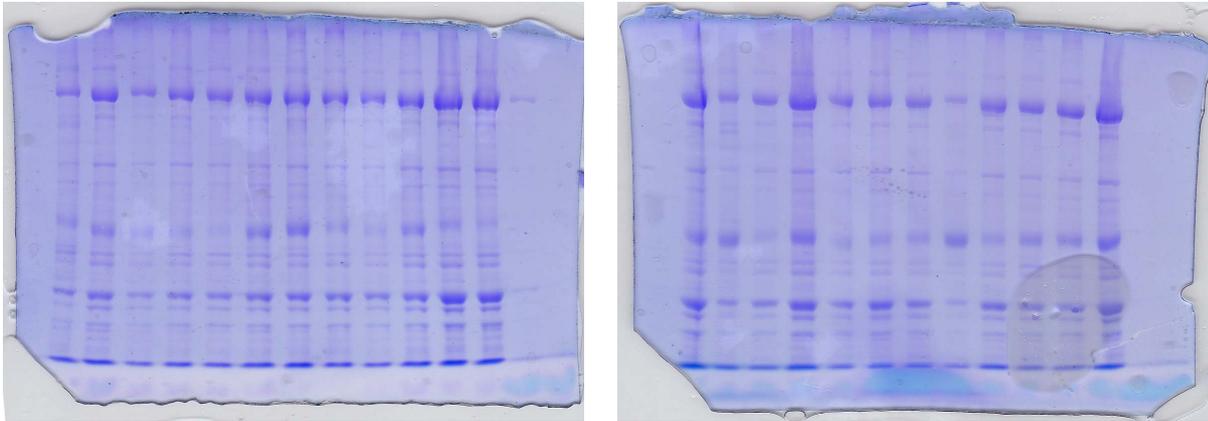


Abb. 1. Mittels Coomassie angefärbte 7,5% Testgele. Die Proteinbanden der SDS-Proben sind schön sichtbar. Die Proteine wurden nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Lademenge ist sehr unterschiedlich.

Das Ladegel wurde aus 1068µl Millipore, 1200µl Upper Buffer (0,5M Tris Base mit 1nHCL auf pH 6,8), 333µl 30% Acrylamid/Bisacrylamid, 25µl 10% SDS, 19µl 10%APS und 4µl TEMED, hergestellt. Nach ca. 20 min wurden die Kämme entfernt und die Proben wurden mithilfe einer Hamilton Spritze geladen. Für den Testlauf wurden 1µl von jeder SDS-Probe und 5µl Blue Wonder als Negativkontrolle in das Ladegel geladen.

Die Gelelektrophorese wurde in 1x SDS-PAGE Puffer (aus 10facher Stammlösung, bestehend aus 30g Tris, 144g Glycine und 10g SDS, auf 1L, pH 8,3) zunächst bei 120V und als das Proteingemisch im Separationsgel drinnen war, bei 200V durchgeführt.

Das Testgel wurde anschließend mit der Coomassie Schnellfärbung gefärbt (Abb.1.). Dazu wurde die Coomassie Färbelösung (bestehend aus 50%Methanol, 10%Essigsäure und 0,2% Coomassie Brilliant Blue R-250 von Biomedicals; zum Schluss filtriert) vorher zum Kochen gebracht und anschließend das Testgel (dessen Laderichtung vorher markiert wurde) für ungefähr 5min in der heißen Coomassie Färbelösung am Schüttler inkubiert. Die Coomassie Färbelösung wurde wiederverwendet. Um überschüssiges Coomassie vom Gel zu entfernen, wurde dieses in Millipore gewaschen und anschließend in, zuvor zum Kochen gebrachte, 10% Essigsäure gelegt und auf den Schüttler gestellt. Die Essigsäure wurde wieder recycled, indem sie mit Aktivkohle inkubiert wurde, die das Coomassie absorbierte.

Nachdem die optimale Lademenge der einzelnen Proteingemische bestimmt wurde, konnte die eigentliche SDS-PAGE für den Immunoblot durchgeführt werden.

Für Proteine zwischen 10 und 150kDa Molekulargewicht wurde ein 12%iges (aus 3,35 ml Millipore, 2,5ml Lower Buffer, 4 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid, 50µl 10% APS und 5µl TEMED) und für Proteine zwischen 45 und 300kDa ein 7,5%iges Polyacrylamid Minigel gegossen. Weiters wurden 8 bis 22%ige und 4 bis 11%ige Polyacrylamid-Gradient-Minigele gegossen um einen breiteren Bereich abzudecken.

Für die Herstellung des 8 bis 22% Gradientengels wurden die Lösungen für ein 22% (aus 0,5% Lower Buffer als Separationspuffer; 1,45 ml 30%iges Acrylamid/Bisacrylamid; 0,12ml Glycerin und zum Schluss 8µl APS und 1µl TEMED) und ein 8% Gel (0,5% Lower Buffer; 0,53ml 30%iges Acrylamid/Bisacrylamid; 0,97ml Millipore H₂O, 8µl APS und 1µl TEMED) separat gemischt. Anschließend wurde das Gradientengel durch langsames Vermischen der beiden Lösungen mittels einer peristaltischen Pumpe und einem Gradientenmischer hergestellt.

Das 4 bis 11% Gradientengel wurde aus einer 4%igen Polyacrylamid Gemischung, mit 0,5ml Lower Buffer; 0,26 30%iges Acrylamid/Bisacrylamid; 1,23ml Millipore H₂O; 8µl APS; 1µl TEMED und einer 11%igen Polyacrylamid Gemischung, mit 0,5ml Lower Buffer; 0,73 30%iges Acrylamid/Bisacrylamid; 0,12ml 100%iges Glycerin; 0,64ml Millipore H₂O; 8µl APS; 1µl TEMED genau wie oben beschrieben gegossen.

Die SDS-Proben wurden gemeinsam mit einem Molekulargewichtsmarker (von ProSieve® Color Protein Marker, Katalog Nr. 50550) und Blue Wonder als Negativkontrolle, in die Kammern des Ladegels geladen und zuerst bei 120V laufen gelassen. Als die Proteinlauffront im Separationsgel drinnen war wurde auf 200V geschaltet.

Nach der Gelelektrophorese wurde ein Semidry Blot oder ein Western Blot mit anschließender immunologischer Proteindetektion durchgeführt.

2.4.3. Western-Blot

Ein senkrecht zum Polyacrylamid Minigel gerichtetes elektrisches Feld wurde beim Western Blot angelegt, wodurch die Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulose (von Hybond C Extra) übertragen wurden. Die Nitrozellulose und das darauf liegende Gel, wurden dabei von beiden Seiten in Schwämmchen und Whatman3MM-Filterpapier eingebettet und in die Kammer gelegt. Der Western Blot wurde, über Nacht bei 60mA (20-30V), in einem Behälter mit Blotting Buffer, geblottet. Der Blotting Buffer wurde, für 1L, aus 3,03g Tris-Base; 14,4g Glycine; 0,1g SDS und 200ml Methanol, zusammengerührt und mehrmals wiederverwendet.

Um herauszufinden ob der Blot funktioniert hat und ob die Lademengen nun annähernd gleich waren, wurde die Nitrozellulose mit Ponceaurot (von Sigma) angefärbt, indem sie in die Färbelösung hineingelegt wurde. Anschließend wurde die Nitrozellulose, auf der nun die Proteinbanden und der Molekulargewichtsmarker zu erkennen waren, in eine saubere Klarsichtfolie eingebettet und für die Dokumentation gescannt.

Anschließend wurde für 1h bei RT mit 5%Milch/LS (Sainsbury's Trockenmilchpulver in Low Salt gelöst, Low salt besteht aus 9ml 1M Tris-Base mit pH 7,4, 9g NaCl und 5ml 20%ige Tween20, für

1L) geblockt, damit die freien unspezifischen Bindungsstellen an der Membran abgesättigt werden und gleichzeitig das PonceauRed ausgewaschen wird. Wurde jedoch ein immunologischer Nachweis von Proteinen wie Connexin-43, welche phosphorylierte Epitope besitzen, durchgeführt, wurde für das Blocken 3%BSA in LS verwendet und die Primärantikörper mit 0,1%BSA verdünnt.

Danach wurde der Blot mit den Primärantikörpern, gelöst in 0,5%Milch/LS, für 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Bei Nachweis von Proteinen mit phosphorylierten Epitopen wurden die Antikörper in 0,1%BSA gelöst. Die verschiedenen beim Immunoblotten verwendeten Antikörper sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tab.3. Überblick über die verwendeten primären und sekundären Antikörper bei den Immunoblots

Immunoblotting		
<i>Primärantikörper</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verdünnung</i>
pR a humanes EH-Myomesin	Produziert im Labor Dr. Ehler E.; Agarkova et al., 2000	1 zu 1000
pR a beta-Catenin	SIGMA, Cat#C2206	1 zu 6000
pR a Sark. alpha-Aktinin	RbaA653; Gehmlich et al., 2004	1 zu 500
pR a Connexin 43	Zymed	1 zu 500
pR a ANF	Anawa Swiss, Cat#AS618	1 zu 500
pR a N-RAP	Produziert im Labor Dr. Ehler E.	1 zu 500
pR a Connexin 43	Abcam	1 zu 2000
pR a all Aktin	Sigma, Cat#A2066	1 zu 500
pR a Desmoplakin	Serotec	1 zu 1000
mM a Plakoglobin	BD, Cat#610253	1 zu 1000
mM a kardiales Aktin	Progen, clone Ac1-20.4.2, Cat#61075	1 zu 2000
mM a Vinculin	Sigma, clone hVin-1, Cat#V9131	1 zu 1000
mM a sarkomeres Myosin	Developmental Studies Hybridoma Bank Iowa, cloneA4.1025	1 zu 2000
mM a Desmin	Dako, clone D33	1 zu 2000
mM a MLP	Produziert im Labor Dr. Gehmlich K.; Geier et al., 2008	1 zu 1000
<i>Sekundärantikörper</i>		
HRP-G a R	CalBiochem, Cat#401315	1 zu 1000
HRP-R a M	Dako, Cat#P0260	1 zu 1000
HRP-R a G	CalBiochem	1 zu 1000

Danach wurde der Blot 3mal für 5min mit 0,5%Milch/LS (oder 0,1%BSA) gewaschen und anschließend der Blot mit dem enzymgekoppelten Sekundärantikörper, verdünnt in 0,5%Milch/LS, für 2 h bei RT inkubiert. Bei den Sekundärantikörpern handelte es sich um HRP-G a pR (von Calbiochem; Verdünnung 1:1000) und/oder HRP-R a mM (von Dako; Verdünnung 1:1000), gekoppelt mit einer Peroxidase, die die Chemilumineszenzreaktion beim Entwickeln des Blots katalysiert. Danach wurde 3mal für 5min in LS gewaschen und der Blot entwickelt.

Für 2 Blots wurde die Entwicklerlösung aus 7,5ml Millipore, 1ml Luminol Stammlösung, 1ml Jodophenol Stammlösung, mit 500µl 1M Tris-base mit pH 7,4 zum Schluss zusammengemischt. In der Dunkelkammer wurde die Entwicklerlösung durch 5µl Wasserstoffperoxid aktiviert, der Blot für 1

min darin geschwenkt, in Frischhaltefolie eingewickelt und in eine Filmkammer hineingegeben. Der Röntgenfilm wurde dann mit unterschiedlichen Belichtungszeiten je nach Signalstärke der Blots entwickelt.

Für die Herstellung der Luminol Stammlösung wurde 0,5g Luminol sodium Salt (von Sigma) in 50ml Millipore gelöst und aliquotiert. Für die Iodophelol Stammlösung wurden 0,055g 4-Iodophenol (von Fluka chem.) in DMSO gelöst und aliquotiert. Die Aliquote wurden bei -20°C aufbewahrt.

Gelegentlich wurde eine Amplifizierung des Signals mit einem tertiären Antikörper durchgeführt. Dazu wurden die entwickelten Blots kurz in LS gewaschen und danach im entsprechenden Tertiärantikörper (bei Kaninchenprimärantikörpern HRP-R a G Igs, Calbiochem und bei Mausprimärantikörper HRP-G a R Igs, Calbiochem) für 1-2h inkubiert. Die Entwicklung der Chemiluminiszenz wurde genau wie oben beschrieben durchgeführt.

2.4.4. Semidry Blot

Es wurde ein Semidry Blot mit einem 12% Gel (Immunoblot Analyse von MLP) und einem 4 bis 11% Gradientengel (Immunoblot Analyse von humanen EH-Myomesin) durchgeführt.

Es wurde ebenfalls wie beim Blotten senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung ein elektrisches Feld angelegt und die Proteine auf eine NC Transferiert. Das Gel wurde auf eine Nitrocellulose (von Hybond C Extra) draufgelegt und beide wurden von, jeweils 3 Schichten Whatmann3MM-Filterpapier eingerahmt.

Der Blot wurde bei 17V (max 400mA) und für ungefähr 1,5h laufengelassen.

Die immunologische Detektion der gewünschten Proteine und die Entwicklung der Blots erfolgte nach der gleichen, bereits im Kapitel 2.4.3., beschriebenen Methode.

2.4.5. Immunoblots Analyse und Statistik

Die Analyse der Immunoblots erfolgte mit *ImageJ 1.41k*, einem open source Programm, indem die Bandengröße dreimal vermessen wurde. Die Mittelwerte der Proteinbanden von Interesse wurden auf eine Ladungskontrolle (z.B. gesamtes Aktin, α -Aktinin, kardiales Aktin oder sarkomeres MHC) genormt und im *Microsoft Excel* in Balkendiagrammen in *Arbitrary Units* (willkürlichen Einheiten) dargestellt. Dabei wurden die Mittelwerte der vermessenen Banden der Ladungskontrolle z.B. x20000 multipliziert, die des Proteins von Interesse z.B. x10000 und die Prozente berechnet. Damit beide Gele eines Blots untereinander verglichen werden konnten wurden für die Messungen immer gleiche optimale Belichtungszeiten für das jeweilige Protein verwendet.

Die statistische Analyse wurde mit *SPSS* für Windows, Version 15.0 durchgeführt. Die mittels *ImageJ* ausgemessenen Mittelwerte der Bandengrößen eines bestimmten Proteins bei Patienten im Endstadium des Herzversagens (mit einer LVEf von $\leq 25\%$), und Kontrollen unbekannter Herkunft, wurden mithilfe einer Univariaten Varianzanalyse (one-way ANOVA) gegen die Kontrolle getestet und innerhalb der verschiedenen Erkrankungen (FDCM, PDCM, DCM *st.p.* MK, iDCM und einer iCMP). Ergab die ANOVA einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p \leq 0,05$) wurden

anschließend mit *Post-hoc Tests* Mehrfachvergleiche durchgeführt. Bei Varianzhomogenität wurde ein *Scheffé-Test* und herrschte keine Varianzhomogenität wurde ein *Dunnett-T3-Test* durchgeführt.

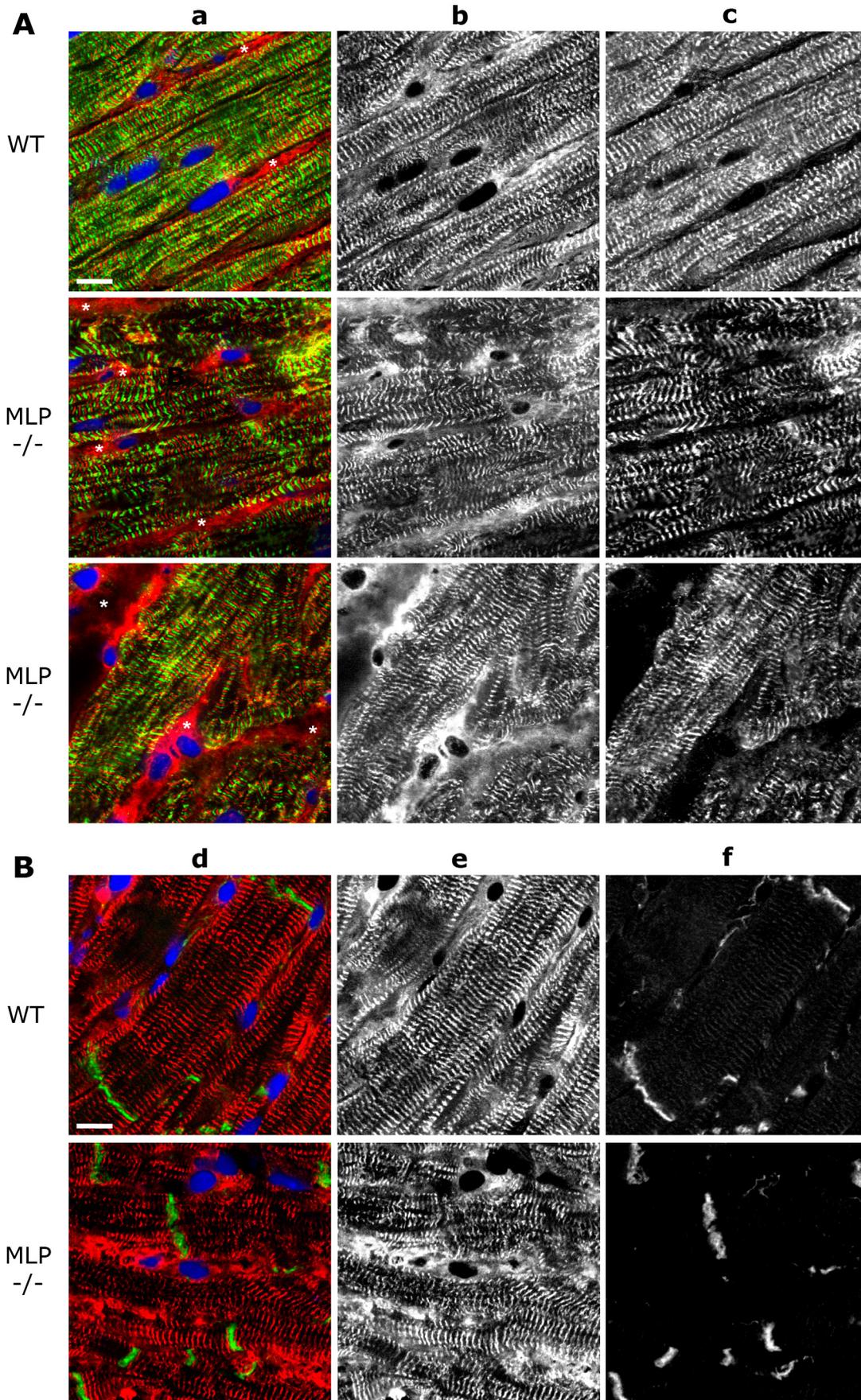
3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der morphologischen Veränderungen der linksventrikulären Kardiomyozyten bei der MLP Knockout Maus, einem transgenen Tiermodell für die Dilatative Kardiomyopathie

Kryoschnitte aus dem linken Ventrikel von MLP Knockoutmaus und WT Maus wurden gegen Proteine des Sarkomers (wie das Z-Scheiben Protein α -Aktinin und das M-Banden Protein Myomesin), Proteine der Interkalierenden Scheiben (das AJ Protein β -Catenin, die Hauptkomponente der ventrikulären GJ das Connexin43 und das N-RAP), als auch gegen das Intermediärfilament Protein Desmin angefärbt. Da die Krankheit in den Proben bereits sehr weit fortgeschritten war und das Alter der meisten Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation überwiegend über 40 Jahre lag, wurde zum Vergleich das linke Ventrikelmyokard von 9 Monate alten Mausmännchen, bei denen der DCM Phänotyp maximal etabliert ist, herangezogen.

In allen mittels Immunfluoreszenz (IF) angefärbten Kryoschnitten ist eine irregulärere Anordnung der Myofibrillen bei MLP $-/-$ im Vergleich zu dessen WT deutlich erkennbar (Abb. 2). Die Form der Zellen ist unregelmäßiger und oftmals sind mehr und kleinere polare Zell-Zell Kontakte, aufgrund atypischer Verzweigungen der Zellen, erkennbar (Abb. 2 B).

Stark desorganisierte Stellen, an denen die ventrikulären Kardiomyozyten die parallele Ausrichtung verloren haben kamen weder bei der 9 Monate alten MLP $-/-$ Maus noch dessen Wildtyp vor. Die Zellen liegen grundsätzlich dicht aneinander und Fibrose scheint in den meisten Arealen von MLP $-/-$ nur sehr schwach und bei dessen WT gar nicht ausgeprägt zu sein. Ein auf zellulärer Ebene ausgebildetes „Spongy Heart“ ist bei MLP $-/-$ auch nicht vorzufinden.



←Abb. 2. Dreifach Immunfluoreszenz-markierte Kryoschnitte aus dem LV von 9 Monate alten Mausmännchen. (A) IF Färbung mit mM gegen das Myomesin (B4clone) für die Darstellung der M-Banden (a rot, b), pR gegen das α -Aktinin für die Darstellung der Z-Scheiben (a grün, c) und Kernfärbung durch DAPI (a blau). (B) IF Färbung mit mM gegen das M-Banden Protein Myomesin (B4 clone) (d rot, e), pR gegen das AJ Protein β -Catenin (d grün, f) und mittels DAPI (d blau). Beim WT erkennt man sehr schöne, d.h. elongierte parallel angeordnete Kardiomyozyten mit kaum ausgebildeter Fibrose (*). Bei MLP -/- ist die Fibrose etwas stärker ausgeprägt und die Zellen haben im Vergleich zum WTP eine unregelmäßigere Form, mit unregelmäßiger ausgerichteten Myofibrillen. Bei der MLP -/- Maus sind innerhalb einer Aufnahme aufgrund einer unregelmäßigeren Zellform mehr kleinere IDs an atypischen dünnen Verzweigungen der Myozyten sichtbar. In (A, a, b) stammt das unspezifische rote Signal zwischen den Zellen von dem gegen Maus gerichteten Sekundärintikörper. Skala 10 μ m.

3.1.1. Negativkontrollen der Gewebeschnitte von MLP Knockoutmaus und WT Maus für die Immunfluoreszenz

In den Negativkontrollen von Kryoschnitten von 9 Monate alten Mausmännchen (WT und MLP Knockoutmaus) war eine ausgeprägte unspezifische Hintergrundfärbung des Cy3-G gegen Maus gerichteten Sekundärintikörper zu erkennen (Abb. 3). Das Signal war besonders stark zwischen den Myozyten und war prominenter in den MLP Knockoutmäusen. Es dürfte sich dabei um ein bekanntes Problem handeln, nämlich, dass Mäuseantikörper auf Mausgewebe oft unspezifisch in der ECM kleben bleiben. Da das MLP Knockout Herz aufgrund seiner Fibrose mehr ECM aufweist, ist das Hintergrundsignal dort stärker. Eine schwächere generell diffuse Hintergrundfärbung war im grünen Kanal zu erkennen (Cy2-G gegen Kaninchen gerichteter Sekundärintikörper). Die Kernfärbung gegen DAPI zeigte keine unspezifische Reaktion.

3.2. Charakterisierung der morphologischen Veränderungen im ventrikulären Myozytengewebe infolge einer Herzerkrankung

3.2.1. Charakterisierung von morphologischen Eigenschaften des ventrikulären humanen Spendergewebes bezüglich Myozytenform und Anordnung

Die Gewebeproben des linken Ventrikelmyokards (aus Apexnähe) der beiden Kontrollen K2 und K4 entstammen aus gesunden Herzen, die für eine Transplantation bestimmt waren. Jedoch wurden diese aus unbekanntem, wahrscheinlich technischen, Gründen nicht transplantiert. Über die Herkunft dieser Proben ist wenig bekannt, außer dass K2 männlich und 35 Jahre alt war. Von K4 konnten sowohl Kryo- als auch Paraffinschnitte hergestellt werden, von K2 lediglich Kryoschnitte.

Innerhalb der Kryoschnitte beider Kontrollen weisen die Kardiomyozyten manchmal eine unregelmäßige Gestalt auf, mit kleinen Verzweigungen, d.h. auch kleineren polaren IDs und deutlich dünneren Zellen. Selten waren aber auch desorganisierte Stellen zu beobachten (Abb. 4 und 5). Eine interstitielle Fibrose, angedeutet durch die ungefärbten schwarzen Bereiche zwischen den Herzzellen, ist auch in den Schnitten erkennbar. Schönere „gesunde“ Areale mit parallel angeordneten

regelmäßigeren Myozyten und schönen Myofibrillen sind allerdings, v.a. bei der Kontrolle K4, häufig zu finden. Desorganisierte Stellen mit unregelmäßigerer Zellgestalt und ungeordneter Anordnung der Myofibrillen, Eigenschaften die in der Literatur unter dem Begriff *Myocyte Disarray* beschrieben werden, sind bei K2 häufiger zu beobachten.

Beide Kontrollproben entstammen einem nicht transplantierten Spendergewebe. In den überwiegenden Fällen stehen meistens technische Gründe für eine Nichtverwendung im Vordergrund, wobei bei K2 eine Hypertonie und eine leichte linksventrikuläre Hypertrophie bei normaler linksventrikulärer Funktion vermerkt wurden.

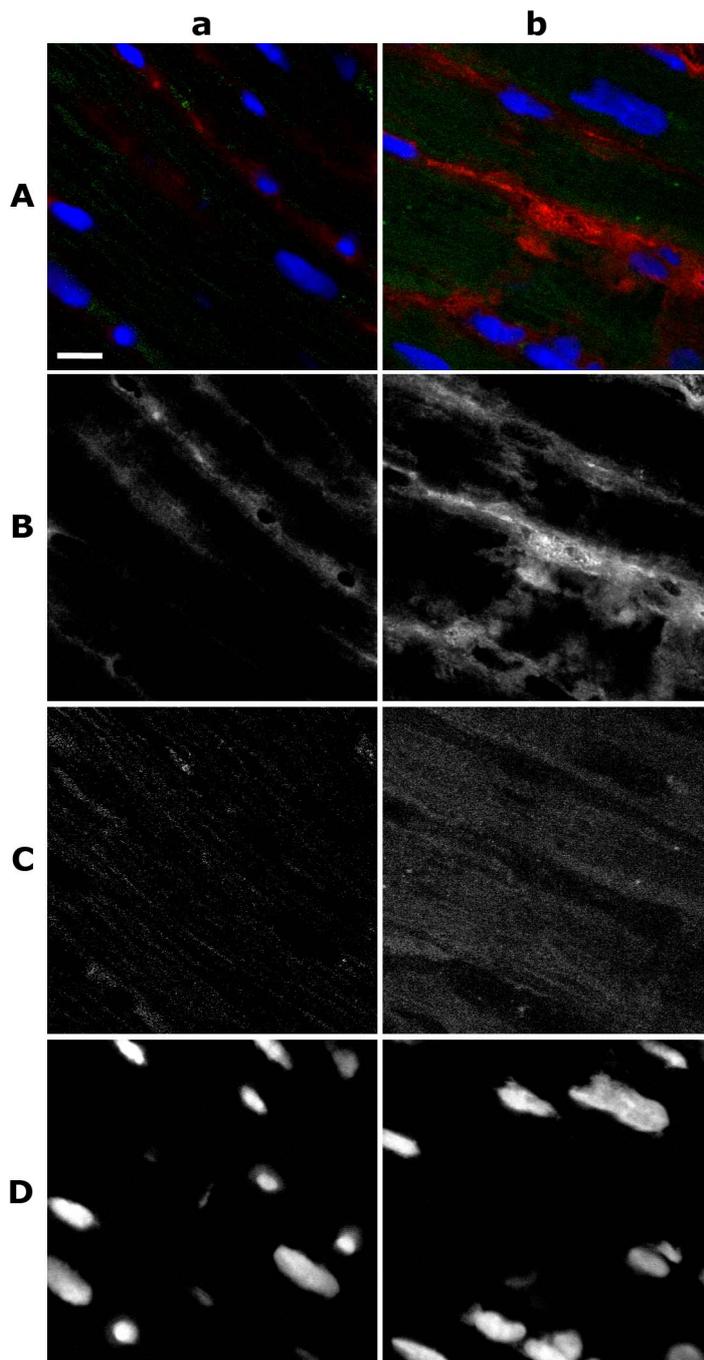


Abb. 3. Negativkontrolle der dreifach immunfluoreszent gefärbten Kryoschnitte aus dem LV von 9 Monaten alten Mausmännchen, die mit einer Kombination aus zwei Antikörpern und DAPI angefärbt wurden. In (A) ist die Kombination aus den Signalen der Sekundärantikörper Cy3-Goat gegen Maus in rot und Cy2-Goat gegen Kaninchen in grün, sowie die Kernfärbung durch DAPI in blau sichtbar. Die Signale von (B) Cy3-G a M, (C) Cy2-G a R und (D) DAPI sind zusätzlich getrennt dargestellt. Die Proben stammen aus dem LV von (a) WTP Maus und (b) MLP Knockout Maus. Skala 10µm

Bei beiden Kontrollen ist das häufige Auftreten von scheinbar verdoppelten IDs auffallend (Abb 5a, Abb. 16 A, Abb. 26, Abb. 33 A). Dabei handelt es sich um extreme Verzahnungen der Kardiomyozyten im Gewebe, bei denen sich zwischen zwei Kardiomyozyten eine Myozyte fast senkrecht hindurchzuerstrecken scheint und dabei den Eindruck von doppelten Discs ergibt.

Das Auffälligste im ventrikulären Myokardgewebe der Kontrolle K4 ist die besonders hohe Anzahl an IDs, sowie ein Auftreten von zum Teil sehr dünnen stark verzweigten Zellen, was besonders gut in den Paraffinschnitten zu erkennen ist (Abb. 5b und 30 A). Nachdem im Gewebe auch kaum LFG innerhalb der Zellen zu finden sind, z.B. auch weniger als bei K2 (35a), handelt es sich wahrscheinlich um einen jüngeren Patienten. Vom nichttransplantierten Spendergewebe standen leider keine Proben aus dem rechten Ventrikel zur Verfügung. Bei den meisten Kardiomyopathien finden die gravierendsten Umbauprozesse der Kardiomyozyten im linksventrikulären Myokardgewebe statt, weshalb der Schwerpunkt der Analyse in dieser Arbeit auf den linken Ventrikel gelegt wurde. Eine Ausnahme bildet jedoch die Arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie, da bei dieser Kardiomyopathie die stärksten Umbauprozesse im rechten Ventrikelmyokard stattfinden.

Nachdem der LV von P46 (KHK, m., 68a), grundsätzlich eine sehr schöne gesunde Gewebequalität in den Kryoschnitten aufweist, die sogar oftmals auffällig besser erhalten ist als die von den eigentlichen Kontrollen und von diesem Patienten Gewebeproben aus dem rechten Ventrikelmyokard zur Verfügung standen, wurde diese Probe auch als Kontrolle für die ARVD herangezogen.

Der LV von P46 zeigt im Vergleich zu den Kontrollen häufig dichter anliegende, regelmäßiger geformte langgestreckte Herzmuskelzellen, die ein schönes quergestreiftes Muster mit annähernd parallel angeordneten Myofibrillen aufweisen (Abb. 4 und 5). Die Myozyten sind im Vergleich zu den oben beschriebenen Kontrollen auch nicht so atypisch stark verzweigt. Nur sehr selten waren desorganisierte Stellen im Gewebe zu finden, wenn dann handelte es sich meist um einen nicht optimal längs getroffenen Schnitt.

Der RV von P46 weist auch eine sehr schöne Gewebequalität auf, jedoch ist eine stärkere Fibrose ausgebildet und desorganisierte Areale mit unregelmäßigeren, nicht optimal parallel angeordneten Myozyten sind etwas öfter zu finden.

Bei P46 ist ein deutlicher Größenunterschied zwischen den Kardiomyozyten des linken und rechten Ventrikelmyokards auffällig. Die Myozyten des RV sind gehäuft deutlich größer als die des linken, folglich sind längere IDs, jedoch weniger pro Aufnahme vorhanden (Abb. 4). Dabei könnte es sich um krankheitsbedingt hypertrophierte Kardiomyozyten, oder um einen generellen Größenunterschied der Kardiomyozyten zwischen dem LV und RV handeln.

Bei einem direkten Vergleich der IF-gefärbten Kryoschnitte des linken und rechten Ventrikels von P46 fällt deutlich auf, dass das α -Aktinin Signal an den IDs und das β -Catenin Signal der AJ des RV deutlich breiter ausgebildet ist (Abb. 4 c, d und Abb. 5 c, d). Möglicherweise handelt es sich ebenfalls um einen generellen Unterschied zwischen dem LV und RV.

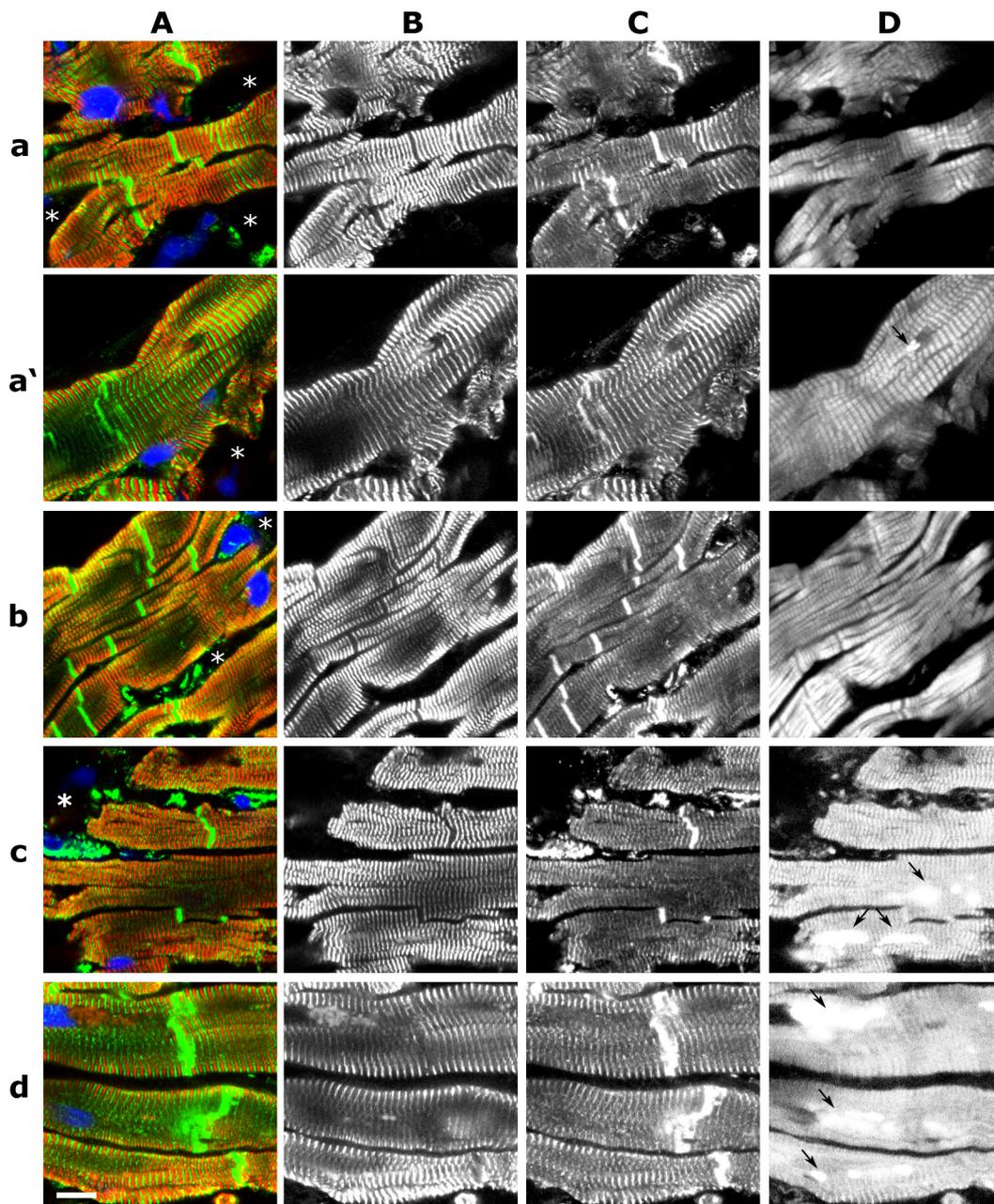


Abb. 4. Immunfluoreszenz markierte Kryoschnitte der Kontrollen. (A) Kombination aus mM gegen das Myomesin (B4 clone) in rot, pR gegen das α -Aktinin in grün und die Kernfärbung durch DAPI in Blau. Das Phalloidin Signal ist in (D) gesondert dargestellt. (B) Myomesin Signal, an den Banden, und (C) α -Aktinin Signal, an den Z-Scheiben und IDs, sind zusätzlich getrennt dargestellt. In den nicht durch kardiale Marker angefärbten Zwischenräumen der Myozyten sind Zellkerne enthalten, demnach handelt es sich nicht um Artefakte sondern um interstitielle Fibrose (*). Im LV der Kontrollen K2 (a, a') und K4 (b) sind die Myozyten zum Teil sehr dünn und weisen viele kleine Verzweigungen auf. Die Myofibrillen sind parallel angeordnet und weisen ein regelmäßiges quergestreiftes Muster auf. P46 hat im LV (c) und RV (d) oft sehr dicht aneinanderliegende regelmäßige Myozyten mit weniger Verzweigungen. Das α -Aktinin Signal ist an den IDs des RV breiter und die Myozyten sind auch größer. Bei K2 (35a) sind sehr wenig LFG, bei K4 keine und bei P46 (67a) sind altersentsprechend viele LFG an den Kernpolen zu finden. Die gebänderte Struktur der Aktinfilamente ist v.a. sehr schön an relaxierten Myozyten erkennbar (a'D). Skala 10 μ m

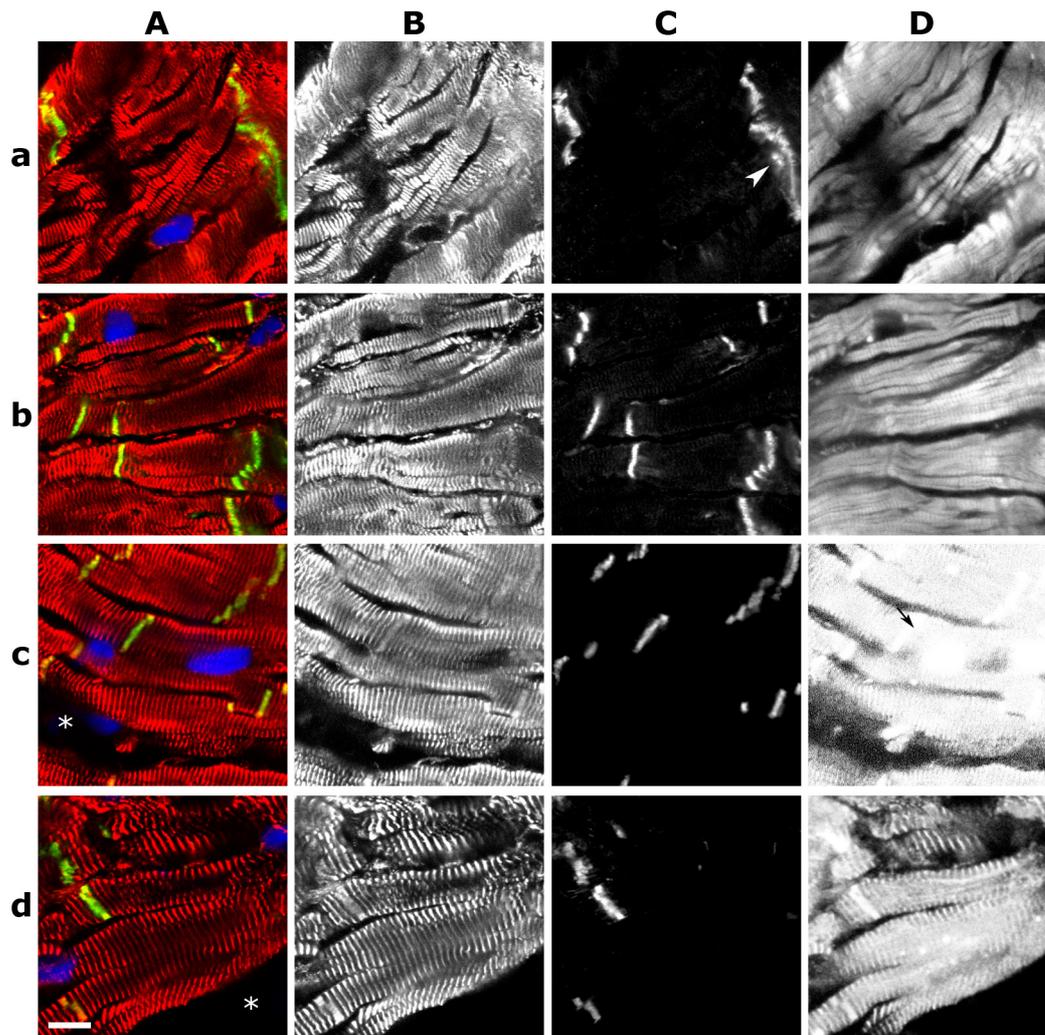


Abb. 5. Immunfluoreszenz markierte Kryoschnitte der Kontrollen. (A) Kombination aus mM gegen das α -Aktinin in rot, pR gegen β -Catenin in grün und Kernfärbung in Blau. Phalloidin Signal ist in (D) getrennt dargestellt. (B) das α -Aktinin Signal an den Z-Scheiben und IDs, sowie (C) das β -Catenin Signal an den AJ sind zusätzlich getrennt dargestellt. Die Myozyten beider Kontrollen (a) K2 und (b) K4 aus dem LV, wiesen oft eine unregelmäßige Gestalt, mit zum Teil spitz zulaufenden Zellen auf, die in einer nicht idealen parallelen Anordnung resultiert. Im Vergleich dazu waren (c) im LV von P46 (KHK) die Myozyten in ihrer Form oftmals weit regelmäßiger. Das β -Catenin Signal war an den AJ im LV von K2 überwiegend deutlich breiter als das von K4 und P46 und hatte eine stark gezackte Erscheinung, was auf eine stärker gewundene Plasmamembran hindeutet. Das β -Catenin Signal war im (d) RV von P46 breiter, die AJ ebenfalls unregelmäßiger, wie auch die Form und Anordnung der Myozyten. (*) Fibrose; (à) „doppelte“ AJ. Beim Phalloidin Signal ist eine starke unspezifische Hintergrundfärbung bei P46 (c, d) ausgebildet, welche durch ein Durchscheitern der anderen Fluorochrome verursacht wird, nachdem u.a. die IDs stark angefärbt sind.

3.2.2. Negativkontrollen der Gewebeschnitte für die Immunfluoreszenz

Für die Negativkontrolle wurden die Kryoschnitte humaner Myokardproben statt mit den Primärantikörpern lediglich mit Verdünmedium inkubiert und danach wurde die üblicherweise verwendete Sekundärantikörpermischung inklusive Alexa633 Phalloidin und DAPI appliziert. In den konfokalmikroskopischen Aufnahmen erkennt man eine schwache Fluoreszenz im roten Kanal (Cy3-G (Goat) gegen Maus gerichteter Sekundärantikörper), die eine granuläre Struktur aufweist und vorwiegend an den Zellkernpolen zu finden ist. Da sie sich mit der Phalloidinfärbung deckt (siehe Abb. 6) und die Probe von einem älteren Patienten stammt, kann daraus geschlossen werden, dass es sich bei dem Signal um Autofluoreszenz handelt, die von Lipofuszingranula (LFG) verursacht wird. Im grünen Kanal (Cy2-G Sekundärantikörper gegen Kaninchen) war keinerlei unspezifische Reaktion zu beobachten.

Bei den Negativkontrollen der immungefärbten Paraffinschnitte von humanen Myokardproben war beim Cy3-G a M ebenfalls eine granuläre, sowie eine zusätzliche diffuse unspezifische Hintergrundfluoreszenz erkennbar (Abb. 7). Sowohl der Sekundärantikörper Cy2-G a R, als auch die Zellkernfärbung durch DAPI zeigten bei den Paraffinschnitten mehr Hintergrundsignal als in den Kryoschnitten. Grundsätzlich ist die Autofluoreszenz des Gewebes in Paraffinschnitten ausgeprägter, was vermutlich mit dem Dehydrierungs- und Paraffinisierungsprozess zusammenhängt. Außerdem sind durch diesen Prozess die Epitope oft so verändert, dass sie, trotz Demaskierung nicht mehr für die Antikörper zugänglich sind. Vor allem die sensitiveren hoch spezifischen monoklonalen Maus Antikörper, welche nur an ein spezifisches Epitop eines Antigens binden können, agieren mit Paraffinschnitten oft nicht mehr, weshalb in dieser Arbeit nur der monoklonale Mausantikörper gegen Desmin zur Färbung von Paraffinschnitten verwendet werden konnte.

Wie in den Kryoschnitten war das granuläre Signal in den Gewebeschnitten überwiegend im myofibrillenfreien Zytoplasma nahe den Kernpolen zu finden und es handelt es sich daher vermutlich ebenfalls um die autofluoreszenten Lipofuszingranula. Auffällig ist auch, dass das Signal bei Proben von jüngeren Patienten kaum vorkam und vor allem bei Proben von älteren Patienten sehr stark angereichert vorlag (Siehe Abb. 6 und 7).

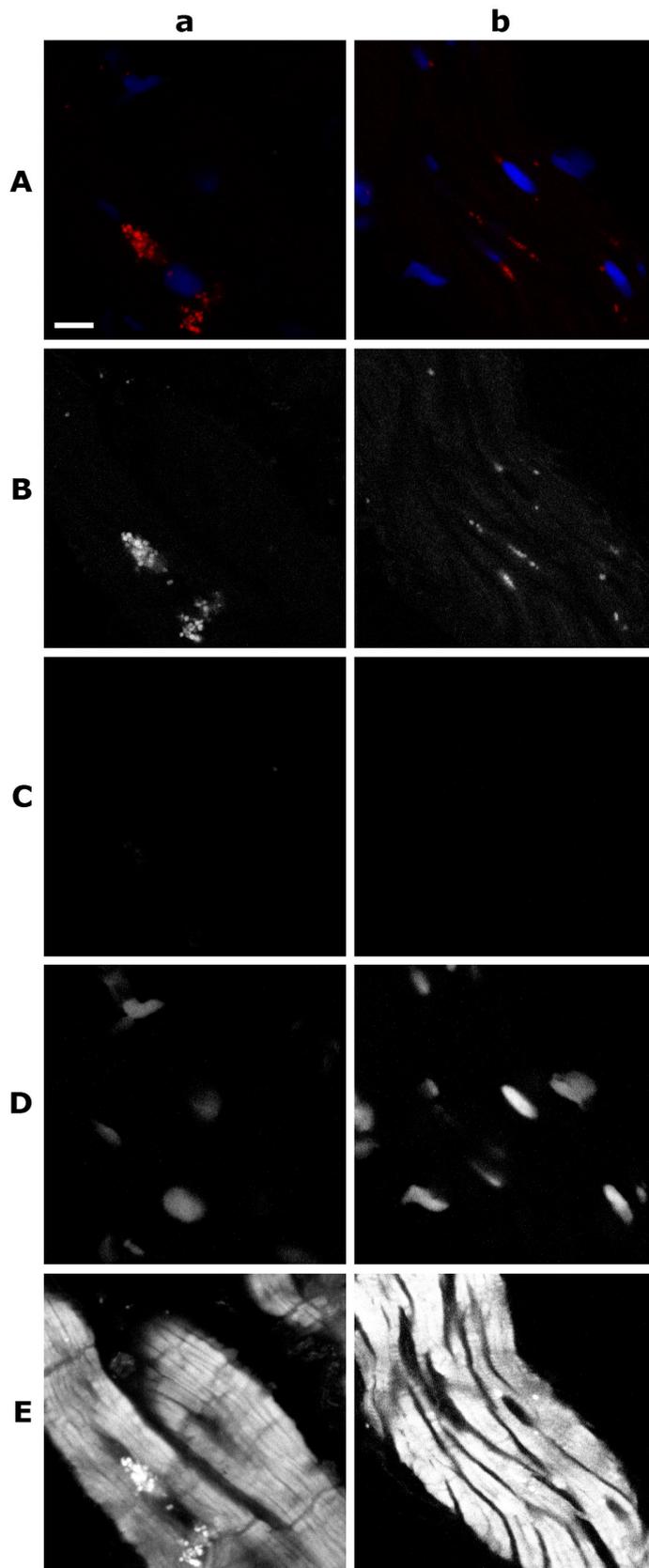


Abb. 6. Negativkontrolle der vierfach immunfluoreszent markierten Kryoschnitte aus dem LV humaner Proben. In (A) ist die Kombination aus den Signalen der Sekundärantikörper Cy3-Goat gegen Maus in rot und Cy2-Goat gegen Kaninchen in grün, sowie die Kernfärbung durch DAPI in blau sichtbar. Das Phalloidin Signal ist hier nicht enthalten, es ist in (E) gesondert dargestellt. Die Signale von (B) Cy3-G a M, (C) Cy2-G a R und (D) DAPI sind zusätzlich getrennt dargestellt. Die Proben stammen aus dem LV von (a) P15, mit einem Alter von 56 Jahren und (b) P41, mit einem Alter von 14 Jahren. Skala 10 μ m

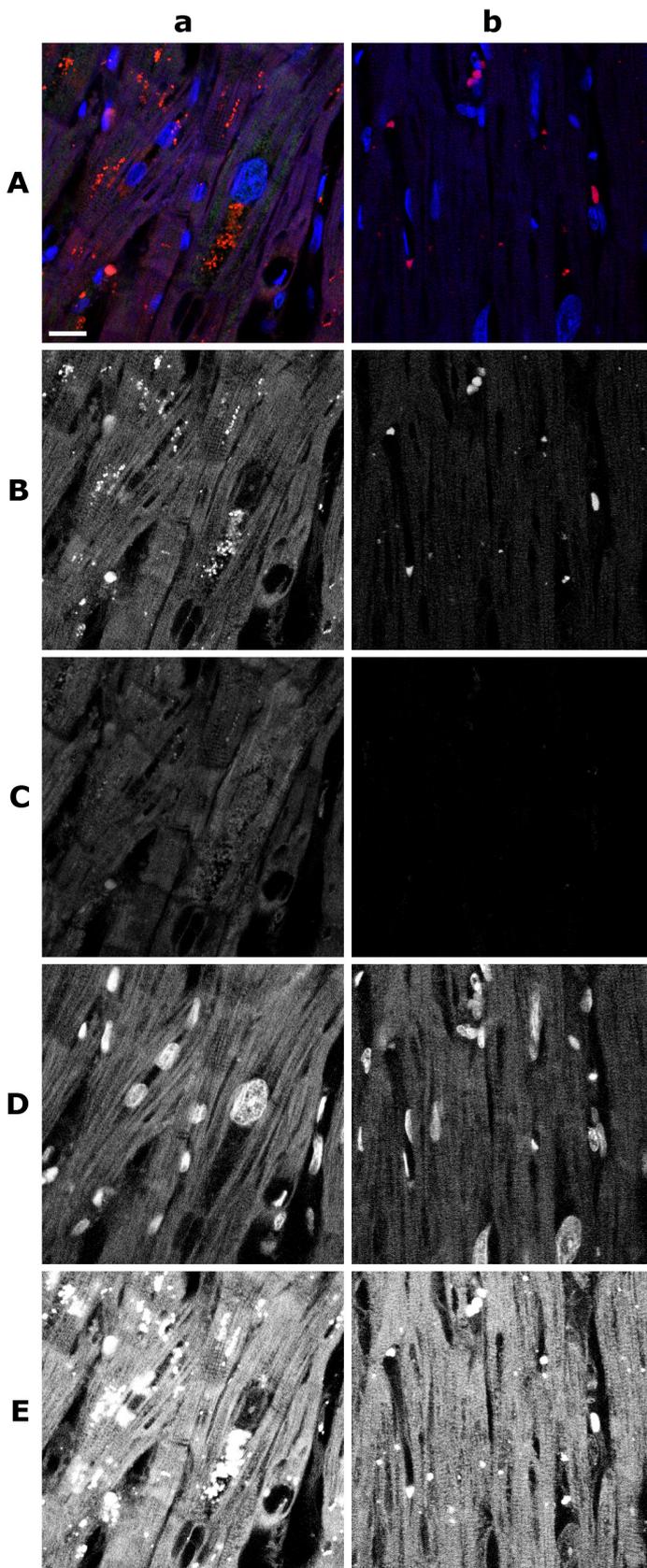


Abb. 7. Negativkontrolle der vierfach immunfluoreszent markierten Paraffinschnitte aus dem LV humaner Proben. In (A) ist die Kombination aus den Signalen der Sekundärantikörper Cy3-Goat gegen Maus in rot und Cy2-Goat gegen Kaninchen in grün, sowie die Kernfärbung durch DAPI in blau sichtbar. Das Phalloidin Signal ist hier nicht enthalten, es ist in (E) gesondert dargestellt. Die Signale von (B) Cy3-G a M, (C) Cy2-G a R und (D) DAPI sind zusätzlich getrennt dargestellt. Die Proben stammen aus dem LV von (a) P15, mit einem Alter von 56 Jahren und (B) P34, mit einem Alter von 12 Jahren. Skala 20µm

3.2.3. Veränderungen in der Morphologie von ventrikulären Kardiomyozyten in extraplatantierten Herzen von Patienten mit Herzversagen im Endstadium

Die konfokale Analyse der Kryo- und Paraffinschnitte aus dem Ventrikelmyokard der extraplatantierten Herzen zeigt im Generellen eine unterschiedlich stark ausgeprägte interstitielle Fibrose, die selbst innerhalb der einzelnen Schnitte zum Teil stark variiert.

3.2.3.1. Konfokale Analyse der Gewebeeigenschaften bei zwei verschiedenen Kongenitalen Herzdefekten (n=2)

Unter den untersuchten Proben befanden sich auch zwei Proben (P41, P39), die aus dem linken und rechten Ventrikelmyokard von extraplatantierten Herzen die einen kongenitalen Herzdefekt aufwiesen stammten. Der Herzdefekt war bereits durch entsprechende Operationen korrigiert worden. Diese zwei Proben wurden ebenfalls für die konfokale Analyse herangezogen, mit der Hoffnung dass jenes Gewebe kaum Veränderungen durch maladaptive Umbau-prozesse aufweist und möglicherweise als Kontrolle, v.a. für jüngere DCM und HCM Proben, herangezogen werden kann.

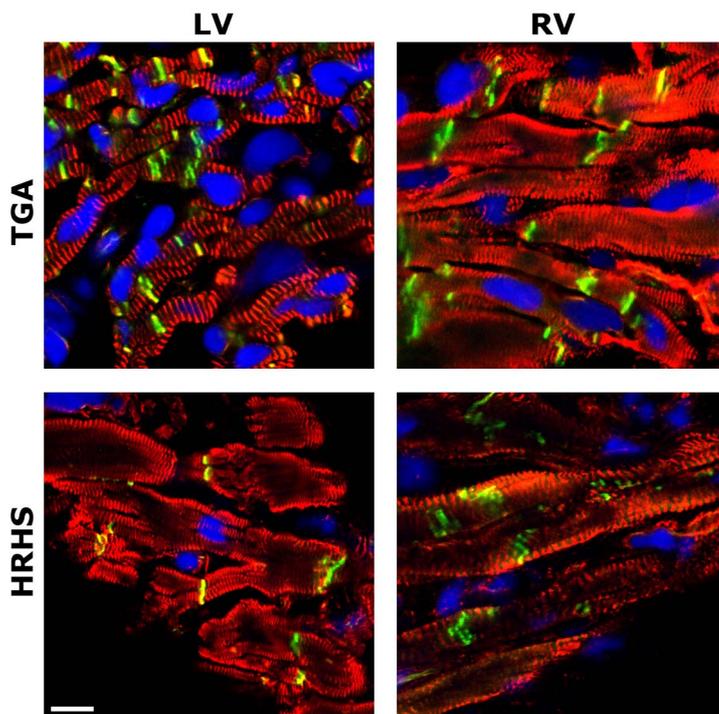


Abb. 8. Darstellung der links- und rechtsventrikulären Gewebeeigenschaften der kongenitalen Herzdefekte. Immunfluoreszenz markierte Kryoschnitte gegen Z-Scheiben und ID Protein α -Aktinin (rot), AJ Protein β -Catenin (grün) und Kernfärbung durch DAPI (blau). Die Kardiomyozyten des LV von HRHS sind leider nicht optimal Längs getroffen. Skala 10 μ m

P39 (w., 12a) hatte ein angeborenes Hypoplastisches Rechtsherzsyndrom (HRHS) mit Pulmonal- (PA) und Triskupidalatresie (TA) die im Rahmen einer *Fontan-Operation* korrigiert wurde. In den

Immunfluoreszenz-Aufnahmen der gegen verschiedene kontraktile Proteine und Proteine der ID angefärbten Kryoschnitte sind schön elongierte, jedoch kleinere Myozyten erkennbar, was u.a. auch durch die Vielzahl an kleinen Zellkernen zu erkennen ist (Abb.8). Die im Vergleich zum Spendergewebe relativ geringe Myozytengröße steht im Zusammenhang mit dem jungen Alter der Patientin zum Zeitpunkt der Transplantation.

Die Zellform ist jedoch größtenteils sehr unregelmäßig, trotz regelmäßiger Anordnung der Myofibrillen, mit spitz zulaufenden sichelförmigen Zellen und desorganisierten Stellen. Das Auffälligste bei der Probe ist die überwiegend

stark ausgeprägte Fibrose. Rechtsventrikulär ist das *Myocyte Disarray* als auch die Fibrose stärker ausgebildet.

P41 (m., 14a) hatte eine angeborene Transposition der großen Arterien (TGA) mit einer diskordanten Ventrikulo-Atrialen Verbindung (VA), die durch eine *Arterial Switch Operation* korrigiert wurde. Die Kardiomyozyten von P41 sind im LV auffallend klein, auch im Vergleich zu P39 (12a), in sehr vielen Arealen sogar extrem klein ausgebildet (Abb. 8). Die Zellgestalt ist sehr unregelmäßig und es sind sehr oft stark desorganisierte Stellen im Gewebe zu finden, wo die Myozyten ihre parallele Ausrichtung verloren haben. Der RV weist im Vergleich zum LV deutlich regelmäßigere, größere Myozyten und ein dichteres, mehr reguläres Zellarrangement auf.

3.2.3.2. Konfokale Analyse der Gewebeeigenschaften von ischämischer Kardiomyopathie (n=2)

Die Myozyten beider iCMP Patienten (P48, mit 58a & P50, mit 55a) sind innerhalb der IF markierten linksventrikulären Kryoschnitte, im Vergleich zum Spendergewebe und den übrigen extraplatantierten Herzen häufig auffallend groß (sehr dick) (Abb.9). Die Myofibrillen, die durch eine IF Färbung gegen das Z-Scheiben Protein α -Aktinin, M-Banden Protein Myomesin oder verschiedenen Epitope von Titin dargestellt wurden, weisen ein sehr schönes quergestreiftes Muster mit, v.a. bei P48 sehr oft, ausgebildeter regelmäßiger Anordnung auf. Die Zellform variiert jedoch sehr stark innerhalb der Schnitte, ebenso wie die Zelldichte durch unterschiedlich stark auftretende Fibrose. Desorganisierte Stellen (bezeichnet als *Myocyte Disarray*) sind bei beiden Proben zu finden.

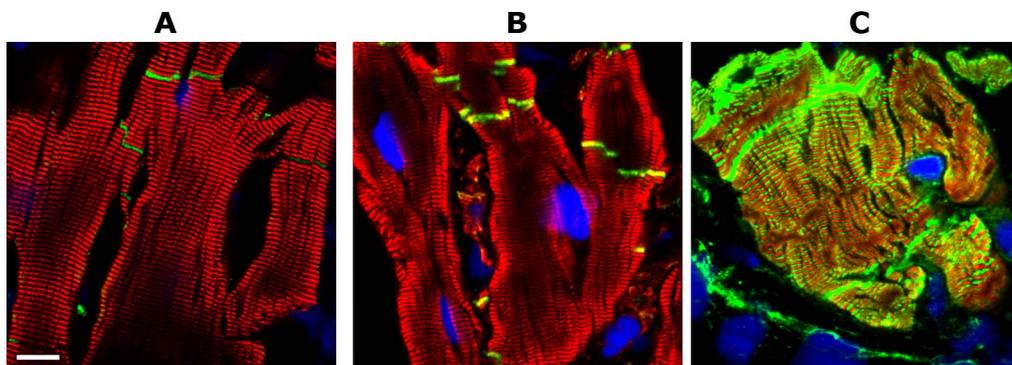


Abb. 9. Darstellung der ventrikulären Gewebeeigenschaften von ischämischer Kardiomyopathie. IF Färbung der Kryoschnitte von P48 (A) gegen (rot) α -Aktinin, (grün) N-RAP und (blau) Kernfärbung durch DAPI. (B) IF Färbung der Kryoschnitte von P48 gegen (rot) α -Aktinin, (grün) β -Catenin und (blau) Kernfärbung durch DAPI. IF Färbung der Kryoschnitte von (C) P50 gegen (rot) Myomesin, (grün) α -Aktinin und (blau) Kernfärbung durch DAPI. Eine Tendenz zu großen Myozyten ist bei beiden Proben erkennbar. Die Gestalt der Herzzellen bei P48 ist unterschiedlich. Die Aufnahme (B) entstammt Areal mit *Myocyte Disarray*. Skala 10 μ m.

3.2.3.3. Konfokale Analyse der Gewebeeigenschaften von extraplatantierten Herzen mit Dilatativer Kardiomyopathie (n=12)

Bei den an DCM erkrankten Patienten ist innerhalb der verschieden IF markierten Kryo- und Paraffinschnitte grundsätzlich eine unterschiedlich starke, irreguläre Myozytengestalt zu erkennen (Abb. 35, Abb. 36). Es herrschen sowohl Unterschiede in der Myozytenform zwischen den einzelnen

Proben als auch starke Variabilität innerhalb einer Probe. Ein *Myocyte Disarray* mit desorganisierter Anordnung der Myozyten lag bei einigen Patienten stellenweise vor. Das stärkste *Myocyte Disarray* wurde unter den Kryoschnitten bei P42 (m., 64a, iDCM) und P45 (w., 15a, FDCM), unter den Paraffinschnitten bei P25 (m., 54a, DCM wahrscheinlich ischämisch) beobachtet.

Eine besondere Auffälligkeit beim Vergleich der Form und des subzellulären Arrangements der Kardiomyozyten liegt bei beiden LV Proben mit FDCM vor. Beide Proben besitzen sehr lange dünne Myozyten und ein extrem durchlöcherteres Myokard („*Spongy Heart*“), vermutlich durch Absterben von Myozyten (Abb. 10). Bei P45 (w., 15a) ist beides in einer im gesamten Gewebe dominierenden extremen Form in Verbindung mit einer stark desorganierten Anordnung der Myozyten zu beobachten. Bei P15 (w., 56a, diagnostiziert seit dem 27. Lebensjahr) sind neben Arealen mit besonders dünn ausgebildeten langen Kardiomyozyten auch Areale mit dickeren Myozyten präsent (Abb. 35 A, A').

Ein solches auf zellulärer Ebene durchlöcherteres Myokard sowie auch ein *Myocyte Disarray* ist auch in den strukturell besser konservierten Paraffinschnitten sichtbar. Daher kann ausgeschlossen werden, dass die Löcher aufgrund von Gefrierartefakten beim Kryoschnitt entstanden sind.

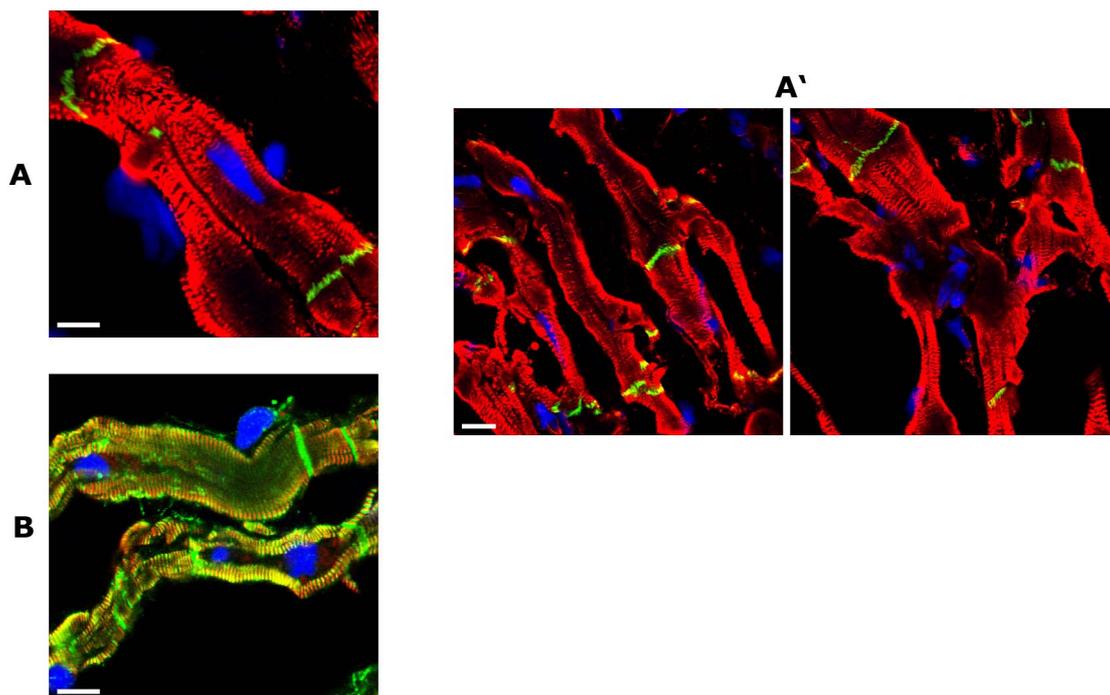


Abb. 10. Darstellung der Gewebeeigenschaften bei FDCM. (A,A') Immunfluoreszenz markierte Kryoschnitte von P45 (w., 15a) gegen Z-Scheiben & ID Protein α -Aktinin (rot), das AJ Protein β -Catenin (grün) und Kernfärbung durch DAPI (blau). (B) Immunfluoreszenz markierte Kryoschnitte von P15 (w., 56a) gegen das M-Banden Protein Myomesin (rot), das Z-Scheiben & ID Protein α -Aktinin (grün), und Kernfärbung durch DAPI. Bei Beiden ist ein „*Spongy Heart*“ auf zellulärer Ebene ausgebildet. Jenes ist sehr gut in der Übersichtsaufnahme (A') zu erkennen. Skala 10 μ m.

3.2.3.4. Konfokale Analyse der Gewebeeigenschaften bei ARVD (n=1)

Die links und rechtsventrikulären Kryoschnitte der einzigen ARVD (auch abgekürzt als ARVD/C) Probe zeigen subzellulär die immenseste Fibrose und geringste Zelldichte im Vergleich zu den anderen extransplantierten Herzen. Die Myozytenform ist enorm unregelmäßig und eine stark

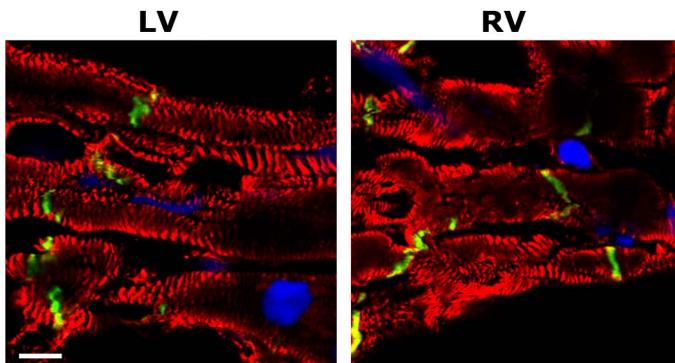


Abb. 11. Darstellung der Gewebeeigenschaften bei ARVD. Immunfluoreszenz markierte Kryoschnitte gegen Z-Scheiben & ID Protein α -Aktinin (rot), das AJ Protein β -Catenin (grün) und Kernfärbung durch DAPI (blau). Skala 10 μ m

desorganisierte Anordnung der Myozyten herrscht vor (Abb. 11). Selbst die Myofibrillen sind innerhalb der Myozyte desorganisiert und ein Verlust an Myofibrillen innerhalb der Zellen ist ebenso erkennbar. Der rechte Ventrikel zeigt im Vergleich zum LV eine deutliche Verschlechterung des Zustandes des ventrikulären Gewebes.

3.2.3.5. Konfokale Analyse der Gewebeeigenschaften bei HCM (n=1)

In den IF markierten Kryoschnitten der einzigen HCM Probe (P34, m., 12a) ist stellenweise ein *Myocyte Disarray* ausgebildet. Die Zellform ist in diesen Arealen unregelmäßig, eine stärkere Fibrose ist ausgebildet und die Myozyten haben großteils ihre parallele Anordnung zueinander verloren. Im Vergleich zum Spendergewebe (K4) weist P34 trotz des geringeren Alters deutlich größere, d.h. für die Erkrankung typische hypertrophierte Myozyten auf, wobei hier für eine bessere Darstellung die ECM angefärbt hätte werden müssen.

3.3. Proteine des Sarkomers in versagenden menschlichen Herzen

Die Immunfluoreszenzanalyse von Kryoschnitten aus dem linken (n=12) und seltener rechten (n=7) Ventrikelmyokard von verschiedenen Patienten mit Herzversagen im Endstadium und zwei Kontrollproben (n=2) aus dem Spendergewebe, welche gegen verschiedene Proteine des Sarkomers (Titin, Myomesin, α -Aktinin und MyBP-C) zusammen mit A633-Phalloidin um das F-Aktin und DAPI um die Kerne zu visualisieren angefärbt wurden, zeigt ein typisches gebändertes Muster. Eine weitere Analyse durch Immunoblots wurde demzufolge nicht weiter durchgeführt.

Die Darstellung von Titin erfolgte durch eine Kombination aus einem mAb Antikörper gegen das Titin T12 Epitop, welcher mit dem N-Terminus des Proteins reagiert und somit die Z-Scheiben sichtbar macht und einem pR Antikörper gegen das Titin m8 Epitop, welcher mit dem C-Terminus von Titin reagiert und somit die M-Banden sichtbar macht. Bei allen Proben ist eine sehr schöne abwechselnd quergestreifte Struktur von Titin erkennbar, wobei der polyklonale Kaninchen Antikörper gegen Titin

m8 zu einer höheren Hintergrundfärbung in den immunfluoreszent gefärbten Kryoschnitten neigt (Abb. 12).

Die Darstellung vom Z-Scheiben Protein α -Aktinin, welches neben Aktinfilamenten und Titin mit einer Vielzahl anderer Z-Scheiben assoziierten Proteine interagiert und hauptsächlich zur strukturellen Stabilität am Level der Z-Scheiben beiträgt, erfolgte in Kombination mit dem M-Banden Protein Myomesin, welches die kontraktilen Myosin Filamente und Titin in der Mitte des Sarkomers verankert. Die Analyse der Vierfach immunfluoreszent markierten Kryoschnitte zeigte auch hier bei allen Patienten mit Herzversagen im Endstadium eine typische abwechselnd gestreifte Struktur am Level der Z-Scheiben und M-Banden (Abb. 13). Die strukturelle Verankerung der elastischen und kontraktilen Elemente an den Z-Scheiben und M-Banden unterliegt somit keinerlei sichtbaren Umbauprozessen bei allen Patienten mit Herzversagen im Endstadium.

Es wurden auch Kryoschnitte für die Darstellung der ID gegen deren verschiedene Proteine in Kombination mit α -Aktinin immunfluoreszent markiert. Dabei wurde ein primärer monoklonaler Maus Antikörper gegen α -Aktinin verwendet, der im Vergleich zu dem polyklonalen Kaninchen Antikörper weitaus schönere Ergebnisse liefert, da er weniger zu unspezifischer Hintergrundfärbung neigt und dadurch die Z-Scheiben klar darstellt.

Nachdem MyBP-C eine wesentliche strukturelle als auch signalgebende Rolle in der Muskelkontraktion zu spielen scheint, dessen genaue Funktion jedoch weitgehend ungeklärt ist und Genmutationen des kardialen MyBP-C mit FHCM in Verbindung stehen, wurden die Kryoschnitte und Paraffinschnitte verschiedener Patienten mit Herzversagen im Endstadium auch mit Antikörpern gegen MyBP-C angefärbt. Die IF Färbung gegen das kardiale MyBP-C Protein erfolgte in Kombination mit der Färbung gegen das Intermediärfilament Protein Desmin. Innerhalb der Sarkomere der ventrikulären Kardiomyozyten, dessen Z-Scheiben durch Desmin angefärbt vorliegen, ist das typische MyBP-C Doppelbanden Muster, v.a. an relaxierten Kardiomyozyten, größtenteils schön erkennbar (Abb.14 & Abb.37). Das Doppelbandenmuster kommt durch die Bindung des MyBP-C an ein Subset der Myosinköpfe jeweils in der C-Zone beidseitig der M-Bande. Desmin befindet sich konzentriert an den Z-Scheiben und an den bipolaren Zell-Zell Kontakten, den Interkalierenden Scheiben.

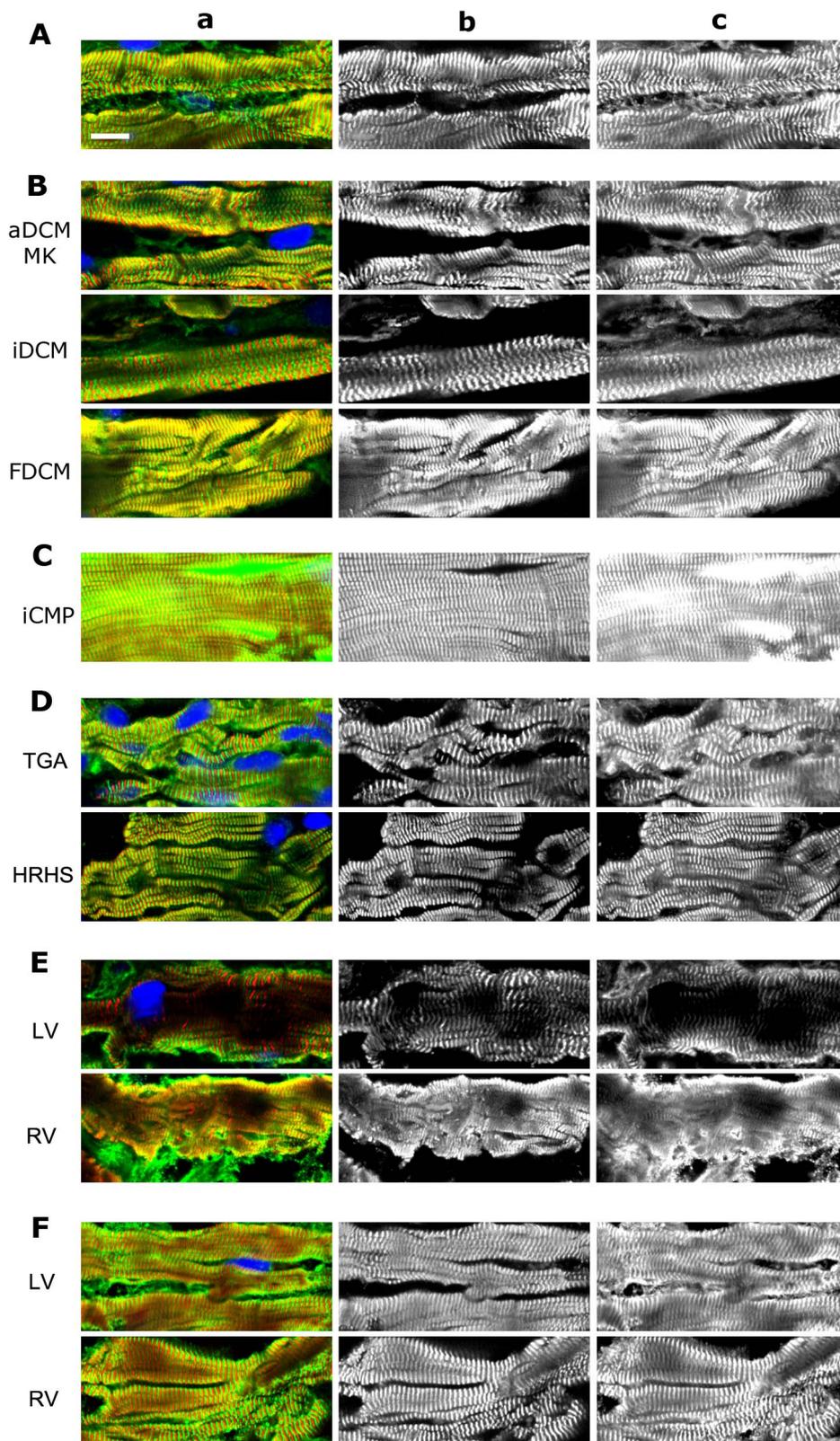


Abb. 12. Darstellung von Titin durch Immunfluoreszenz-gefärbte Kryoschnitte des LV von Patienten mit Herzversagen im Endstadium. Markierung durch Kombination aus (a in rot, b) mM AK gegen Titin T12 (a in grün, c) pR a gegen das Titin m8, sowie Darstellung (a in blau) der Kerne durch DAPI. Das typische sarcomere Z-Scheiben und M-Banden Muster war bei allen Patienten mit Herzversagen im Endstadium, durch die Detektion und Färbung der entsprechenden Titinepitope, gegeben. (A) Kontrolle, (B) DCM, (C) iCMP, (D) kongenitaler Defekt, (E) ARVD, (F) KHK, (E-F) LV und RV; Skala 10 μ m

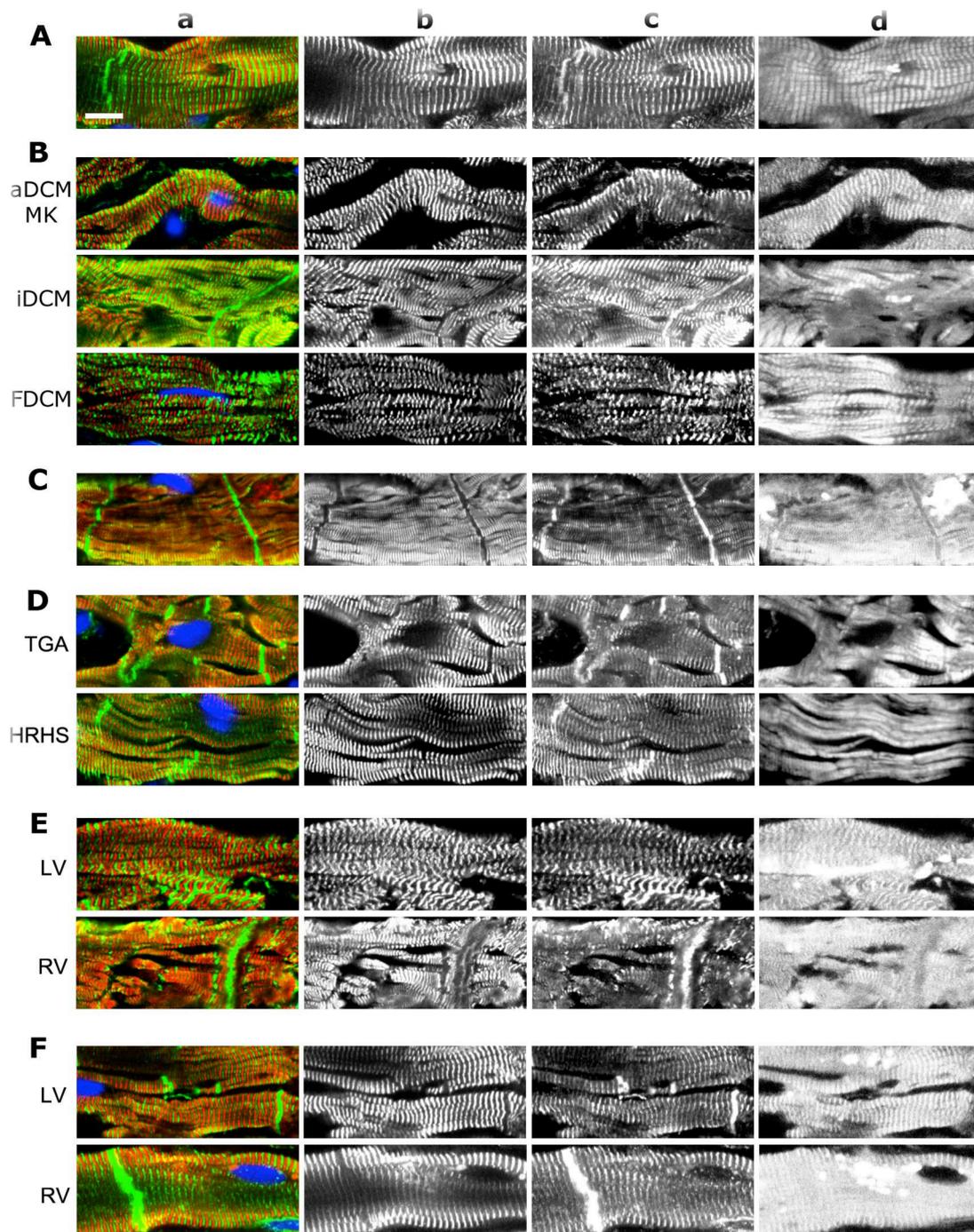


Abb. 13. Darstellung vom Z-Scheiben Protein α -Aktinin und M-Banden Protein Myomesin durch vierfach immunfluoreszent angefärbte Kryoschnitte aus dem LV in Patienten mit Herzversagen im Endstadium und Spendergewebe. Markierung durch Kombination aus (a in rot, b) mM AK gegen Myomesin (a in grün, c) pR a gegen das α -Aktinin, sowie (d) Darstellung des F-Aktin durch A633-Phalloidin und (a in blau) der Kerne durch DAPI. Das typische quergestreifte Muster beider Proteine ist bei allen Proben nachweisbar (A) Kontrolle (B) DCM (C) kongenitaler Defekt (D) ARVD (E) iCMP. Der polyklonale Kaninchen Antikörper gegen das Z-Scheiben Protein α -Aktinin liefert leider nicht so schöne Ergebnisse wie ein monoklonale Antikörper gegen dieses Protein und neigt zu unspezifischer Hintergrundfärbung. Skala 10 μ m

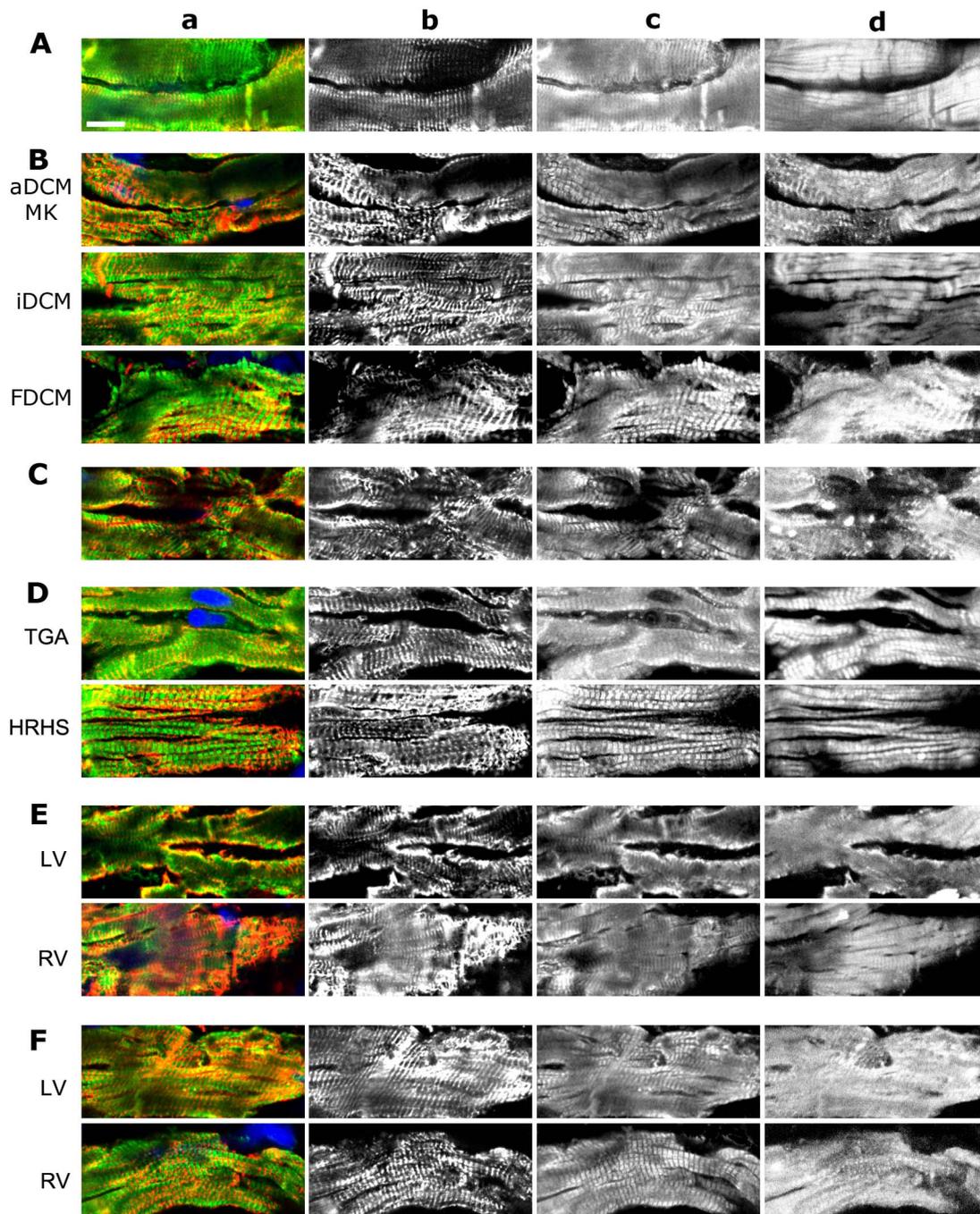


Abb. 14. Darstellung des kardialen MyBP-C Proteins anhand vierfach immunfluoreszent angefärbter Kryoschnitte aus dem LV von Patienten mit Herzversagen im Endstadium. Markierung durch Kombination aus (a in rot, b) mM AK gegen Desmin (a in grün, c) pR a gegen das MyBP-C, sowie (d) Darstellung des F-Aktin durch A633-Phalloidin und (a in blau) der Kerne durch DAPI. Das typische MyBP-C Doppelbanden Muster ist innerhalb der Sarkomere größtenteils bei allen Patienten erkennbar. Die Antikörperfärbung gegen MyBP-C ist nicht gleichmäßig was durch den Abgleich mit dem A633-Phalloidin Signal auf Schnittunebenheiten schließen lässt, wodurch der relativ große Antikörper nicht überall hin gut diffundieren konnte. Beim MyBP-C Signal ist eine Färbung der Zell-Zell Kontakte in allen Aufnahmen sichtbar, was auf eine mögliche Kreuzreaktion des polyklonalen Antikörpers hindeutet. Bei der Desmin Färbung erkennt man zwar Hinweise auf eine Akkumulation jedoch ist eine genaue Interpretation in den Kryoschnitten mit ihrer suboptimalen Strukturhaltung relativ schwierig. (A) Kontrolle, (B) DCM, (C) iDCM, (D) kongenitale Defekte, LV und RV von (E) ARVD Skala 10 μ m

3.4. Veränderungen an den Interkalierenden Scheiben (ID)

In den immunfluoreszent gegen Proteine der Interkalierenden Scheiben markierten Kryoschnitte des LV von 9 Monate alten MLP Knockoutmännchen sind, im Vergleich zum WT, Veränderungen in der Struktur und Komposition der Komponenten zu erkennen.

Das β -Catenin Signal ist erwartungsgemäß an den AJ der Myozyten im LV der MLP Knockout Maus deutlich breiter im Vergleich zum WT ausgebildet (Abb.15 A; Abb. 2 B). Ebenso ist das Vorkommen des Gap Junction Proteins Connexin43 an den ID schwächer ausgebildet. Beim WT liegen die GJ als eine Vielzahl an Einzelpunkten in einer Linie an den polaren Enden der Kardiomyozyten angeordnet vor, wobei sich oftmals gut sichtbare größere Spots am Rande der ID befinden. Bei MLP $-/-$ ist die Anzahl der Connexin43-Spots an den ID reduziert. Interessanterweise sind sowohl bei der 9 Monate alten MLP $-/-$ Maus, als auch deren entsprechendem WT laterale Connexin43 GJ vorhanden (Abb.15 B)

Wie bereits zuvor beschrieben, ist in den Longitudinalschnitten der beiden humanen Kontrollen das Auftreten von scheinbaren doppelten ID stark auffällig, welche durch extreme Verzahnungen der Myozyten zustande kommen (gekennzeichnet durch Pfeile in Abb. 5a, Abb.16 A, Abb.33 A, Abb.26 B). Ähnliche Strukturen sind allerdings weder im MLP Knockout, noch im WT Herz nachweisbar.

Bei der konfokalen Analyse von humanen Proben mit Herzversagen im Endstadium sind solche scheinbar doppelten Interkalierenden Scheiben, wo eine Myozyte fast senkrecht zwischen zwei Myozyten hineinzudrängen scheint, zwar bei vielen Patienten (bei 14 von 21) auch, jedoch seltener zu finden (gekennzeichnet durch Pfeile in Abb.16-18., Abb.21-22, Abb.33 Abb.35-36). Das Vorkommen ist dabei unabhängig vom Alter und auch der beschriebenen Ursache der Erkrankung.

3.4.1. Linksventrikuläre Veränderungen in der Organisation von Adherens Junctions (AJ) und der Expression von β -Catenin bei Herzerkrankungen

Beim Vergleich von mittels Immunfluoreszenz (gegen β -Catenin, α -Aktinin, F-Aktin und DAPI) markierten Kryoschnitte aus dem linken Ventrikel beider Kontrollproben ist ein Unterschied in der Ausprägung des β -Catenin Signals der AJ auffallend. Jenes ist bei K2 breiter ausgebildet als bei K4, selbst beim Vergleich zu P46 mit KHK, welches hier aufgrund des „gesunden“ Gewebes auch als Kontrolle hinzugezogen wurde (siehe Abb. 5, Abb. 16, Abb. 17). Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang mit dem oftmals auftretenden *Myocyte Disarray* im linksventrikulären Myokardgewebe von K2. Die ID sind oft sehr unregelmäßig (siehe Abb. 5a), was auf eine stärker gewundene Plasmamembran hindeutet. Das Signal von K4 ist ungefähr gleich wie das von P46. Beide Proben besitzen sehr schöne ID.

Bei beiden iCMP Patienten (P48, P50) und beiden Patienten mit einem kongenitalen Herzdefekt (P39 mit HRHS und P41 mit TGA) ist das β -Catenin Signal an den ID des LV nicht breiter als das des Kontrollgewebes (siehe Abb. 17), wobei P41 linksventrikulär eine immense Anzahl an kleinen AJ aufweist (Abb. 8).

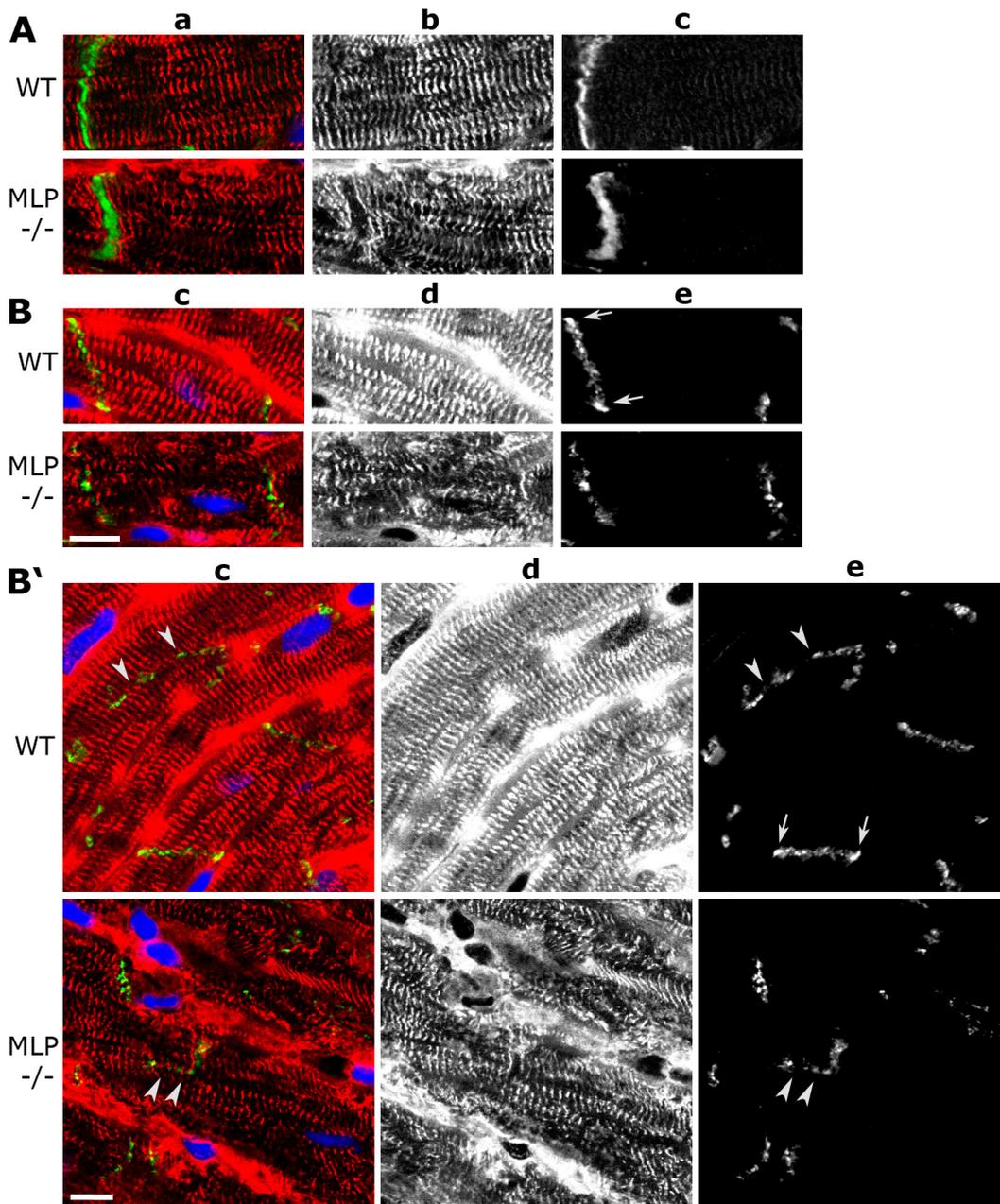


Abb. 15. Veränderungen an den ID im Herzen der 9 Monate alten MLP Knockoutmaus im Vergleich zu dem entsprechenden WT Herz. (A) Kryoschnitte immunfluoreszent angefärbt durch (a in rot, b) mM AK gegen das M-Banden Protein Myomesin (B4 clone), (a in grün, c) pR AK gegen das AJ Protein β -Catenin und DAPI-Kernfärbung (a in blau). Das Herzgewebe der MLP ^{-/-} Maus weist ein deutlich breiteres β -Catenin Signal auf. (B,B') Kryoschnitte immunfluoreszent angefärbt durch (a in rot, b) mM AK gegen das M-Banden Protein Myomesin (B4 clone), (a in grün, c) pR AK gegen das GJ Protein Connexin43 und DAPI-Kernfärbung (a in blau). Beim WT sind GJ als viele linear angeordnete Spots an den polaren Enden der Myozyten sichtbar, wobei größere Spots die ID oftmals begrenzen (B, B' weiße Pfeile). Im MLP ^{-/-} Herz hingegen, erscheint das Connexin43 Signal an den ID reduziert. In beiden Färbungen ist die unregelmäßige Myozytengestalt und eine mehr irreguläre Anordnung der Myofibrillen bei MLP ^{-/-} auffällig. In (B') sind laterale GJ sowohl bei MLP ^{-/-} als auch dem entsprechenden WT ausgebildet (weiße Pfeilköpfe). Die unspezifische Hintergrundfärbung zw. den Myozyten stammt von dem gegen Maus gerichteten Sekundärantikörper. Skala 10 μ m.

Die Kardiomyozyten selbst sind dabei sehr klein, d.h. sowohl kurz als auch dünn, und in ihrer Gestalt sehr unregelmäßig ausgeprägt. Die zum Teil stark desorganisierte Anordnung der Myozyten setzt sich auch innerhalb der Zellen beim Myofibrillenalignment fort.

Im linken Ventrikel verschiedener DCM Patienten sind, entgegen den Erwartungen aus den Ergebnissen der MLP Knockoutmaus, nicht immer breitere AJ entwickelt.

Von den 6 DCM Patienten von denen Kryoschnitte aus dem LV angefertigt wurden, weisen 4 ein breiteres Signal an den AJ als K4 und P46 auf (Abb. 16). Dabei handelt es sich bei den ersten beiden um DCM Fälle mit positiver familiärer Anamnese (P45, w., 15a; P15, w. 56a), und bei den zweiten beiden um DCM Fälle, die von einer Myokarditis resultieren (P40, m., 16a; P43, m. 64a). Bei beiden FDCM Fällen ist das β -Catenin Signal deutlich breiter, bei der jüngeren FDCM Probe sogar breiter als das von der Kontrolle K2 mit unbekannter Herkunft (Abb. 16 C). Bei P15 war die DCM bereits seit dem 27. Lebensjahr bekannt.

Bei der einzigen ARVD Probe ist das β -Catenin Signal an den ID auch breiter ausgebildet und die AJ sind sehr gezackt (Abb. 17 D).

Das breitere β -Catenin Signal ist immer mit unregelmäßigeren, d.h. ausgefransteren bzw. mehr gezackten AJ, als auch unregelmäßigerer Zellform korreliert, was darauf hindeutet dass die Plasmamembran einen höheren Grad an Faltungen aufweist.

Bei P42 (m., 64a) mit idiopatischer und P44 (w., 64a) mit wahrscheinlich ischämischer DCM ist das β -Catenin Signal an den ID der linksventrikulären Kardiomyozyten schwächer als das von K2 und ungefähr gleich wie bei K4 und P46 ausgebildet (Abb.16 D). Die AJ sind im Vergleich zu den übrigen DCM Proben weit regelmäßiger.

Bei den IF markierten (gegen β -catenin, Desmin, F-Aktin, DAPI) Paraffinschnitten aus dem linken Ventrikel ist bei 5 von 7 DCM Patienten ein breiteres β -Catenin Signal im Vergleich zur Kontrolle K2 erkennbar (Abb. 18). Wie bereits bei den Kryoschnitten beobachtet, steht das β -Catenin Signal im Zusammenhang mit unregelmäßiger ausgeprägten AJ, was auf eine stärkere Interdigitation der Plasmamembranen benachbarter Myozyten hindeutet und wiederum selbst zu einem breiteren β -Catenin Signal führt.

Bei P19 (w., 58a) mit wahrscheinlich ischämischer, d.h. sekundär verursachter, DCM (mit diffuser Sklerose der Koronararterien, siehe auch Tab.1) ist das β -Catenin Signal nicht signifikant breiter ausgebildet. Jedoch sind an vielen polaren Zell-Zell Kontakten extrem ausgefranste ID ausgebildet (Abb. 18). Die Plasmamembran weist an den ID eine immens ausgeprägte Interdigitation zwischen zwei benachbarten Myozyten auf.

Der zweite Fall wo in den Paraffinschnitten kein Unterschied zum Kontrollgewebe in der Ausprägung des β -Catenin Signals ersichtlich ist, ist P26 (m. 57a) mit einer DCM nach Aortenklappenersatz (siehe auch Tab.1), d.h. wahrscheinlich ischämischer Ursache (Abb. 18). Im Hinblick auf dieses Ergebnis ist erwähnenswert, dass sich alle Paraffinschnitten der Probe P26 durch eine schlechte Probenqualität auszeichnen. Die Probe, die in Paraffin eingebettet wurde, war sehr groß, was zu einer suboptimalen Fixierung, Entwässerung und Wachspenetration geführt haben könnte, die sich

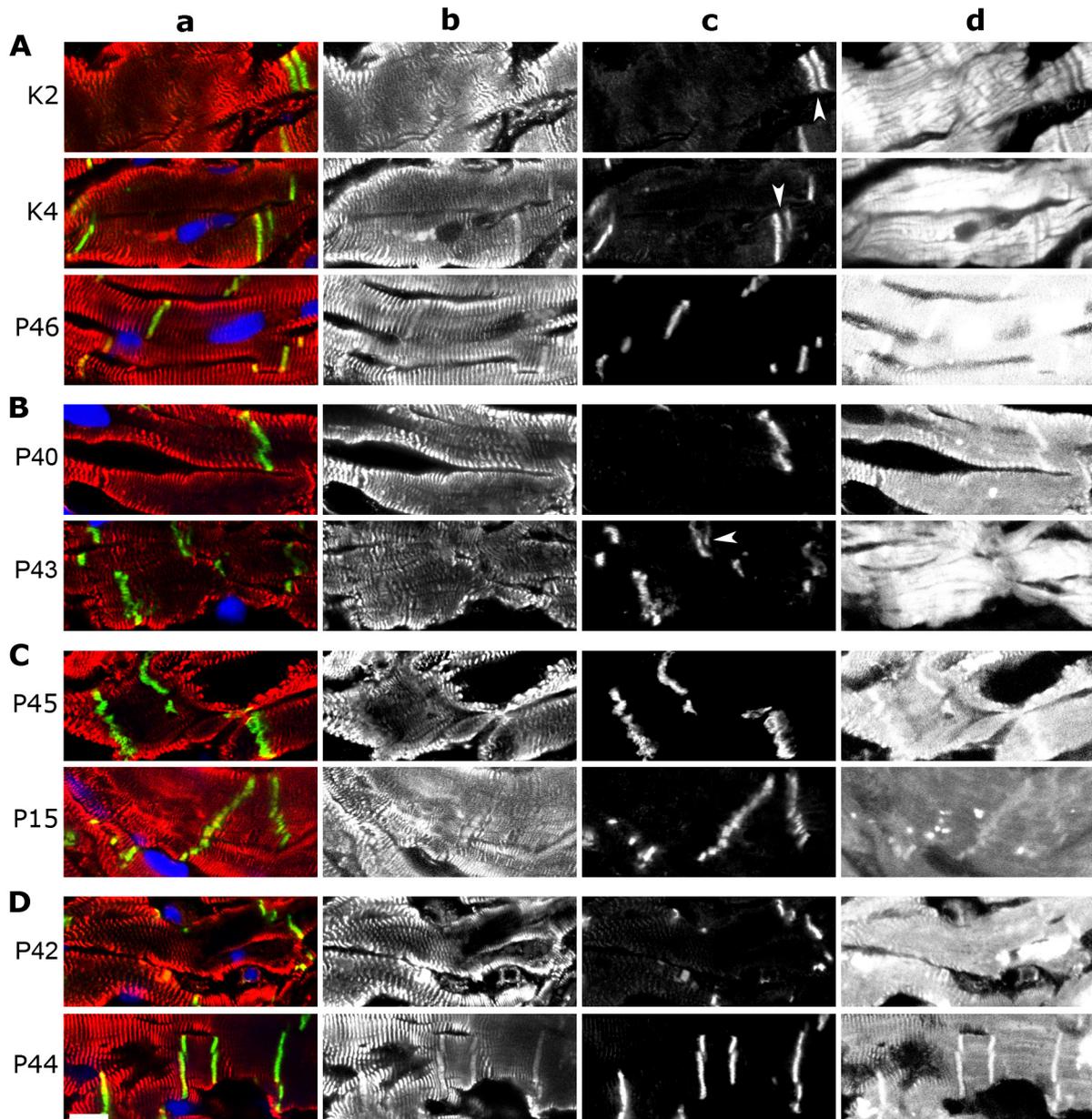


Abb. 16. Veränderungen in der Morphologie der AJ bei DCM. Vierfach IF markierte Kryoschnitte aus dem LV von 6 an DCM erkrankten Patienten (B,C,D), zwei regulären Kontrollen (Spender) und einer „falschen“ Kontrolle (A). Markierung durch mM primär AK gegen das ID und Z-Scheiben Protein α -Aktinin (a in rot, b), pR Primär AK gegen das AJ Protein β -Catenin (a in grün, c), Alexa633-Phalloidin für die Darstellung von F-Aktin (d) und DAPI für die der Kerne (a in Blau). (A) Das β -Catenin Signal von K2 ist im Vergleich zur K4 und P46 (KHK) breiter. P46 wurde aufgrund des sehr „gesund“ erscheinenden Gewebes ebenfalls als Kontrolle herangezogen. (B) P40, mit akuter DCM und MK, sowie P43 mit DCM *st. p.* MK weisen zumindest gegenüber K4 und P46 ein breiteres β -Catenin Signal an den ID auf. (C) Beide FDCM Fälle, P45 und P15, haben ebenfalls gegenüber den Kontrollen ein deutlich breiteres β -Catenin Signal ausgebildet. Bei der jüngeren Probe P45 ist das Signal besonders breit, auch im Vergleich zu K2. Hingegen sind bei (D) P42 und P44 mit iDCM keine Unterschiede zu erkennen. Breiteres β -Catenin Signal steht in Verbindung mit unregelmäßigen AJ und (Pfeil in c) verdoppelte ID, entstanden durch extreme Verzahnungen der Myozyten. Bei P15 und P44 erkennt man ebenfalls eine gewisse Myozytenverzahnung. Skala 10 μ m

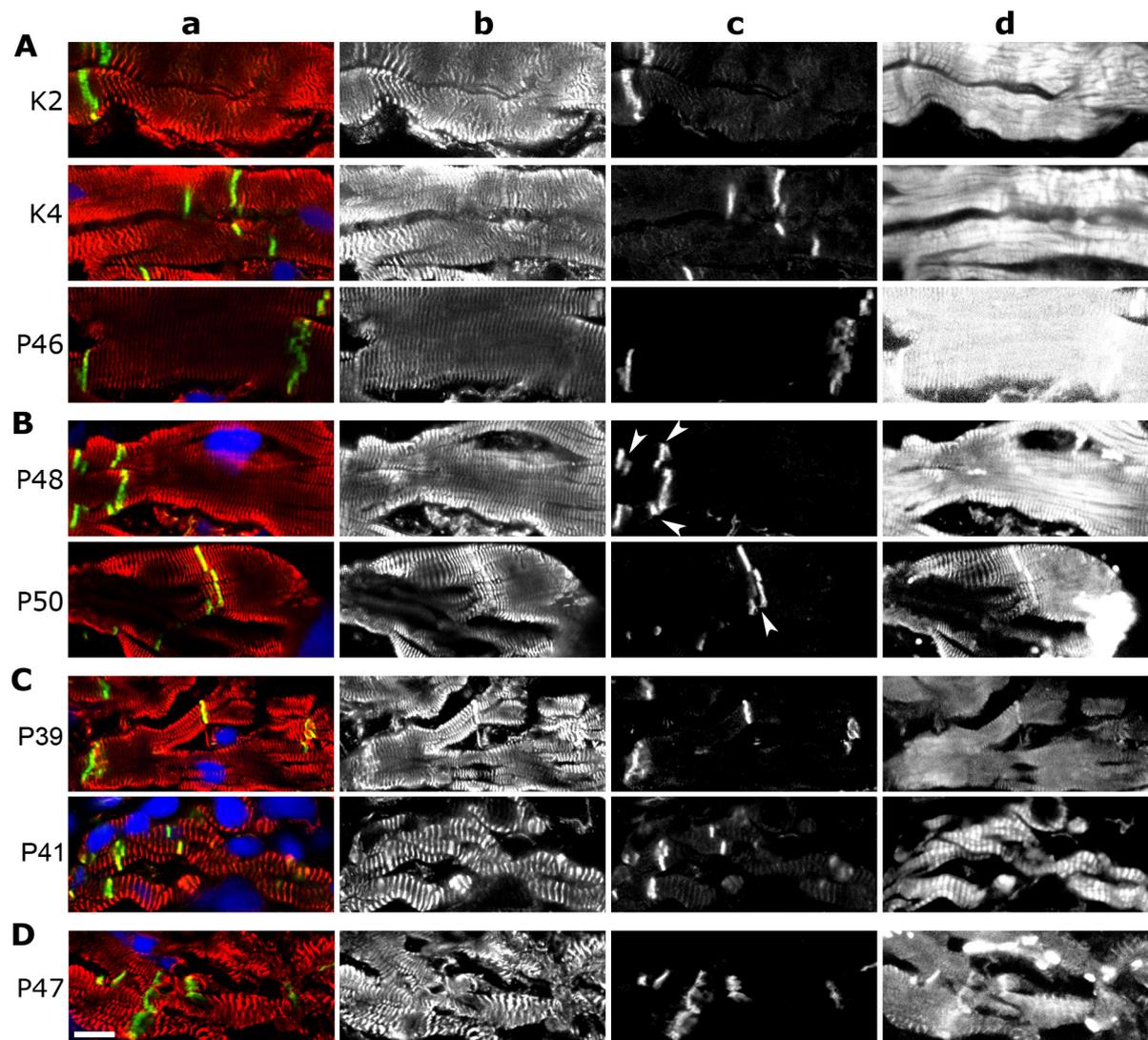
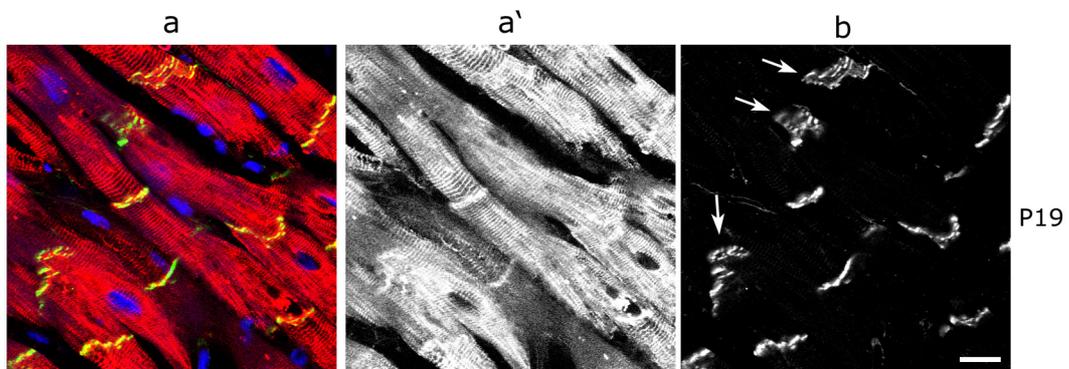
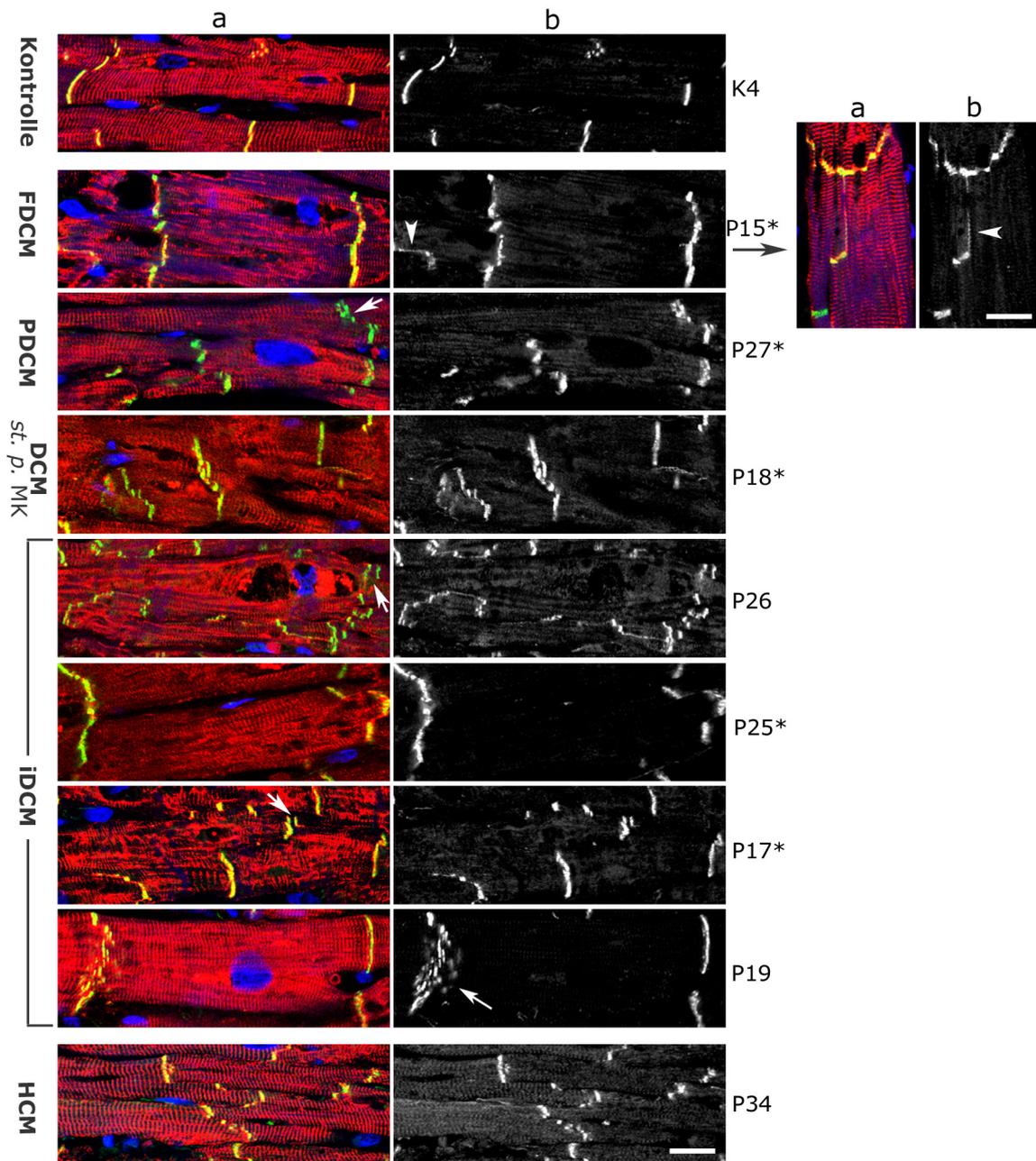


Abb. 17. Vergleich der Morphologie von AJ im LV von (A) zwei Kontrollen sowie einer „falschen“ Kontrolle (P46), (B) zwei iCMP Patienten, (C) zwei jungen Patienten mit kongenitalen Herzdefekten und (D) einem Patienten mit ARVD. Vierfach immunfluoreszent markierte Kryoschnitte gegen das Z-Scheiben und ID Protein α -Aktinin (a in rot, b), AJ Protein β -Catenin (a in grün, c), Kernfärbung durch DAPI (a in blau) und F-Aktin durch Alexa633-Phalloidin (d). Es sind keine signifikanten Unterschiede in der Ausbildung des β -Catenin Signals bei beiden Patienten mit iCMP und beiden kongenitalen Herzdefekten zu erkennen. Morphologische Auffälligkeiten bei P41 (14a) mit TGA sind neben dem vorherrschenden *Myocyte Disarray* (auch bei P39 mit HRHS ausgebildet), die auch im Vergleich zur jüngeren HRHS Probe (12a) äußerst kleinen und demnach aberranten Myozyten. Folglich ist eine erhöhte Anzahl an kleineren AJ enthalten. Bei ARVD sind sehr unregelmäßige teilweise breitere AJ ausgebildet. Eine weitere Auffälligkeit ist ein immenses *Myocyte Disarray* mit hochgradiger Fibrose. In den Schnitten beider Patienten mit iCMP sind die Myozyten sehr groß. (Pfeile in c) außerdem gibt es verdoppelte ID, entstanden durch extreme Verzahnungen der Myozyten. Skala 10 μ m



← Abb. 18. Darstellung der Veränderungen an AJ anhand vierfach immunfluoreszent markierten Paraffinschnitten aus dem humanen LV von einer Kontrolle, 7 DCM Proben und einer HCM Probe. Markierung mit mM AK gegen das Intermediärfilament Protein Desmin (a in rot, a'), einem pR AK gegen das AJ Protein β -Catenin (a in grün, b), Kernfärbung mit DAPI (blau in a). Bei 5 der DCM Proben ist das β -Catenin Signal an den AJ im Vergleich zur Kontrolle und HCM Probe zumindest eine Spur breiter (*). Bei P25 mit iDCM und P15 mit FDCM war das β -Catenin Signal am stärksten ausgebildet. Bei P15 war β -Catenin oft lateral an den Z-Scheiben zu finden (w in b). Das verbreiterte β -Catenin Signal steht mit unregelmäßigeren (stark gestuften) ID in Verbindung, was auf eine stärkere Faltung des Sarcolemmas hindeutet. P19 mit iDCM weist eine besonders starke Interdigitation zwischen benachbarten Zellen auf (weißer " in b). Die Zell-Zell Kontakte müssen regelrecht „ausgefranst“ sein (siehe auch Volldarstellung unten), wobei kein breiteres AJ Signal ausgebildet ist. Bei P26 mit iDCM ist die Probenqualität auffallend schlecht und das β -Catenin Signal im Vergleich zu den anderen DCM Proben sehr gering ausgeprägt, außerdem sind verdoppelte AJ zu sehen (weißer Pfeil in a). Skala 20 μ m

nachteilig auf das Verhalten bei der Schnitterstellung und die Erhaltung der Antikörperepitope ausgewirkt haben könnte. Weiters kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei Probenentnahme die Zeitspanne bis zur endgültigen Fixierung des Gewebes zu lang war, wodurch es zum Einsetzen der Autolyse gekommen ist. Für letzteres könnten die teilweise abgebauten Myofibrillen ein Indiz sein. Im Grunde bedeutet dies, dass diese Probe nicht sehr zuverlässig ist.

Zwischen den AJ der einzigen HCM Probe (P34, m., 12a) und der Kontrolle K2 ist in den Paraffinschnitten kein markanter Unterschied zu erkennen.

Bemerkenswert ist, dass sowohl in den Kryoschnitten als auch den Paraffinschnitten von Patienten mit FDCM, d.h. einer DCM mit positiver familiärer Anamnese und demnach genetischer Ursache, im Vergleich zu anderen DCM Proben der Unterschied in der Ausprägung des β -Catenin Signals beim Vergleich mit dem Kontrollgewebe am gravierendsten ist (siehe Abb.16 C & Abb. 18) und am meisten den Erwartungen der Ergebnisse aus MLP $-/-$ Maus und dem entsprechenden WT entspricht.

Die Analyse der Expressionsmengen von β -Catenin mittels Immunoblot zeigt ein durchaus ähnliches Ergebnis (Abb. 24 D). Bei allen drei getesteten FDCM Proben (P15, P45, P37) ist eine erhöhte Expression erkennbar. Jedoch sind bei allen anderen getesteten DCM Proben (idiopathisch, ischämisch, *st. p.* Myokarditis, bis hin zu perinatal manifestiert) die Expressionslevel von β -Catenin äußerst heterogen.

Der Unterschied in der Expression von β -Catenin zwischen den Kontrollen fällt im Vergleich sehr gering aus, wobei er bei K2 eine Spur höher liegt.

Im LV von P41 ist der Expressionslevel von β -Catenin erhöht. Möglicherweise kommt dies durch die in der Immunhistologie ersichtliche vermehrte Anzahl an AJ innerhalb des Gewebes zustande.

Die Expressionslevel von β -Catenin bei iCMP und HCM sind ebenfalls nicht hochreguliert.

3.4.2. Linksventrikuläre Veränderungen in der Organisation von Gap Junctions (GJ) und der Expression von Connexin43 bei Herzerkrankungen

Die Immunfluoreszenzanalyse der Kryoschnitte vom linken Ventrikelmyokard verschiedener Patienten mit Herzversagen im Endstadium, die gegen das Gap Junction Protein Connexin43 angefärbt wurden, offenbart eine heterogene Ausbildung des Connexin43 Signals an den durch α -Aktinin dargestellten ID (Abb. 19). Das stärkste Signal ist bei beiden Patienten mit einem kongenitalen Herzdefekt zu erkennen. Es sind dabei deutlich mehr Connexin43 Spots angefärbt. In P39 mit einem HRHS mit Triskupidal- und Pulmonalatresie (w., 12a; siehe auch Tab.1) liegen diese in idealer Weise linear an den polaren Zell-Zell Kontakten angeordnet vor, wobei oftmals schön zu erkennen ist wie größere Gap Junctions die Peripherie der ID begrenzen (Abb. 19 B). Bei P41 mit TGA mit einer diskordanten VA Verbindung (m., 16a) ist zwar eine immense Anzahl an Connexin43 Spots angefärbt, jedoch liegen diese als viele Einzelpunkte im longitudinal geschnittenen Herzgewebe verteilt vor (Abb. 19 C).

Vom Spendergewebe liegt keine Immunfluoreszenzfärbung der Kryoschnitte gegen das Connexin43 vor. Aufgrund einer wahrscheinlich fehlerhaften Antikörper Charge, bei der keine spezifische Reaktion des gegen das Connexin43 Protein gerichteten polyklonalen Kaninchenantikörpers zu beobachten war, konnten keine Kryoschnitte des Spendergewebes und von einigen anderen mit der gleichen Charge behandelten an DCM erkrankten Patienten, erfolgreich angefärbt werden.

Im Vergleich zu den kongenitalen Herzdefekten zeigt die IF gegen das Connexin43 bei P46 mit KHK ein relativ geringes Connexin43 Signal an den ID (Abb. 19 A). Die Form der Myozyten als auch deren Anordnung ist jedoch sehr regelmäßig.

Die Immunfluoreszenzanalyse der Kryoschnitte vom linken Ventrikelmyokard der MLP Knockoutmaus, dem Mausmodell für die DCM (Arber et al., 1997), zeigt eine deutliche Reduktion an Connexin43 Gap Junctions im Vergleich zum entsprechenden WT (Abb. 15 B). Entgegen diesen Ergebnissen, ist in den Kryoschnitten der drei an DCM erkrankten humanen Patienten, beim Vergleich mit linksventrikulären markierten Gewebeschnitten anderer Patienten, nicht immer eine eindeutige Reduktion des Connexin43 Signals ersichtlich (Abb. 19).

Eine deutliche Reduktion an Gap Junctions am Niveau der Lichtmikroskopie ist bei P45 (w., 15a) mit einer FDCM zu erkennen (Abb.19 J & J'). Die Myozyten sind zusätzlich übermäßig lang und dünn gestaltet, trotz des relativ jungen Alters der Probe (15a, siehe auch Tab.1), wodurch folglich weniger ID innerhalb einer Aufnahme zu finden sind (siehe auch Abb. 10). Bei P43 mit einer DCM *st. p.* Myokarditis ist ebenfalls ein reduziertes Signal erkennbar, wobei die Schnittqualität schlecht ist und eine Autolyse des Gewebes zu erkennen ist, was diese Probe nicht repräsentativ macht. Bei P42 ist keine Reduktion von Connexin43 erkennbar und von P42 und P43 konnte die Bandengröße des Connexin43 nicht vermessen werden.

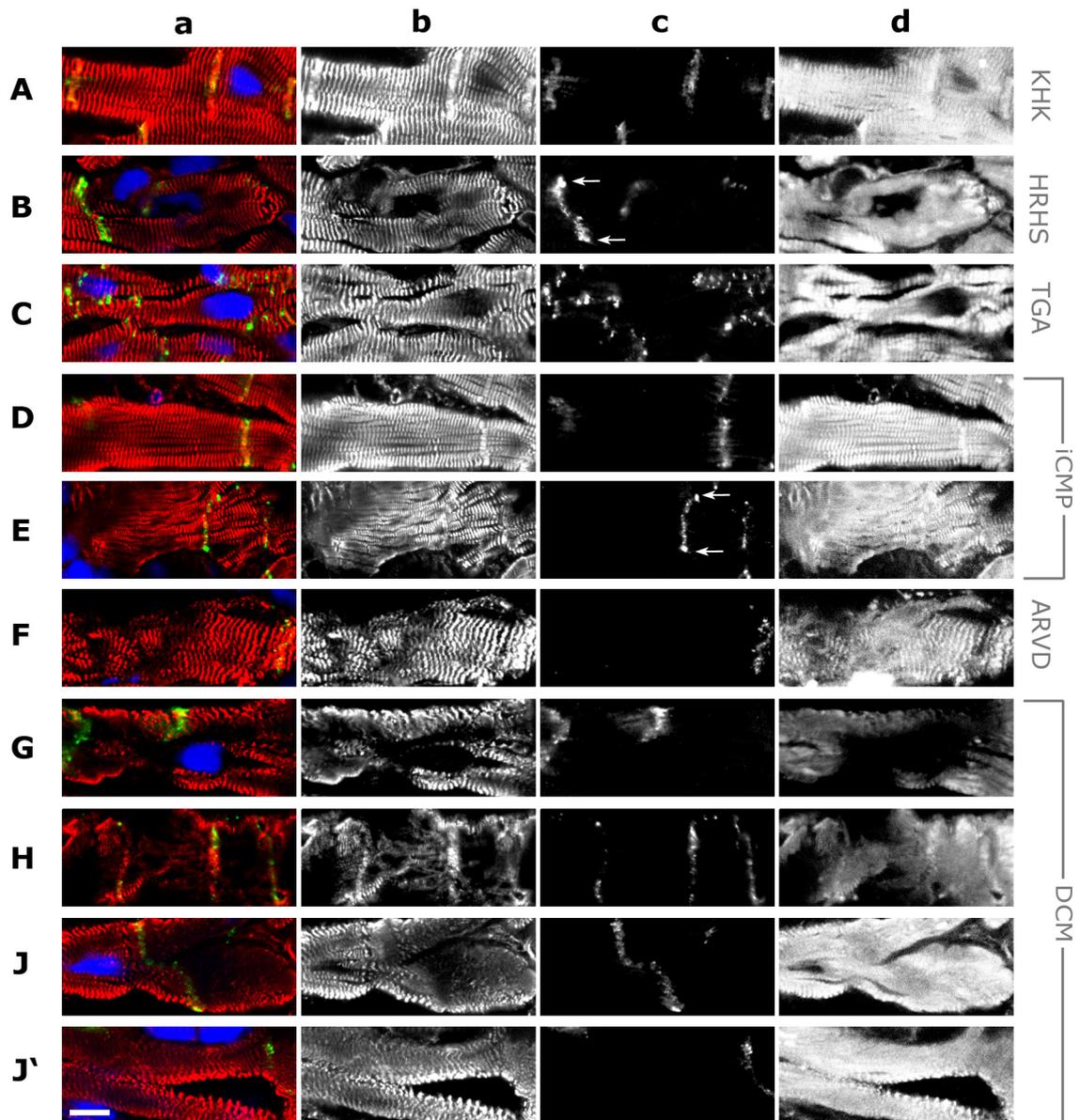


Abb. 19. Charakterisierung des Connexin43 Signals im LV bei: (A) P46 mit KHK; 2 kongenitalen Herzdefekten (B) P39 mit HRHS und (C) P41 mit TGA; 2 iCMP (D) P48 und (E) P50; (F) P47 mit ARVD; 3 DCM (G) P42 mit iDCM, (H) P43 mit DCM *st. p. MK*, (J, J') P45 mit FDCM. IF Markierung der Kryoschnitte durch Kombination aus (a in rot, b) mM AK gegen das Z-Scheiben Protein Aktinin, (a in grün, c) pR AK gegen das Connexin43, (d) Alexa633-Phalloidin für die Darstellung von F-Aktin und (a in blau) DAPI Kernfärbung. Eine heterogene Ausbildung des Connexin43 Signals ist ersichtlich. Eindeutig reduziertes Signal innerhalb der DCM Patienten ist nur bei P45 mit FDCM ausgebildet. Durch die immens elongierte Zellgestalt sind nur sehr wenige GJ in einer Aufnahme enthalten und die Anzahl der Connexin43 Spots ist innerhalb der ID signifikant reduziert. Bei P43 ist ebenfalls eine Reduktion an GJ innerhalb der ID erkennbar. Diese ist jedoch aufgrund der schlechten Probenqualität nicht repräsentativ. Bei ARVD ist das Connexin43 Signal ebenfalls reduziert. Bei beiden iCMP Patienten ist das Signal heterogen. Das stärkste Connexin43 Signal ist bei beiden Herzdefekten ausgebildet, wobei P39 eine reguläre und P41 eine aberrante Anordnung der GJ aufweist. (Pfeile in c) Größere GJ begrenzen die Peripherie der ID.

Skala 10 μm

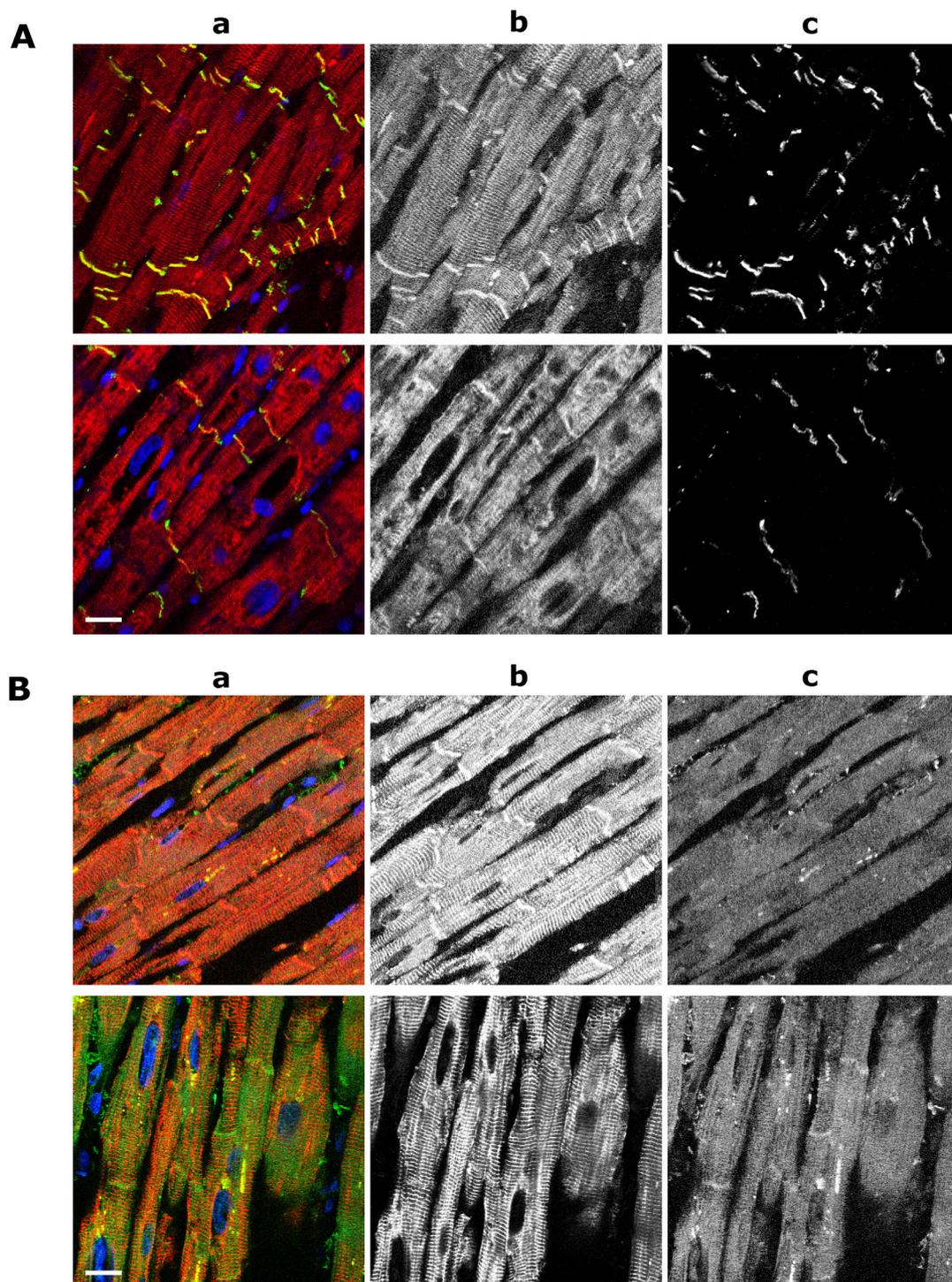


Abb. 20. Darstellung der Gap Junctions an Paraffinschnitten aus dem linken Ventrikelmyokard humaner Proben. Dreifache IF Markierung gegen das Intermediärfilament Desmin (a in rot, b), das Gap Junction Protein Connexin43 (a in Grün, c) sowie eine Kernfärbung durch DAPI. Der in den Kryoschnitten verwendete pR Primäranikörper gegen (B) cx43, von *Zymed*, zeigt keine spezifische Reaktion. Die Markierung mit dem pR Primäranikörper gegen (A) cx43, von *Abcam*, zeigt ein durchgehendes Signal an den ID, anstatt wie das sonst typische aus mehreren linear angeordneten Einzelpunkten strukturierte Gap Junctions Muster. Die obere Reihe (A & B) zeigt jeweils das Spendergewebe K4, die untere Reihe jeweils das von P19 mit DCM.

Ein mit P45 vergleichbares Connexin43 Signal ist bei P47 mit Arrhythmogener rechtsventrikulärer Dysplasie vorzufinden (Abb. 19 F). Es ist eine Reduktion an Gap Junctions innerhalb der ID zu erkennen. Die ID sind stark unregelmäßig ausgebildet, was sich dann auch beim GJ Muster widerspiegelt.

Der bei der IF Markierung von Kryoschnitten verwendete polyklonale Antikörper gegen das Connexin43 (von *Zymed*) funktioniert auf Paraffinschnitten nicht (Abb. 20 B). Demnach wurden unter den gleichen Bedingungen die Paraffinschnitte mittels einem polyklonalen Antikörper gegen Connexin43 von *Abcam* markiert. Das Signal dieses Antikörpers liefert jedoch nicht das erwartete typische Gap Junctions Muster, wonach die Gap Junctions als linear innerhalb der ID angeordnete Einzelpunkte erscheinen, sondern ähnelt bei allen markierten Proben einem β -Catenin Signal (Abb. 20 A). Daher wurde auf eine Analyse dieser gefärbten Proben verzichtet.

Die Immunoblots der SDS-Proben aus dem linken Ventrikel von 19 Patienten (14 DCM, 2 iCMP, 1 HCM, 1 TGA, 1 KHK) mit Herzversagen im Endstadium zeigen im Vergleich zum nicht transplantierten Spendergewebe heterogene Connexin43 Expressionsmengen (Abb. 24 E). Selbst innerhalb der einzelnen Gruppen der dilatativen Kardiomyopathie, das heißt innerhalb der perinatal manifestierten (P30, P27), infolge einer Myokarditis manifestierten (P18, P43) oder idopatischen größtenteils wahrscheinlich ischämischen DCM, als auch Familiärer DCM (P45, P37, P15), als auch innerhalb der iCMP (P48, P50) ist keine einheitliche Regulierung des Proteins erkennbar. Die Expressionslevel der Kontrollproben weichen hingegen nur sehr gering voneinander ab.

Erwähnenswert scheint, dass die Analyse der Immunoblots von SDS-Proben der beiden jungen FDCM Fälle (P37, mit 8a & P45, mit 15a) eine deutliche Herunterregulierung von Connexin43 aufzeigt. Die Probe P15 zeigt hingegen einen zum Spendermyokard ähnlichen Expressionslevel, wobei die FDCM Erkrankung der Patientin seit dem 27. Lebensjahr bekannt war und es demnach 29 Jahre bis zum Zeitpunkt der Probenentnahme andauerte. Folglich war das Herzgewebe einem längeren Zeitraum gesteigerten physiologischen Anforderungen ausgesetzt, was durchaus zu adaptiven Umbauprozessen geführt haben könnte, die eine ursprüngliche Herunterregulierung des Proteins wieder wettgemacht hat. Leider stehen keine Connexin43 gefärbten Gewebeschnitte der Patientin für einen subzellulären Vergleich zur Verfügung.

Bei P41 ist trotz geringerer Ladungsmenge die Connexin43 Bande so stark, dass sie für die weitere Analyse nicht vermessen werden konnte (Abb. 24 E). Die Hochregulierung des Proteins stimmt mit den Ergebnissen der konfokalen Mikroskopie überein (Abb. 19 C, Abb. 23 C).

3.4.3. Charakterisierung der Links- und rechtsventrikulären Organisation der Adherens und der Gap Junctions des gleichen Patienten anhand konfokaler Mikroskopie

In den IF markierten Kryoschnitten von P46 (KHK, AS, siehe auch Tab. 1), ist ein links- und rechtsventrikulärer Unterschied in der Ausprägung des Signals der ID auffällig. Im rechten Ventrikel ist das Signal an den ID signifikant breiter ausgebildet. Dies betrifft nicht nur die durch β -Catenin dargestellten Adherens Junctions (Abb. 5 c, d, Abb. 21 A), sondern setzt sich auch bei den Connexin43 Gap Junctions (Abb.23 A) und bei den durch das Z-Scheiben Protein α -Aktinin angefärbten ID fort (Abb.4 c, d).

Um abzuklären, ob es sich bei dem beobachteten links- und rechtsventrikulären Unterschied in der Ausprägung der ID bei P46 um einen generellen kammerabhängigen Unterschied handelt, wurden von einigen wenigen Proben die immunfluoreszent markierten Kryoschnitte gegen Proteine der Interkalierenden Scheiben des linken und rechten Ventrikelmyokards am konfokalen Mikroskop miteinander verglichen.

Der Vergleich zeigt ähnliche links und rechtsventrikuläre Signalunterschiede des β -Catenin Proteins bei beiden jungen Myokardproben mit kongenitalen Herzdefekten (Abb. 22 B, C). Im rechten Ventrikel sind beim HRHS (P39, w. 12a) und der TGA (P41, m. 14a) breitere AJ präsent.

Bei der dilatativen Kardiomyopathie ist bei 2 von 3 Proben ein etwas geringerer links- und rechtsventrikulärer Unterschied in den durch β -Catenin markierten Adherens Junctions erkennbar (Abb. 21). Bei P43 mit DCM und *st. p.* Myokarditis ist kein Unterschied in der Breite der AJ zu beobachten, hingegen ist sowohl bei P40 mit akuter DCM und Myokarditis, als auch bei P42 mit idiopathischer (möglicherweise ischämischer) DCM ein Unterschied ersichtlich. Dies hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass linksventrikulär in den immunfluoreszent markierten Kryoschnitten bei 40 und P43 die AJ breiter ausgebildet sind. Auffallend ist weiter, dass P43 sowohl rechts als linksventrikulär sehr unregelmäßige gewundene AJ und ein enormes *Myocyte Disarray* aufweist (Abb. 21 C, Abb. 16 B) Bei der Immunoblot Analyse konnten leider genau von diesen 3 Proben die β -Catenin Banden nicht vermessen werden.

Weiters ist im RV von P40 (m., 16a) mit akuter DCM, wahrscheinlich durch die Myokarditis verursacht (der Patient litt außerdem an Becker Muskeldystrophie, die auch zur DCM Erkrankung führen kann), das häufige Vorkommen von lateral zur Achse der Myozyten liegenden AJ als auch GJ markant (Abb. 21 A, Abb. 23 G). Ein *Myocyte Disarray* ist im linken als auch im rechten Ventrikel, im letzteren sogar stärker, ausgebildet.

Zu beachten ist jedoch, dass der RV von P40 sich durch eine schlechte Gewebequalität auszeichnet. Eine Autolyse des Gewebes scheint bereits eingesetzt zu haben, nachdem beim α -Aktinin Signal oftmals kein quergestreiftes Z-Scheiben Muster der Myofibrillen zu erkennen ist. Die Aktinfilamente, die mittels Phalloidin sichtbar gemacht wurden, weisen auch nur sehr selten – selbst in relaxierten Muskelzellen- eine Streifung auf. Wahrscheinlich erfolgte die Fixierung der Gewebeprobe in flüssigen Stickstoff bei der Entnahme nicht rasch genug.

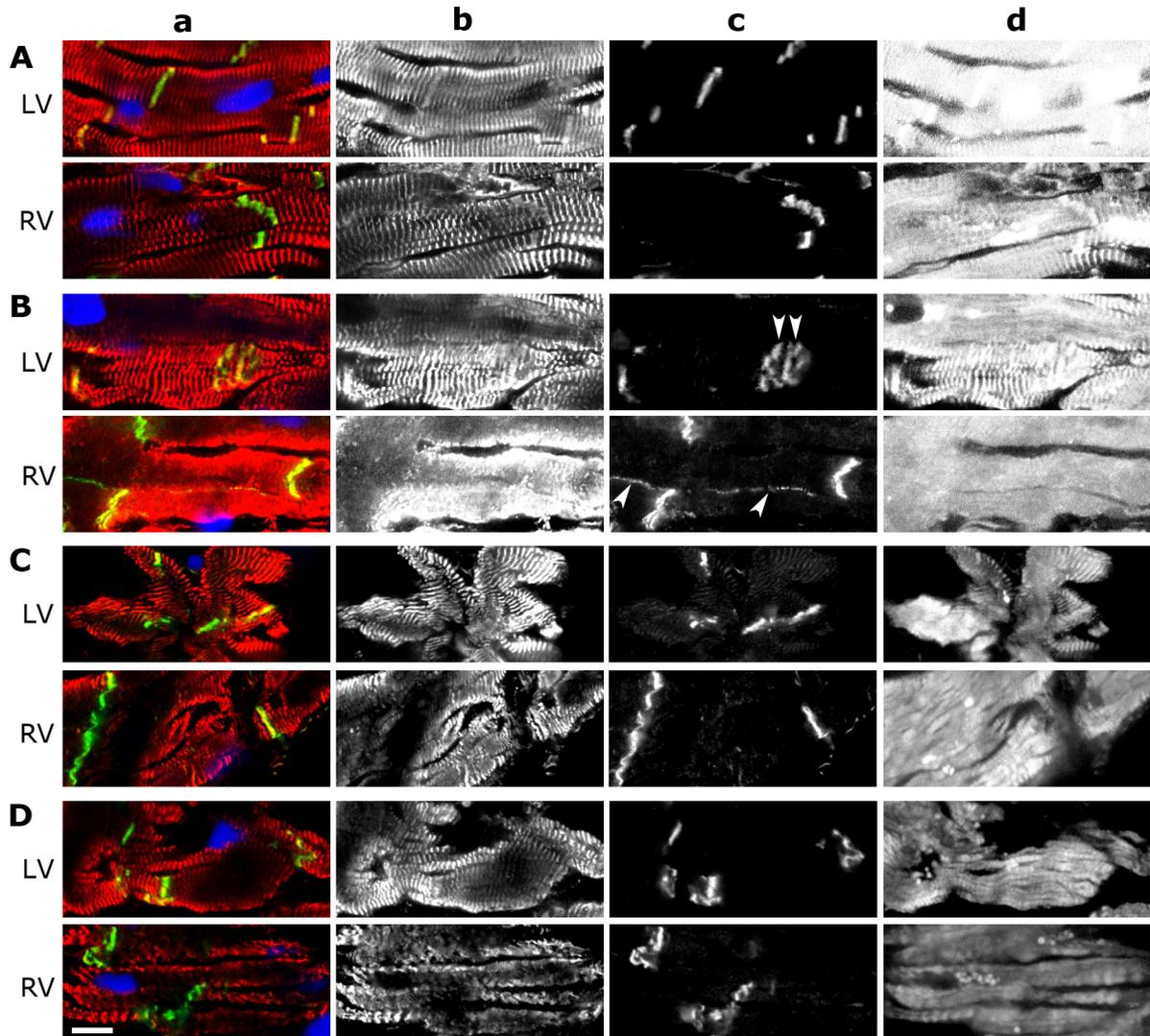


Abb. 21. Vergleich des β -Catenin Signals zwischen LV und RV bei (B-D) drei DCM Patienten an vierfach immunfluoreszent angefärbten Kryoschnitten. Markierung mit einem mM AK gegen das ID und Z-Scheiben Protein α -Aktinin (a in rot, b), einem pR AK gegen das AJ Protein β -Catenin (a in grün, c), Alexa633-Phalloidin für die Darstellung von F-Aktin (d) und DAPI für die Darstellung der Kerne (a in Blau) angefärbt. (A) Die „falsche“ Kontrolle P46 mit KHK, besitzt kontinuierlich ein rechtsventrikulär breiter ausgebildetes β -Catenin Signal. Bei den DCM Patienten sind kaum Unterschiede im β -Catenin Signal zu erkennen. Bei (B) P40 (aDCM, MK) und (C) P42 (iDCM) ist im RV das Signal eine Spur breiter. Im LV von 42 ist stellenweise ein immenses *Myocyte Disarray* ausgebildet. In (B, LV) Areal aus longitudinalen Schnitt. Das Auffälligste in den Kryoschnitten des RV von P40 war die Ausbildung von lateralen AJ (weiße Pfeile in c). Die Probenqualität des RV ist jedoch in allen Schnitten sehr schlecht. Verzahnung der Myozyten hier ersichtlich im LV von P40 (weiße Pfeile in c). (D) P43 mit DCM *st. post* MK. Skala 10 μ m.

Bei der Arrhythmogenen rechtsventrikulären Dysplasie (P47) ist, in beiden Ventrikeln ein starkes *Myocyte Disarray* als auch eine für die Erkrankung typische Degeneration der Myofibrillen und Myozyten, u.a. durch eine beachtlich ausgeprägte Fibrose, markant. In beiden Ventrikeln sind die AJ sehr unregelmäßig strukturiert, was eine erhöhte Faltung der Plasmamembran signalisiert, weisen keine relevanten Unterschiede auf (Abb. 22 A).

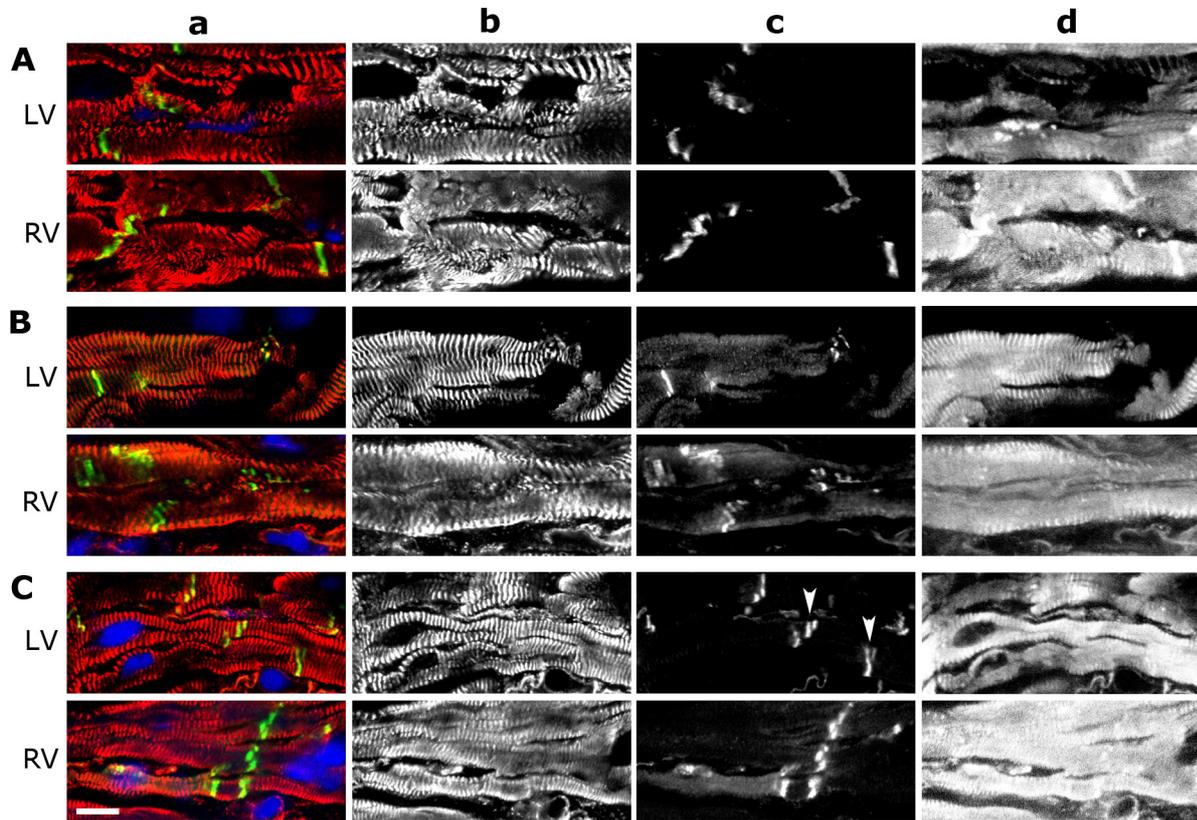
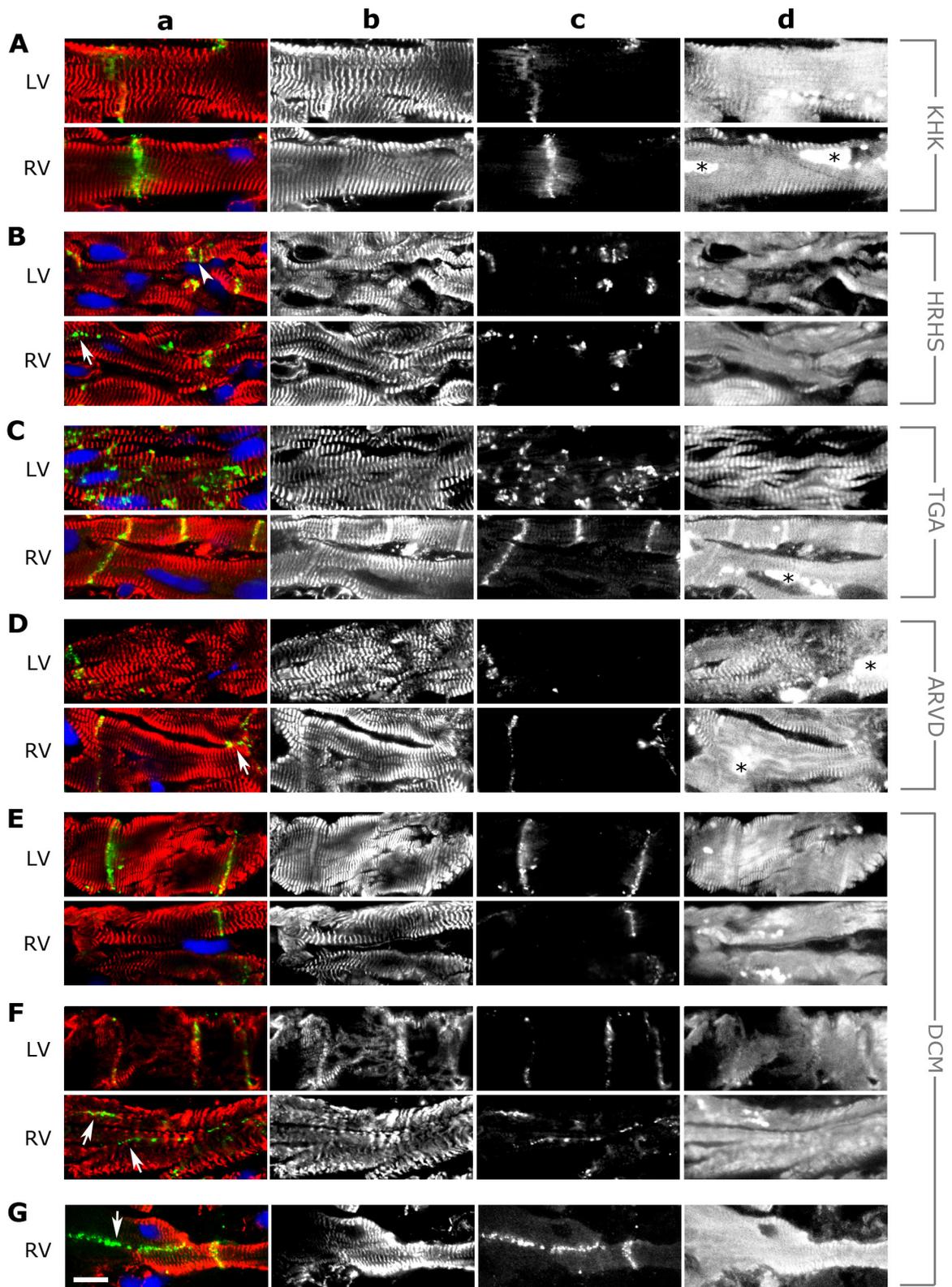


Abb. 22. Vergleich des β -catenin Signals zwischen LV und RV bei (A) einem ARVD Patienten, (B) einem HRHS und (C) einem TGA Patienten, an vierfach immunfluoreszent angefärbten Kryoschnitten. Markierung mit einem mM AK gegen das ID und Z-Scheiben Protein α -Aktinin (a in rot, b), einem pR AK gegen das AJ Protein β -Catenin (a in grün, c), Alexa633-Phalloidin für die Darstellung von F-Aktin (d) und DAPI für die Darstellung der Kerne (a in Blau) angefärbt. Das β -Catenin Signal ist im RV der Patienten mit einem kongenitalen Herzdefekt (B-C, c) deutlich breiter im Vergleich zum LV. Bei ARVD ist kein deutlicher Unterschied zu erkennen. Alle Proben weisen ein beachtliches *Myocyte Disarray* im Gewebe auf. (weiße Pfeile) weisen auf Verzahnungen der Myozyten . Skala 10 μ m.

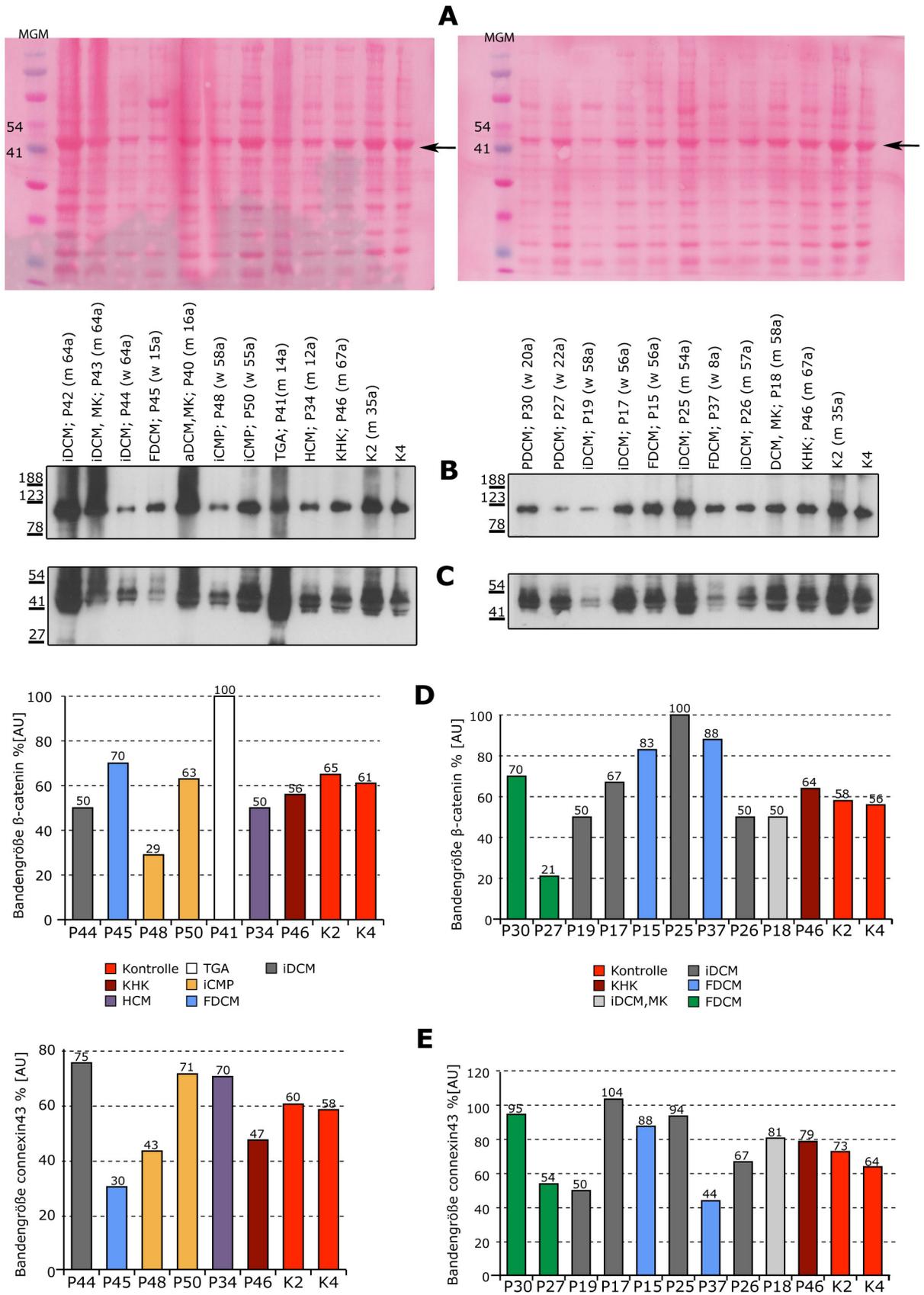
Beim Vergleich der Gap Junctions zwischen dem linken und rechten Ventrikel der gleichen Probe sind im Gegensatz zu den Adherens Junctions nur markante Unterschiede in der Anordnung ersichtlich, nicht jedoch in der Breite des Connexin43 Signals (Abb. 23). Eine Ausnahme bildet wie bereits vorher erwähnt, die einzige Koronare Herzerkrankung, P46. Wobei hier nicht ausgeschlossen werden kann, dass der Unterschied in der Ausbildung des Connexin43 Signals zwischen dem linken und rechten Ventrikel, durch eine suboptimale Antikörperreaktion verursacht sein könnte. Ausschlaggebend für diese Vermutung ist die nicht klar ersichtliche Abgrenzung der Gap Junctions als linear aneinander anliegende Einzelpunkte (Abb. 23 A).



←-- Abb. 23. Vergleich des Signals und Verteilung von Connexin43 Gap Junctions im linken und rechten humanen Ventrikelmuskard verschiedener Patientenproben anhand vierfach immunofluoreszent markierter Kryoschnitte. Markierung durch Kombination aus (a in rot, b) mM AK gegen das Z-Scheiben Protein α -Aktinin, (a in grün, c) pR AK gegen das Connexin43, (d) Alexa633 Phalloidin für die Darstellung von F-Aktin und (a in blau) DAPI für die Darstellung der Kerne. Bei (A) P46 mit KHK ist im RV das Gap Junctions Signal deutlich breiter. Bei allen übrigen Proben (C-F) ist kein signifikanter Unterschied in der Breite des Connexin43 Signals erkennbar. Die Unterschiede liegen in der Anordnung der GJ. Laterale Tendenz von GJ (a, weiße Pfeile) im RV bei (B) P39 mit HRHS (D) P47 mit ARVD, (F) P43 mit DCM *st. p.* MK und (G) P40 mit aDCM und MK. Bei (C) P41 mit TGA ist im LV eine Vielzahl an sehr kleinen Gap Junctions zu finden, die nicht nur an den polaren Enden der Myozyten zu finden sind sondern aufgelöst als Einzelpunkte auftreten und auch lateral zu finden sind. Im RV von TGA sind die GJ hingegen regelmäßig schön an den polaren Zell-Zell Kontakten zu finden. Die Myozyten und Myofibrillen sind auffällig schöner angeordnet. (*) LFG; (weiße Pfeilköpfe) weisen auf Verzahnungen der Myozyten. Skala 10 μ m.

Im Gegensatz zu der Anordnung der Gap Junctions im linken Ventrikel ist im rechten Ventrikel bei einigen Proben eine laterale Tendenz zu erkennen. Lateral zur Längsachse der Kardiomyozyten angeordnete Gap Junctions sind bei P39 mit HRHS, P47 mit ARVD und zwei DCM Proben (P40, P43) vorhanden. Daraus ist zu schließen, dass das Vorkommen von lateralen Gap Junctions auch nicht einer bestimmten Herzerkrankung zugeordnet werden kann. Der größte Zusammenhang besteht jedoch sicherlich mit dem Vernarben des Gewebes und den Druckverhältnissen im Herzen und mit folglich induzierten Umbauprozessen in den Herzzellen. Rechtsventrikulär war in den Proben sowohl eine stärkere Fibrose als auch ein stärkeres *Myocyte Disarray* beobachtbar.

Bei P41 ist der rechts- und linksventrikuläre Unterschied in der Anordnung der Gap Junctions am gravierendsten. Die P41 litt unter einem kongenitalen Herzdefekt, der Transposition der großen Arterien mit einer diskordanten Ventrikulo-Atrialen Verbindung. Bei einer TGA mit einer diskordanten VA Verbindung ist der Blutdruck im RV erhöht und im LV erniedrigt und resultiert in einem relativ dünnwandigen LV (Karl & Kirshbom, 2006). Die Patienten weisen demnach eine kontinuierliche Linksinsuffizienz auf. Im linken Ventrikel ist die Anordnung der Gap Junctions im Gewebe als regelrechter „Sternenhimmel“ ausgeprägt, d.h. als viele Einzelpunkte die nicht in klar abgegrenzten linearen Gruppen an den polaren Enden der Zelle angeordnet sind (Abb. 23 C). Demzufolge müsste P41 unter enormen Arrhythmien gelitten haben. Jedoch sind keine klinischen Daten dazu von P41 vorhanden. Im rechten Ventrikel ist die polare, klar abgegrenzte lineare Anordnung der Gap Junctions gegeben. Die Myozyten sind auch in vielen Arealen größer und regelmäßiger (Vergleiche auch mit Abb. 22 C).



←-Abb. 24. Expressionslevel des Gap Junctions Proteins Connexin 43 und des Adherens Junctions Proteins β -Catenin in SDS-Proben aus dem linken Ventrikelmyokard von 18 Patienten mit Herzversagen im Endstadium (14 DCM, 2 iCMP, 1 HCM, 1 TGA, 1 KHK) und 2 Kontrollproben (K2, K4). Auftrennung der Proteine durch Western Blotting von einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel. (A) Die Ponceau Red Färbung vom Blot zeigt unterschiedliche Ladungsmengen der verschiedenen SDS-Proben. Bei ungefähr 40kDa liegen die Aktin Banden (schwarzer Pfeil). (B) Durch mM a Connexin43 Primärantikörper detektierte typische doppelte Proteinbanden bei ungefähr 43kDa. Die untere Bande, d.h. mit geringerem Molekulargewicht, stammt vom dephosphorylierten Connexin und die obere Bande vom phosphoryliertem Connexin. (C) Durch pR anti β -Catenin detektierte Banden bei ca. 94kDa. (D) Gemessene Bandenintensität von β -Catenin genormt auf die Aktinbande des durch PonceauRed angefärbten Blots. (E) Bandenintensität von Connexin-43 genormt auf die Aktinbande des durch PonceauRed angefärbten Blots. Beide Gele wurden in der gleichen Versuchsreihe geblottet, wobei die Belichtungszeiten der Gele für das jeweilige Protein jedoch nicht optimal gleich sind, wodurch keine weitere statistische Analyse durchgeführt wurde. Die Lanes der SDS-Proben von 3 DCM Patienten (P42, P43, P40) sind überladen, wonach die Banden nicht vermessen werden konnten. Bei P41 mit TGA ist Connexin43 hingegen, beim Vergleich der Ladungsmenge am PonceauRed angefärbten Bot, hochreguliert. Die Expressionslevel von β -Catenin oder Connexin43 des Spendergewebes unterscheiden sich kaum voneinander. Ansonsten ist eine sehr heterogene Expression von Connexin43 und β -Catenin zwischen den einzelnen Proben von Herzversagen im Endstadium und auch innerhalb iCMP (gelb), PDCM (grün), oder iDCM Erkrankungen (grau) ersichtlich. Jediglich bei FDCM (blau) ist β -catenin bei allen 3 Proben hochreguliert und das Connexin43 bei den beiden jüngeren Patienten herunterreguliert. Bei der einzigen HCM Probe ist der β -Catenin Level nur sehr gering niedriger und der Connexin43 Level etwas erhöht.

3.4.4. Nebulin-verwandtes Protein (N-RAP)

Die dreifache Immunfluoreszenzfärbung gegen das N-RAP Protein, das M-Banden Protein Myomesin und DAPI-Kernfärbung der Kryoschnitte vom linken Ventrikel der MLP Knockoutmaus zeigt, bei normalem quergestreiften M-Banden Muster, deutliche Unterscheide im N-RAP Signal im Vergleich zum Wildtyp (WT) (Abb. 26 A).

Das Signal für das an den Interkalierenden Scheiben befindliche N-RAP ist viel stärker als beim WT. Im Zytoplasma der Myozyten ist N-RAP an den Z-Scheiben zu finden. Die mittels M-Banden Protein dargestellten Myofibrillen weisen bei MLP-/- eine unregelmäßigere subzelluläre Anordnung auf.

Die Immunfluoreszenzanalyse der mit einer Kombination gegen das N-RAP Protein, das Z-Scheiben Protein α -Aktinin, F-Aktin durch Alexa633-Phalloidin und Zellkerne durch DAPI markierten Kryoschnitte aus dem LV von 12 Patienten mit Herzversagen im Endstadium sowie 2 Kontrollproben zeigte keine solchen eindeutigen Unterschiede in der subzellulären Anordnung des N-RAP Proteins bei DCM Patienten (n=6) wie sie bei MLP -/- im Vergleich zum WT gegeben waren (Abb. 26 B).

Generell lassen sich in den Gewebeschnitten fast aller Proben, einschließlich der Kontrollproben, Kardiomyozyten finden welche zellautonom mehr N-RAP im Zytoplasma und an den Z-Scheiben enthalten, wie auch welche die sehr wenig -bis fast gar kein- zytoplasmatisches N-RAP besitzen (Abb. 25). Zytoplasmatisches an den Z-Scheiben angereichertes N-RAP befindet sich oft bevorzugt in der Peripherie der Myozyte. In den Kryoschnitten von der Kontrolle K2, des KHK Patienten (P46) war es sogar sehr oft an den Z-Scheiben um den Nucleus herum zu finden (Abb. 25 a, b). Das N-RAP Signal an den ID unterscheidet sich auch von Zelle zu Zelle. Dort wo zellautonom mehr zytoplasmatisches N-RAP an den Z-Scheiben vorhanden ist, ist das Signal an den ID auch breiter. Demnach besitzen

diese Kardiomyozyten soviel N-RAP, dass es nicht nur an den ID sondern auch an den Z-Scheiben angereichert wird.

Der Vergleich der Immunfluoreszenz-Aufnahmen der Kryoschnitte des LV verschiedener Proben zeigte immense zellautonome Anreicherungen von N-RAP an den Z-Scheiben und an den Interkalierenden Scheiben bei beiden FDCM Patienten (P15 und P45) und einem iDCM Patienten (P44) (Abb. 26). Das N-RAP an den ID dieser Proben zeigt im Vergleich zu den anderen Proben ein deutlich breiteres Signal. P44 litt unter einer DCM *st. p.* Aortenklappen und Mitralklappenersatz, was auf eine ischämische DCM schließen lässt (siehe Tab.1). Außerdem litt der Patient unter Diabetes was auch eine Kardiomyopathie verursachen kann.

Bei ARVD ist im LV wenig N-RAP präsent und das Signal hauptsächlich an den ID zu sehen. Im RV ist im Großteil der Kardiomyozyten ein stärkeres N-RAP Signal subzellulär an den Z-Scheiben und an den ID zu erkennen.

Für die Immunoblot Analyse der Expressionsmengen des N-RAP Proteins wurden zwei 4-12%ige SDS-Gradientengele mit SDS-Proben aus dem LV von 13 DCM Patienten, 2 iCMP Patienten, 1 kongenitalen Herzdefekt (TGA), 1 HCM Patienten, gemeinsam mit 1KHK und 2 Kontrollen aus dem Spendermyokard geladen (Abb. 24). Die Trennung des ca. 180kDa großen NRAP erfolgte am Gradientengel, weil das NRAP bei einer Trennung am 5%igen SDS-Gel vom ca. 190kDa/200kDa großen Myomesin und sarkomerischen Myosin überdeckt wird.

Die Detektion des Proteins ergab unterschiedliche Bandenintensitäten, die sich zum Teil durch ungleiche Ladungsmengen der SDS-Proben ergaben (Abb. 27), wodurch für die weitere Analyse die Bandenintensität vermessen wurden und auf die jeweiligen Mengen des kardialen Aktin genormt wurden. Die Expressionslevel von N-RAP im LV der DCM variieren stark, bei den meisten Proben ist jedoch ein zumindest ein leicht erhöhter Proteinlevel im Vergleich zu den Kontrollen erkennbar (Abb. 28 A). Bei P41 mit TGA ist der N-RAP Proteinlevel der SDS-Probe des LV im Vergleich zu den Kontrollen erniedrigt. Bei der einzigen SDS-Probe des LV eines HCM Patienten ist ein erhöhter Level an Protein im Vergleich zu den Kontrollen ersichtlich.

Die statistische Analyse mit *einfaktorierter ANOVA* ergab einen signifikanten Unterschied ($p=0,025$; $F=4,218$) zwischen der Kontrolle und den zusammengefassten Gruppen PDCM ($n=2$), FDCM ($n=3$), DCM *st.p.* MK ($n=3$), iDCM wahrscheinlich ischämisch ($n=4$) und iCMP ($n=2$). Eine Hochregulierung war bei iCMP, FDCM und iDCM, nicht jedoch bei PDCM und DCM *st.p.*, zu erkennen (Abb. 28 B). Die Mehrfachvergleiche durch den *Scheffé-Test* (Varianzhomogenität) zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe.

Die Proteinlevel der Kontrollen (und KHK) variieren im Vergleich zu den einzelnen Gruppen nur sehr wenig (Abb. 28 A).

Zu beachten ist, dass für eine aussagekräftige statistische Analyse die Kontrollgruppe deutlich größer ausfallen und das Immunoblotting öfter wiederholt hätte werden müssen. Die reine Vermessung der Bandenintensität ist sicherlich auch nicht so zuverlässig wie eine Dichtemessung der Banden.

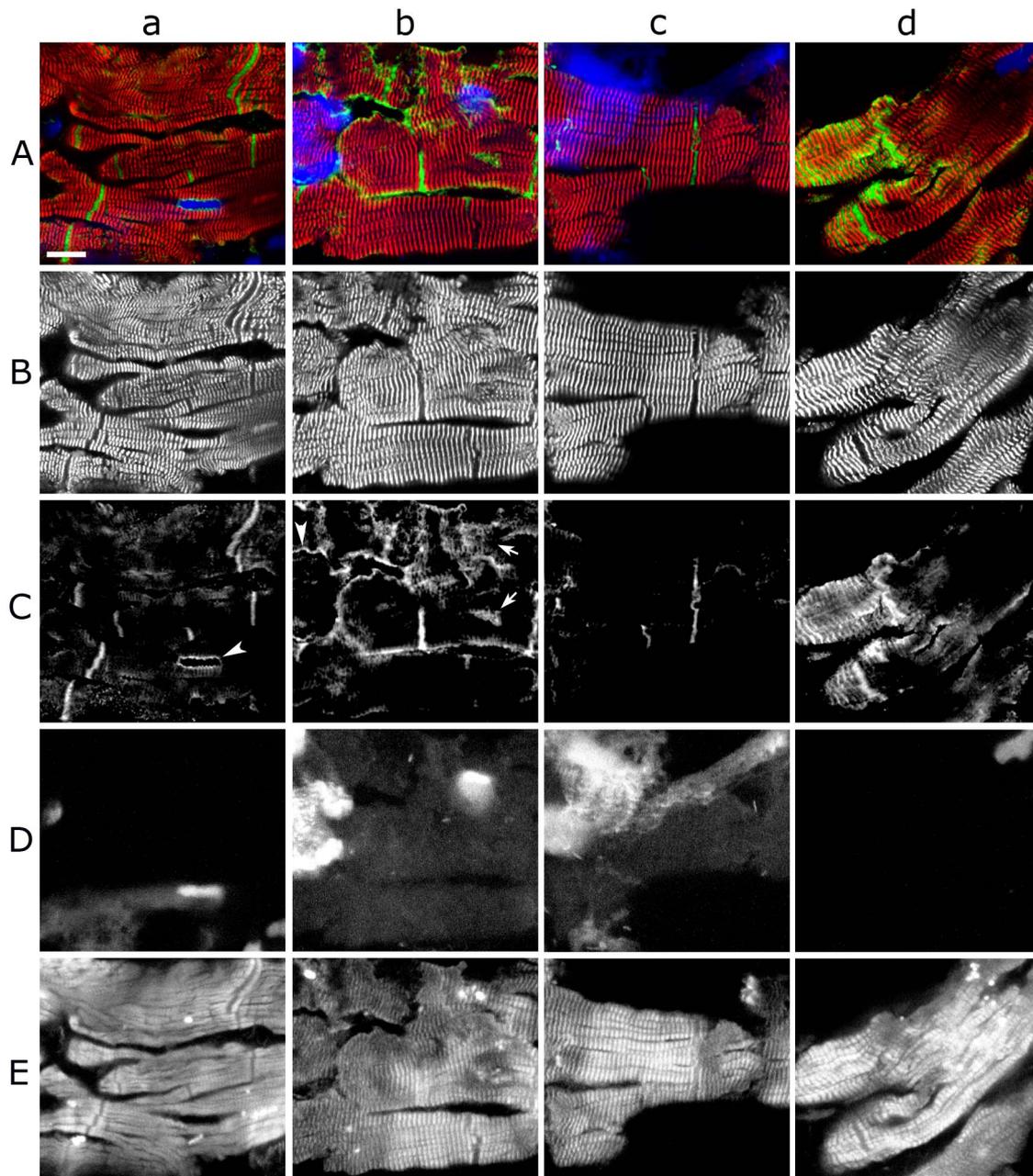
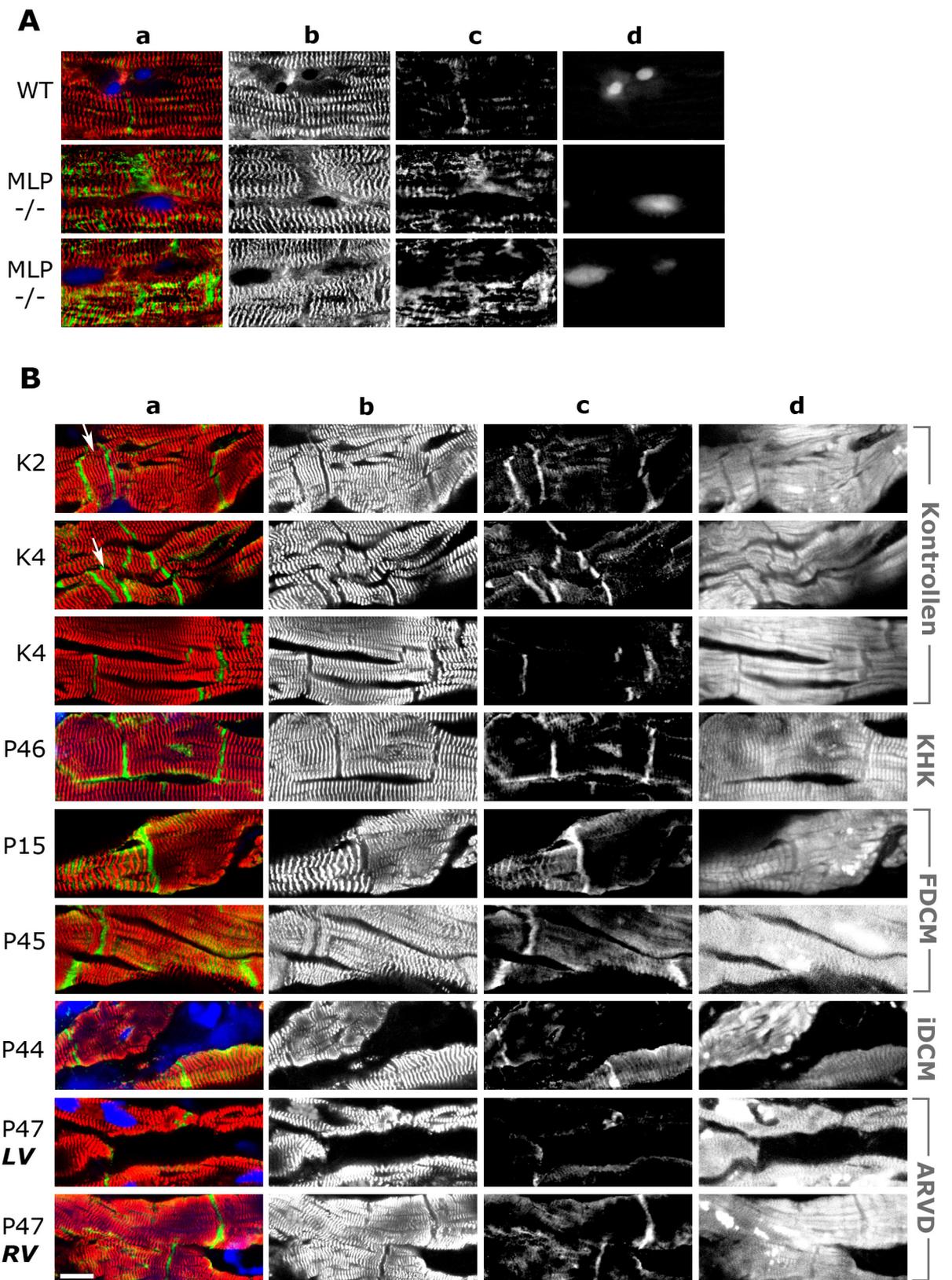


Abb. 25. Charakterisierung der subzellulären Verteilung von N-RAP anhand immunfluoreszent markierter Kryoschnitte des linken humanen Ventrikelmyokard. Das Gewebe stammt von (a) Kontrolle K2, (b,c) P46 mit einer KHK und (d) P15 mit einer FDCM. In (A) ist die Kombination von mM gegen Myomesin (B4 clone) in Rot, pR gegen N-RAP in grün und Kernfärbung durch DAPI in Blau, sichtbar. Das Phalloidin Signal ist hier nicht enthalten, es ist in (E) gesondert dargestellt. Die Signale von (B) mM gegen Myomesin B4, (C) pR gegen NRAP und (D) DAPI sind zusätzlich getrennt dargestellt. (C) In den Kardiomyozyten befindet sich das N-RAP bei allen Proben überwiegend an den ID. Innerhalb der Zelle ist es unterschiedlich stark an den Z-Scheiben, bevorzugt in der Nähe des Zellrandes und manchmal des Nukleus, vorzufinden. Bei K2 und P46 war das N-RAP Signal besonders stark um den Nukleus herum angeordnet (Pfeilköpfe). Bei P46 war das Signal auch an den Z-Scheiben, die sich in der Nähe zum Nukleus befanden, besonders stark ausgeprägt (oberer Pfeil; darunter liegender Pfeil deutet auf eine Stelle bei der wahrscheinlich ebenfalls ein Zellkern darüber gelegen ist). Innerhalb eines Gewebes gleicher Probe ist zellautonom oft mehr bzw. weniger N-RAP vorhanden, wie z.B. bei KHK (b,c) wo sich das Signal an den ID sogar deutlich unterscheidet. Bei FDCM (d) ist das N-RAP Signal an den ID besonders breit und sehr oft ist zellautonom sehr viel N-RAP vorhanden. Skala 10 μ m



←-- Abb. 26. Charakterisierung von Veränderungen in der subzellulären Verteilung von N-RAP (A) in der MLP^{-/-} Maus und (B) bei Patienten mit Herzversagen im Endstadium. (A) Dreifach immunfluoreszent markierte Kryoschnitte mittels (a in rot, b mM gegen Myomesin, (a in grün, c) pR gegen N-RAP gerichteten Primärantikörper, (a in blau, d) DAPI für Darstellung der Kerne. (B) Vierfach immunfluoreszent markierte Kryoschnitte durch (a in rot, b mM gegen α -Aktinin, (a in grün, c) pR gegen N-RAP gerichteten Primärantikörper, (d) Alexa633-Phalloidin für Darstellung von F-Aktin und (a in blau) DAPI für Darstellung der Kerne. (A) Bei mM AK gegen Myomesin (B4 clone) ist das diffuse Signal zwischen den Zellen unspezifisch und stammt vom Sekundärantikörper gegen Maus (siehe neg. Kontrolle). Skala 10 μ m. Pfeile in (A,a) zeigen „Verzahnungen“ der Zellen. Skala 10 μ m

Der pR gegen N-RAP gerichteter Antikörper wurde im Labor von Dr. Ehler E. hergestellt. Dabei handelt es sich um ein nicht affingereinigtes Serum. Der Antikörper neigt stark zur Hintergrundfärbung und hat ein schlechtes Signal zu Rauschen Verhältnis. Daher werden am konfokalen Mikroskop andere Einstellungen als bei den bisher beschriebenen Proben benötigt, mit einem höheren Offset. Am Western Blot sind zwar deutliche und starke N-RAP Banden bei ca. 190 kDa erkennbar, jedoch neigt der Antikörper auch hier zu schwachen unspezifischen Reaktionen. Demnach könnte N-RAP in den Kryoschnitten unspezifische Bindungen eingehen, die auch eine Erklärung für die äußerst heterogene Verteilung innerhalb der Kardiomyozyten innerhalb der Proben und zwischen den Proben sein könnten. Dieses Verhalten könnte auch eine Erklärung für die Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der IF Kryoschnitte und den Immunoblots sein.

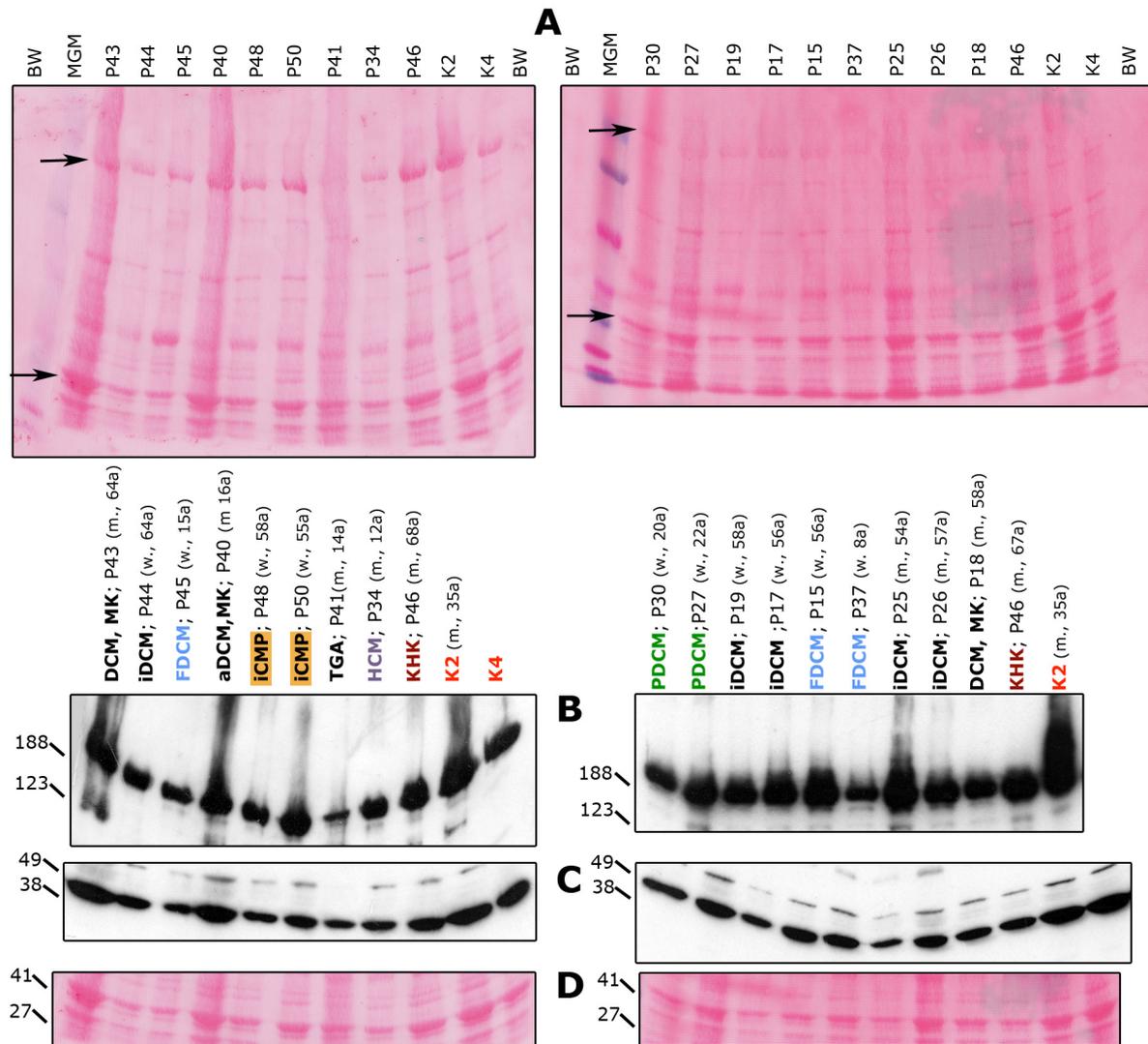


Abb. 27. Expressionsmengen von N-RAP im linken Ventrikelmyokard humaner Proben. (A) mittels PonceauRed Färbung angefärbter Blot, die Ladungsmengen der Proben sind unterschiedlich. Der obere Pfeil markiert die MHC und der untere die Aktin Banden. Durch Western Blotten (4-12% iges Gradientengel wurde (B) das ca. 190kDa große N-RAP Protein mittels eines pR AK detektiert. (C) Das ca. 42 kDa große kardiale Aktin wurde durch einen mM AK detektiert. Es stammt von einem anderen Blot der unter gleichen Bedingungen (4-12%iges Gradientengel) mit gleichen Ladungen und Mengen geblottet wurde. Beim Vergleich mit (D) der gesamten Aktin Bande bei ca. 42kDa am angefärbten Blot erkennt man keine Ladungsunterschiede. Bei TGA scheint der N-RAP Level im Vergleich zu allen übrigen Proben herunterreguliert. Jedoch ist am mit PonceauRed gefärbten Blot bei TGA keine MHC (bei ca. 200kDa) Bande zu erkennen, was darauf hindeutet, dass der obere Bereich der TGA Probe nicht richtig geblottet hat. Beim rechten Blot hat bei K2 und K4 die N-RAP Detektion (Randgruppe) nicht funktioniert.

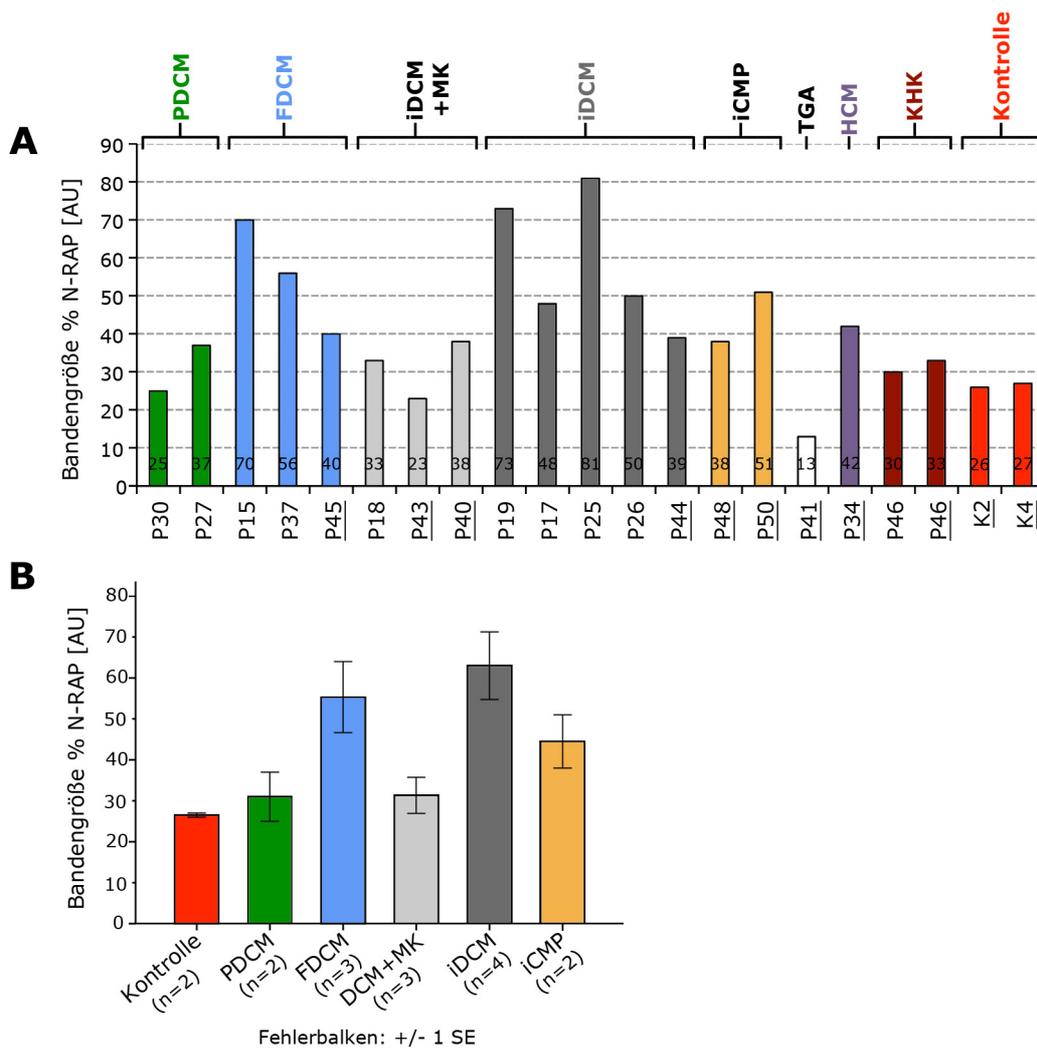


Abb. 28 Quantifizierung vom N-RAP Protein im linken Ventrikelmyokard humaner Proben. Bandenintensität von N-RAP genormt auf das kardiale Aktin. (A) Expressionslevel von N-RAP bei einzelnen Proben von zwei verschiedenen Western Blots (4-12%iges Gradientengel) mit annähernd gleicher Belichtungszeit und unter gleichen Bedingungen. Kontrollen K2 und K4 nur von einem Blot, auf dem zweiten hat die AK Detektion nicht funktioniert (Randgruppe). Zugehörigkeit der Proben zum Blot gekennzeichnet durch einen Unterstrich. Bei allen Patienten mit Herzversagen im Endstadium sind unterschiedliche Proteinmengen ersichtlich. (B) Die N-RAP Expressionslevel sind bei allen Patienten mit einer Dilatation im LV unterschiedlich. Bei FDCM ist N-RAP erhöht, bei PDCM und einer DCM *st. p.* MK nicht. Die restlichen ischämischen DCM Patienten zeigen zwar eine Hochregulierung jedoch auch eine starke Variabilität der Expression. Die statistische Analyse mittels einfaktorieller ANOVA ergab zwar einen signifikanten Unterscheid zwischen den Gruppen ($p=0,025$; $F=4,218$). Bei anschließenden Mehrfachvergleichen durch Scheffé Test (Varianzhomogenität), wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen und der Kontrollgruppe festgestellt, da der Stichprobenumfang der Kontrollgruppe sehr klein ist und die einzelnen Populationen eine große Variabilität aufweisen.

3.4.5. Cardiac Muscle LIM Protein (MLP)

Für die Immunoblot Analyse der Expressionsmengen vom MLP Protein wurden zwei 12% SDS-Gele mit SDS-Proben aus dem LV von 14 DCM, 2 iCMP, 1 HCM Patienten gemeinsam mit 2 Kontrollproben aus dem LV Spendermyokard geladen. Zusätzlich wurde eine SDS-Probe des RV von ARVD gemeinsam mit der als Kontrolle fungierenden SDS-Probe aus dem LV und RV von einem KHK Patienten auch geladen.

Die Detektion des MLP Proteins zeigte unterschiedliche Bandenintensitäten, die sich zum Teil durch ungleiche Ladungsmengen der SDS-Proben ergaben (Abb. 29), wodurch für die weitere Analyse die Bandenintensitäten vermessen wurden und auf die jeweiligen Mengen des gesamten Aktin genormt wurden.

Die Analyse der MLP Expressionslevel, im LV von Patienten mit Herzversagen im Endstadium, ergibt erhöhte Proteinlevel bei den meisten Proben im Vergleich zu den Kontrollen, mit Ausnahme von 2 iDCM Patienten (P17, P44).

Nachdem kein RV von den Kontrollen zur Verfügung stand, wurde der RV von P46 mit einer KHK als Kontrolle für den RV von P47 mit ARVD geblottet. P46 wies nämlich in den mittels IF angefärbten Kryoschnitten ein „gesund“ wirkendes Gewebe auf. Das Gewebe des LV war sogar schöner als das von den eigentlichen Kontrollen (siehe Abb. 4, Abb. 5). Der MLP Level von P46 lag im LV aber über dem von den Kontrollen und im RV ist er sogar eine Spur höher als im LV (Abb.29 D).

Im Vergleich zu dem RV von KHK, war im RV von ARVD das MLP nicht hochreguliert. Wobei die Bande im Vergleich zu den Kontrollen und den übrigen Proben aus dem LV sehr stark ist, und auf eine Hochregulierung hindeutet.

Es ist äußerst fragwürdig ob das Gewebe von P46 als Kontrolle dienen kann. Der Patient hatte eine LVEF von nur 15%, wurde als NYHA III eingestuft und litt zusätzlich unter einer arteriellen Hypertonie und Hyperlipidämie (beides Risikofaktoren für Herzerkrankungen), hatte eine Aortenstenose und einen Myokardinfarkt (siehe Tab.1). Das sind nicht die besten Voraussetzungen für eine Kontrolle.

Das rechte Ventrikelmyokardgewebe von P46 schaut außerdem in den Immunfluoreszenz-Aufnahmen auch nicht so „gesund“ aus wie das linke. Es sind viele Areale innerhalb der Schnitte zu finden, wo die Kardiomyozyten eine unregelmäßigere Form und eine leicht desorganisierte Ausrichtung aufweisen (siehe Abb. 5 c, d).

Die statistische Analyse der Bandengröße von MLP im LV durch die *einfaktorische ANOVA* ergab einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen der Kontrollgruppe und allen Patienten mit Herzversagen im Endstadium ($LVEf \leq 25\%$, $n=18$) (Abb. 30 B).

Der MLP Level im LV war bei der Analyse von iCMP, sowie von DCM (d.h. alle DCM Erkrankungen wie PDCM, FDCM, iDCM, DCM *st. p.* MK, in einer Gruppe zusammengefasst) gegen die Kontrollgruppe ebenfalls signifikant ($p \leq 0,05$) erhöht (siehe Abb. 30 C).

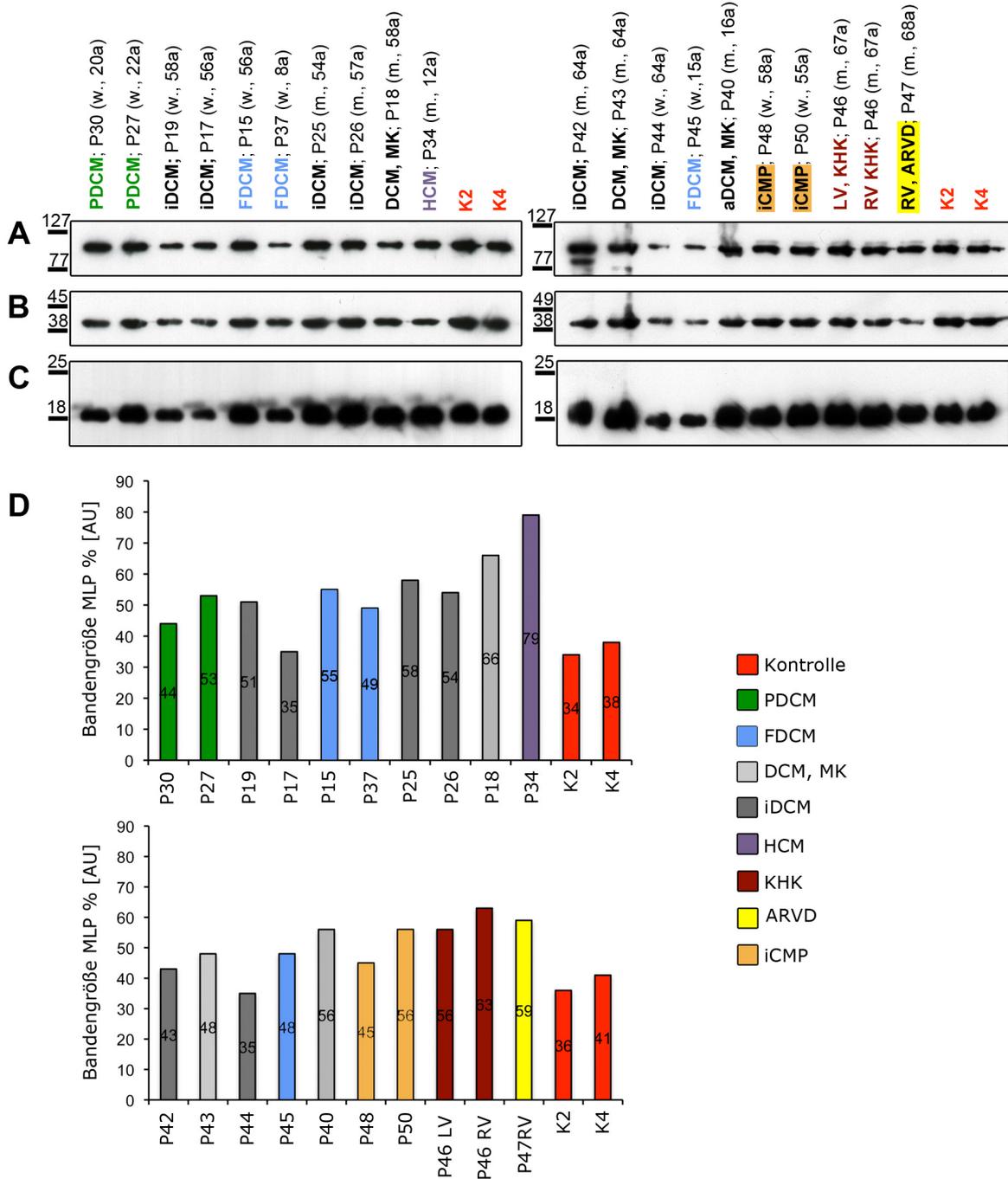


Abb. 29. Expression von MLP, sarkomerischen α -Aktinin und gesamten Aktin im Ventrikelmyokard humaner Proben. Die Proben stammen vom LV, mit Ausnahme P46 mit KHK wo der LV und RV, sowie P47 mit ARVD wo nur der RV geladen wurde. Durch Semidry blotten (12%iges Gel) wurden (A) das ca. 100kDa große sarkomere α -Aktinin durch einen pR Antikörper, (B) die bei ca. 42 kDa sichtbare gesamte Aktin Bande mittels einem pR Antikörper und (C) das ca. 22kDa große MLP durch einen mM Antikörper, detektiert. Die unterschiedliche Bandenintensität vom gesamten-Aktin resultiert aus der unterschiedlichen Ladungsmenge der Proben und dient als Ladungskontrolle. Die Expressionslevel von α -Aktinin sind nicht überall gleich. Bei P37 mit FDCM erkennt man eine leichte Herunterregulierung und bei P42 mit iDCM, P40 mit aDCM (und MK), P34 mit HCM, im RV von P47 mit ARVD erscheint die Bande eine Spur stärker. (D) MLP Bandenintensität genormt auf gesamtes Aktin in *Arbitrary Units*. Man erkennt eine zumindest leichte Hochregulierung des Proteins bei fast allen Proben im Vergleich zu den Kontrollen. Bei P34 mit HCM ist der MLP Level am höchsten.

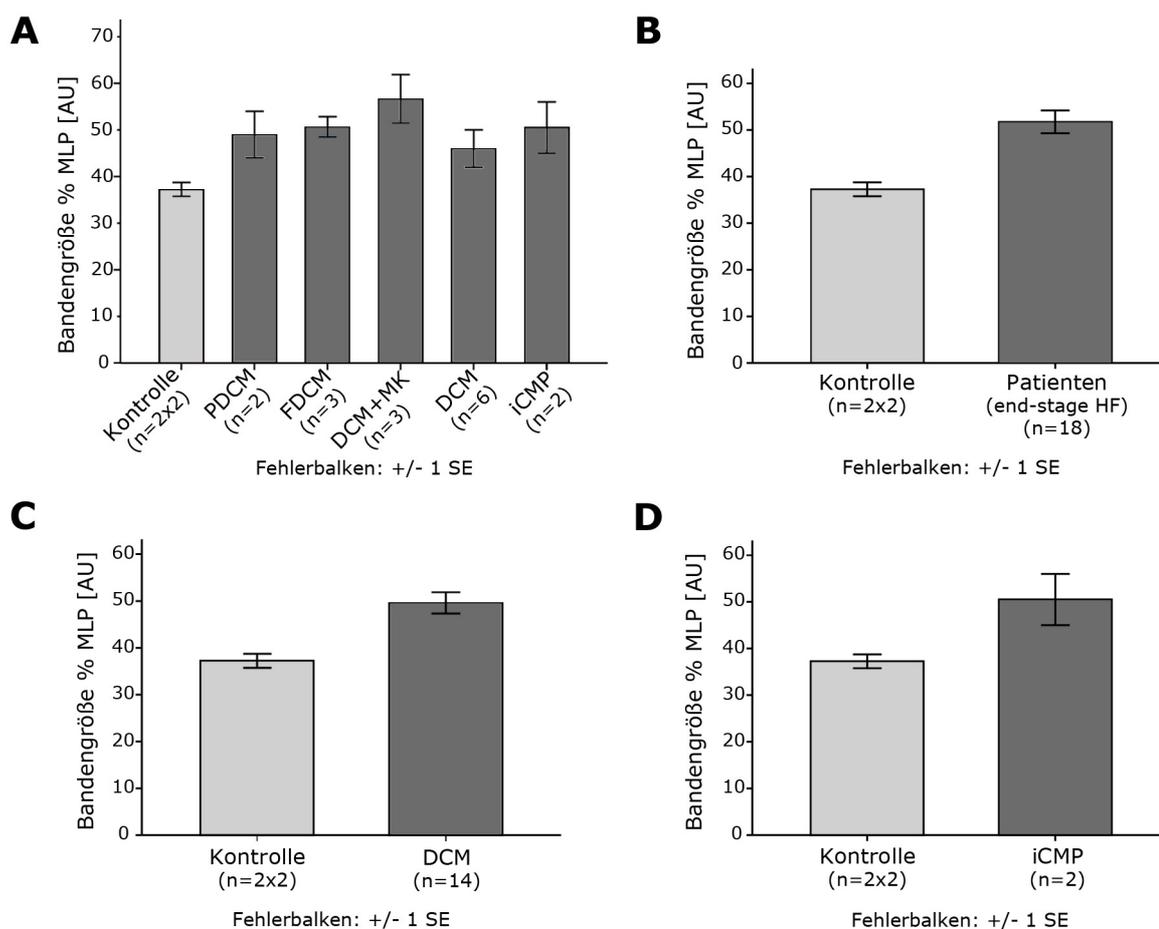


Abb. 30. Quantifizierung vom MLP Protein im linken Ventrikelmyokard humaner Proben. Bandenintensität von MLP genormt auf die gesamte Aktinmenge. (A) Der MLP Level ist bei verschiedenen Erkrankungen gegenüber der Kontrollgruppe erhöht, jedoch ergab die Analyse mit *einfaktorieller ANOVA* und Mehrfachvergleiche durch *Scheffé-Test* keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ($p=0,077$, $F=2,542$). Einzeltests mit der *einfaktoriellen ANOVA* ergaben: (B) Bei Patienten mit Herzversagen im Endstadium (d.h., alle verschiedenen DCM Erkrankungen, iCMP, HCM, KHK, zusammengefasst) ist der MLP Level signifikant gegenüber dem der Kontrollgruppe erhöht ($p=0,013$; $F=7,361$); (C) Bei DCM ist der MLP Level signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht ($p=0,013$; $F=7,833$). (D) Bei iCMP ist der MLP Level ebenfalls signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht ($p=0,031$; $F=10,732$). Bei der Kontrollgruppe ist der Stichprobenumfang mit $n=2 \times 2$ angegeben, da hier die Werte der beiden Kontrollen (K2 und K4) von zwei verschiedenen Gelen (bei gleicher Belichtungszeit für die jeweiligen Proteine und unter gleichen Bedingungen geblottet) verwendet wurden.

Die SDS-Proben aus dem LV und RV von 2 kongenitalen Herzdefekten und 3 DCM Patienten wurden am 12% SDS-Gel getrennt. Die MLP Banden wurden aufgrund unterschiedlicher Ladungsmengen auf α -Aktinin Proteinlevel genormt. Die Analyse des Immunoblots zeigt gegenüber den DCM Patienten erhöhte MLP Proteinlevel bei beiden kongenitalen Herzdefekten (Abb. 31 F). Bei HRHS ist der MLP Proteinlevel gegenüber den DCM Proben leicht erhöht, wobei α -Aktinin eine im Vergleich zu Ladungsmenge schwächere Bande aufweist.

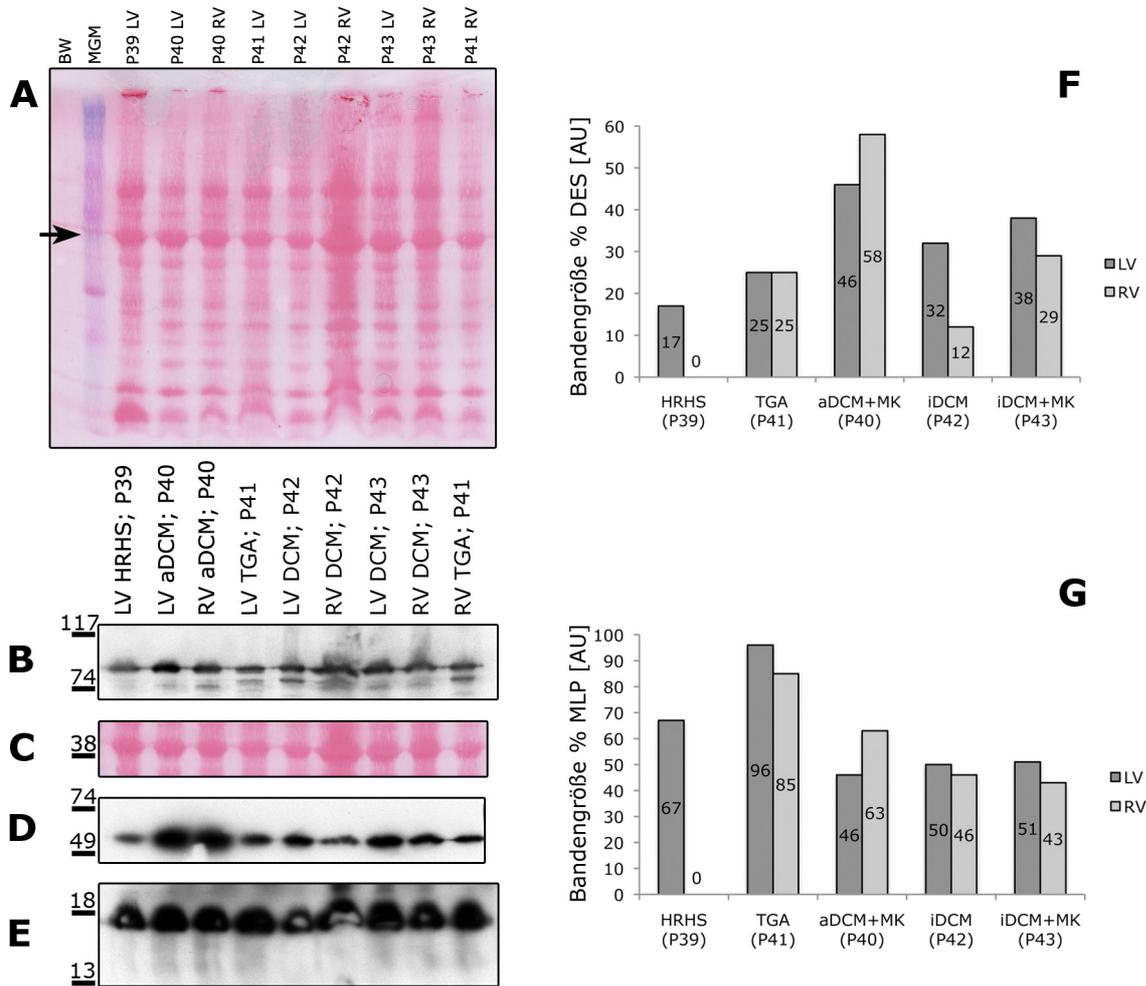


Abb. 31. Expressionslevel vom sarkomerischen α -Aktinin, MLP und Desmin im LV und RV von Patienten mit einer kongenitalen Herzfehlbildung (P39 mit HRHS und P41 mit TGA) und Patienten mit einer iDCM (P42; P43 mit MK in Vorgeschichte; P40 mit aDCM und MK). (A) Mittels Ponceau Red Färbung angefärbter Blot, die Ladungsmengen der Proben sind verschieden, was besonders gut an den Banden vom gesamten Aktin (markiert durch einen Pfeil) erkennbar ist. Durch Western Blotten (12%iges Gel) wurde (B) das ca. 100kDa große sarkomerische α -Aktinin durch einen pR Antikörper, (D) das ca. 53kDa große Desmin durch einen mM Antikörper und (E) das ca. 22kDa große MLP durch einen mM Antikörper, detektiert. Beim Vergleich (C) der Proteinbanden vom gesamten Aktin am mittels Ponceau Red angefärbten Blot mit denen von α -Aktinin ist erkennbar, dass im LV von P39 mit HRHS, P41 mit TGA die α -Aktinin Bande etwas schwächer und im LV von P40 mit aDCM etwas stärker ist. (F) Bandenintensität von Desmin genormt auf α -Aktinin. Bei Patienten mit DCM und Myokarditis ist eine Hochregulierung erkennbar. (G) Bandenintensität von MLP genormt auf α -Aktinin. Bei TGA ist MLP deutlich hochreguliert. Bei HRHS ist es eine Spur hochreguliert, wobei die α -Aktinin Bande hier auch schwächer ist.

3.5. Das Intermediärfilament Protein Desmin und das A-Banden Protein MyBP-C

In den gegen das Desmin und das MyBP-C, in Kombination mit der Kernfärbung durch DAPI, immunfluoreszent angefärbten Kryoschnitten von MLP $-/-$ und WT Maus erkennt man keine Unterschiede beim Desminsignal (Abb. 32). Es waren auch keine atypischen Akkumulierungen von Desmin in den Kardiomyozyten von MLP Knockoutmaus zu erkennen. Das Desmin war sehr schön regelmäßig um die Z-Scheiben und an den ID zu finden. Die MyBP-C Färbung hat leider nicht funktioniert, deshalb wurde das Signal in der Darstellung weggelassen.

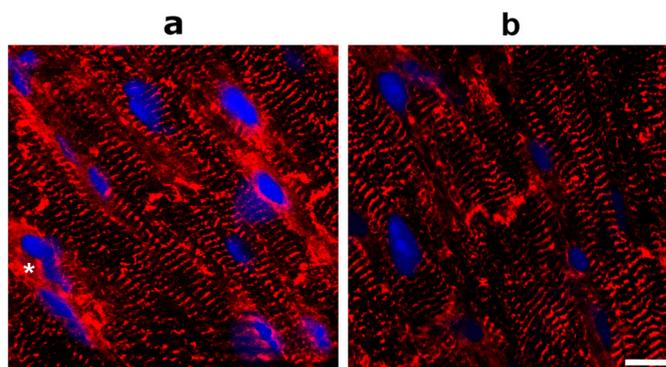


Abb. 32. Immunfluoreszenz gegen Desmin (rot) markierte Kryoschnitte aus dem LV von 9 Monate alten (a) WT und (b) MLP $-/-$ Maus. Beim Desmin Signal sind keine Unterschiede zwischen MLP $-/-$ Maus und dem entsprechenden WT zu erkennen. Die unspezifische Hintergrundfärbung zwischen den Myozyten (*) stammt vom Sekundärantikörper. Kernfärbung durch DAPI (blau). Skala 10 μ m.

Die Immunfluoreszenzfärbung der Kryoschnitte aus dem humanen Ventrikelmyokard gegen das Desmin und MyBP-C ist sehr schwach (Abb.14). Die Antikörperfärbung ist sehr unregelmäßig, was v.a. aus der Unebenheit und stärkere Dicke (11 μ m) der Schnitte resultiert. Die Antikörper konnten nicht so gut durchdringen, wodurch v.a. die Zellränder sehr stark angefärbt sind. Für die Analyse von Desmin, MyBP-C, sowie auch die Darstellung des Myozytengewebes sind die Paraffinschnitte (6 μ m) weitaus besser geeignet, da die Strukturhaltung besser ist. Beide Antikörper funktionieren auch sehr gut auf Paraffinschnitten.

Bei der Kontrolle K4 ist Desmin sehr regelmäßig konzentriert um die Z- und an den Interkalierenden Scheiben ausgebildet (Abb. 33 A). Es waren keine atypischen Akkumulationen von Desmin in den Schnitten zu finden. Innerhalb der Kardiomyozyten der Kontrolle ist beim MyBP-C Signal auch eine sehr schöne regelmäßige Färbung der A-Banden zu sehen (Abb. 37 A). Das Auffälligste in den immunfluoreszent angefärbten Paraffinschnitten der Kontrolle K4 sind die vielen kleinen Interkalierenden Scheiben innerhalb einer longitudinalen Aufnahme im Vergleich zu den übrigen Proben. Die dünnen elongierten Kardiomyozyten sind stark verzweigt und besitzen viele z.T. sehr dünne abgehende Äste. Sehr oft waren auch extreme Verzahnungen der Myozyten, die den Anschein

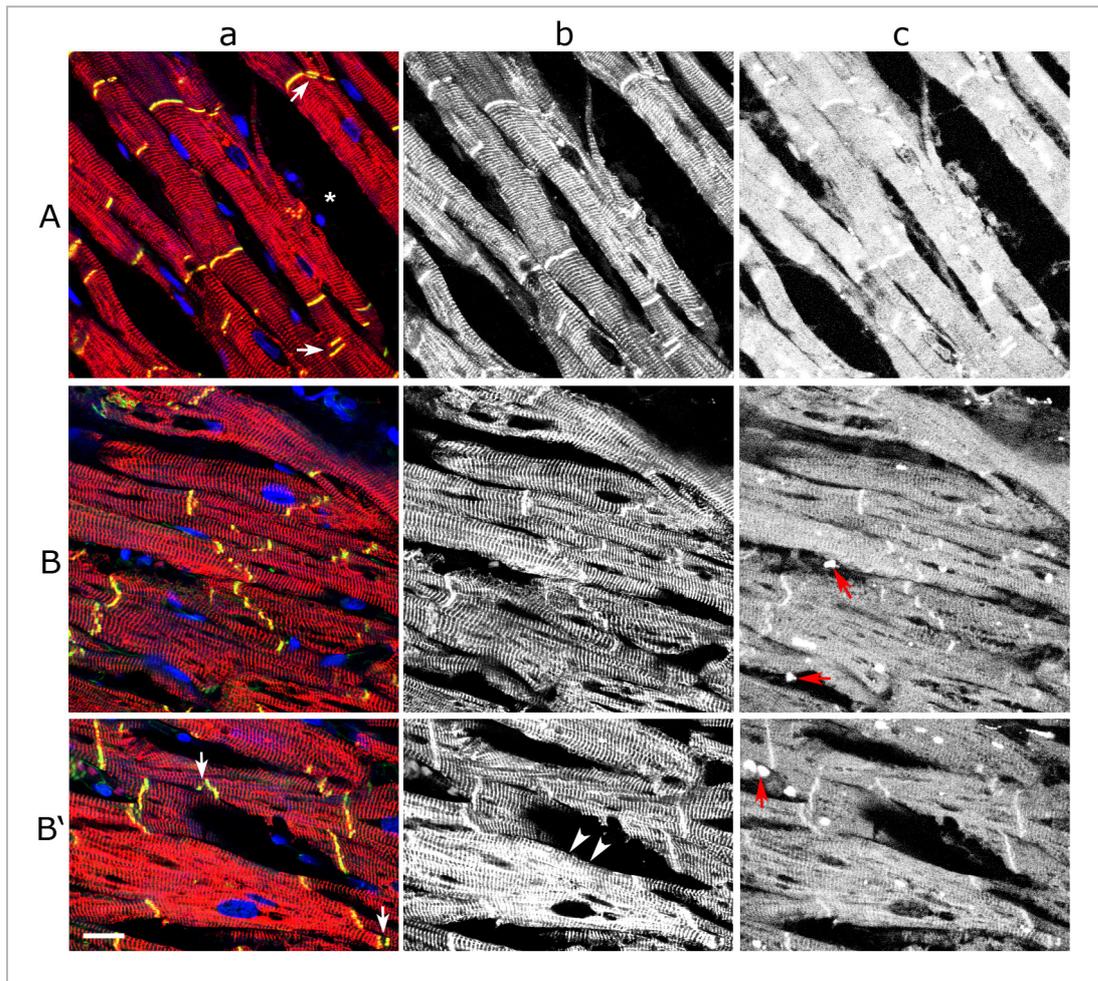


Abb. 33. Vierfach immunfluoreszent markierte Paraffinschnitte aus dem humanen LV von einer (A) Kontrolle (K4) und einem an (B,B') HCM erkrankten Patienten (P34, m., 12a). IF Färbung mit einem mM AK gegen das Intermediärfilament Protein Desmin (a in rot, b), einem pR AK gegen das AJ Protein β -Catenin (a in grün), Alexa633-Phalloidin für die Darstellung von F-Aktin (c) und DAPI für die Darstellung der Kerne (a in Blau). Das Desmin Signal ist bei der Kontrolle und P34 sehr schön regelmäßig um die Z-Scheiben und an den ID zu finden. Bei P34 ist in Arealen mit einem stärkeren *Myocyte Disarray* zellautonom mehr Desmin, bei gleichmäßiger Phalloidin Färbung, enthalten (B',b, Pfeilköpfe). Eine interstitielle Fibrose, erkennbar an angefärbten Zellkernen außerhalb der Myozyten (a,*), ist bei beiden ausgebildet. „doppelte“ ID sind bei beiden Proben zu finden (a, Pfeile). Es sind relativ wenig LFG bei beiden Proben an den Kernpolen zu finden. Dieses Signal ist größtenteils wahrscheinlich unspezifisch, da patzige Stellen auch außerhalb der Myozyten zu finden sind (c, rote Pfeile). Nach der Form der Myozyten, erhöhten Anzahl an ID innerhalb einer Aufnahme und kaum ausgebildetes LFG zu urteilen handelt es sich bei K4 um eine Probe von einem jüngeren Patienten. Skala 20 μ m.

von „doppelten ID“ erwecken, innerhalb der Schnitte zu sehen. Eine interstitielle Fibrose ist, nachdem Kerne außerhalb des Myozytengewebes angefärbt sind welche von Fibroblasten stammen, ebenfalls ausgebildet. Die Form der Kardiomyozyten, deren Anordnung, als auch die Anordnung der Myofibrillen ist jedoch sehr regelmäßig. Demnach handelt es sich hierbei wahrscheinlich um einen jüngeren Patienten. Ein weiteres Indiz dafür ist, dass in den Kryoschnitten von K4 im Phalloidin Kanal keine LFG an den Zellkernpolen zu finden waren. In den Paraffinschnitten erkennt man beim Phalloidin Signal der Kontrolle zwar vermehrt patzige Stellen die LFG ähneln und sich zum Teil an

den Kernpolen befinden, aber auch zwischen den Myozyten zu finden sind. Jene sind auch bei P34, mit einem Alter von 12a, zu sehen. Wahrscheinlich handelt es sich hier größtenteils um eine unspezifische Hintergrundfärbung. Die Sekundärantikörper neigen bei den Paraffinschnitten, wie aus der Negativkontrolle (Abb. 7) ersichtlich, zu einer stärkeren unspezifischen Hintergrundfärbung, die patzige granuläre Strukturen beinhalten kann.

Bei dem einzigen Patienten mit einer HCM (m., 12a), ist beim Desmin Signal ebenfalls wie bei der Kontrolle oft ein sehr regelmäßiges quergestreiftes Muster zu erkennen (Abb. 33). Selten ist zellautonom deutlich mehr Desmin innerhalb einer Kardiomyozyte enthalten. Beim MyBP-C Signal ist ebenfalls ein sehr regelmäßiges doppelbändiges A-Banden Muster ausgebildet. In Abb.30.B ist der Ausschnitt aus einem Areal dargestellt in dem innerhalb einer Myozyte das MyBP-C Protein herunterreguliert erscheint. Das Desmin Signal innerhalb dieser Zelle weist jedoch ein sehr schönes regelmäßiges sarkomeres Muster auf. Im Vergleich zum Spendergewebe ist die Form der Kardiomyozyten weit unregelmäßiger, und ein *Myocyte Disarray* ist oft ausgebildet. An diesen Stellen ist das Desmin Signal auch intensiver. Verzahnungen der Zellen, die durch ein fast senkrecht Hinestrecken einer Myozyte verursacht werden und den Anschein von „doppelten“ Interkalierenden Scheiben erwecken, sind oft in Aufnahmen zu finden. Eine interstitielle Fibrose ist in den Schnitten auch zu erkennen.

Bei P15 mit bekannter FDCM, seit dem 27. Lebensjahr (w., 56a), ist im Vergleich zur Kontrolle als auch P34 mit HCM, die Desmin Färbung weit ungleichmäßiger. Zellautonom ist manchmal mehr Desmin enthalten. Das Desmin Signal an den ID ist auch breiter (Abb.35 A, A'). Nachdem das β -Catenin Signal ebenfalls breiter ist und die ID oft unregelmäßiger sind, ist es sehr naheliegend, dass das stärkere Signal durch eine stärkere Membranfaltung zustande kommt.

Bei MyBP-C Signal ist ebenfalls ein regelmäßiges sarkomeres A-Banden Muster ausgebildet, wobei in einigen Kardiomyozyten kaum A-Banden zu erkennen sind (Abb. 37 C). Solche Stellen sind jedoch auch bei der Kontrolle und anderen Proben zu erkennen und wahrscheinlich unspezifisch.

Das Auffälligste in den Schnitten von P15 ist, dass die Probe ein regelrecht durchlöcherteres Myokard aufweist, ein „Spongy Heart“ oder schwammähnliches Herz, welches durch Absterben von Kardiomyozyten verursacht wird. Sogar innerhalb der Kardiomyozyten sind regelrechte Löcher durch Degradation von Myofibrillen zu erkennen. Dies ist auch in den Kryoschnitten offensichtlich (Abb. 10). Die Form der Kardiomyozyten variiert im selben Schnitt stark (Vergleiche Abb. 35 A, A'). Sie sind im generellen sehr lang, z.T. mit vielen dünnen abgehenden Ästen und in manchen Arealen zusätzlich extrem dünn ausgebildet. Enorme Verzahnungen der Zellen, mit „doppelten ID“ sind ebenfalls zu erkennen.

Bei P17 mit DCM (w., 56a) ist das Desmin Signal, im Vergleich zur Kontrolle und anderen Proben, in allen Schnitten sehr stark innerhalb der Kardiomyozyten ausgebildet und das quergestreifte reguläre Muster ist oftmals gestört (Abb.35 B). Die Myozyten sind in allen Schnitten auffällig kurz und deutlich irregulär geformt. Oftmals sind sehr schön zweikernige Myozyten zu sehen (Abb.34). Laut den meisten Lehrbüchern besitzt die Mehrheit der humanen Kardiomyozyten nur einen Zellkern.

Kardiomyozyten von Mammaliern verlieren nach der Geburt die Zellteilungsfähigkeit und deren Wachstum findet nur mehr durch Hypertrophie statt. Sie können zusätzlich Endomitosen mit anschließender Kernteilung ohne Zytokinese durchlaufen. Kardiomyozyten z.B. von Nagetieren

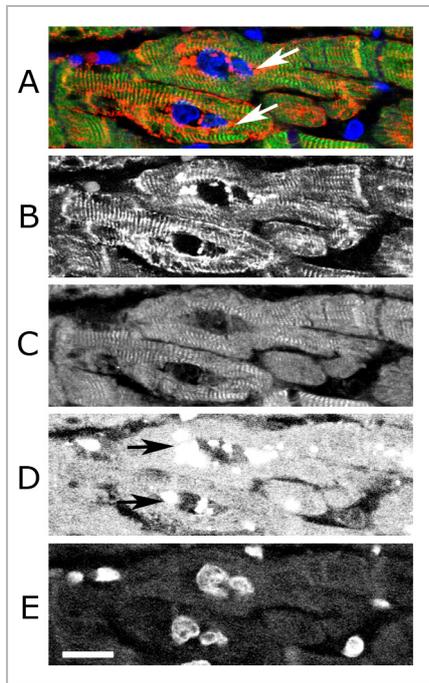


Abb. 34 Immunfluoreszenz gegen (A, in rot; B) das Intermediärfilament Protein Desmin, (A, in grün; C) das Myosin bindende Protein-C, (D) F-Aktin durch Alexa633-Phalloidin und Kerne durch DAPI (A, in blau; E), angefarbter Paraffinschnitt aus dem LV von P17 (w., 56a) mit einer DCM unbekannter Ursache. Im Gewebe von P17 waren oft sehr schön zweikernige Myozyten zu erkennen (A, Pfeile, Vergleiche mit E). An deren Polen befand sich altersentsprechend viele LFG (D, Pfeile). Skala 20 µm.

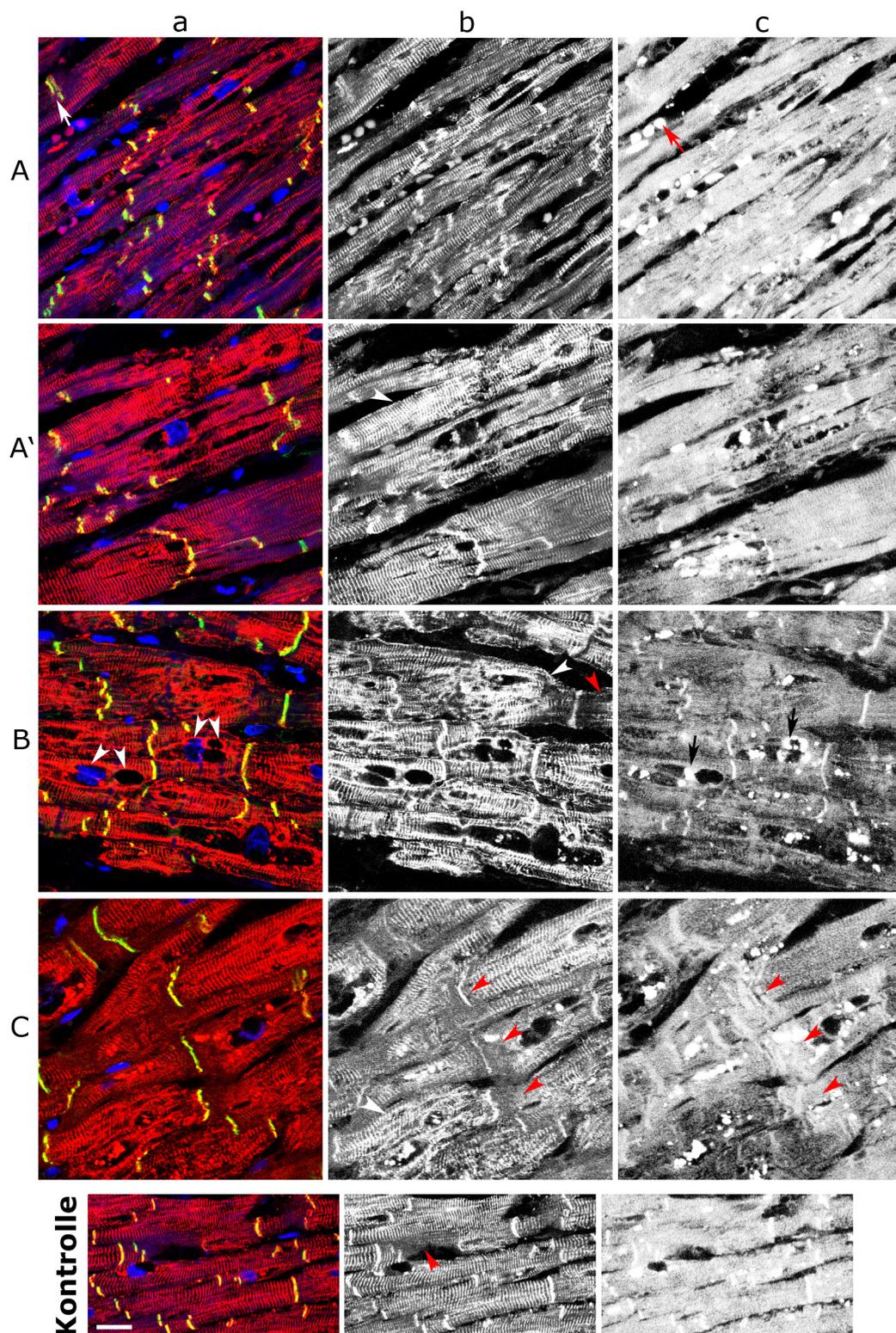
ist ausgebildet. Eine im Vergleich zu anderen Proben schwache Fibrose mit dichter aneinanderliegenden Zellen ist ausgebildet. Das MyBP-C zeigt ein sehr schönes A-Banden Muster, trotz größtenteils quer getroffener Myozyten (Abb. 37 E).

besitzen meist zwei und die von Schweinen sogar durchschnittlich acht Nuclei. Indizien für zweikernige Myozyten waren auch bei anderen humanen Proben zu erkennen, wie z.B. in den Kryoschnitten von P45 (FDCM, w., 15a). Für eine eindeutige Darstellung hätte jedoch die Extrazelluläre Matrix (ECM) angefarbt werden müssen, um die Zellgrenzen darzustellen.

„Doppelte“ Interkalierende Scheiben, zum Teil eine starke interstitielle Fibrose und stellenweise ein *Myocyte Disarray* mit stark verästelten spitz zulaufenden und irregulären Myozyten sind bei P17 auch ausgebildet (Abb.18). Beim MyBP-C

Signal sind sehr schöne A-Banden zu sehen. Stellenweise sind innerhalb der Myozyten kaum A-Banden zu erkennen was jedoch, wie bereits zuvor erwähnt, möglicherweise durch die Schnittqualität bedingt ist (Abb. 37 D).

Bei P18, mit einer DCM und Myokarditis in der Vorgeschichte (m., 48a) erkennt man ebenso ein im Vergleich zur Kontrolle ungleichmäßigeres Desmin Signal (Abb. 35 C). Zellautonom ist manchmal mehr Desmin akkumuliert, aber auch ein reduziertes Signal innerhalb einiger Kardiomyozyten vorzufinden. Wobei beim letzteren nicht komplett auszuschließen ist, dass jenes durch Schnittunebenheiten zustande kommt. Ein *Myocyte Disarray* mit unregelmäßig geformten großen, bzw. dicken Kardiomyozyten welche oftmals spitz zulaufen und die parallele Anordnung verloren haben,

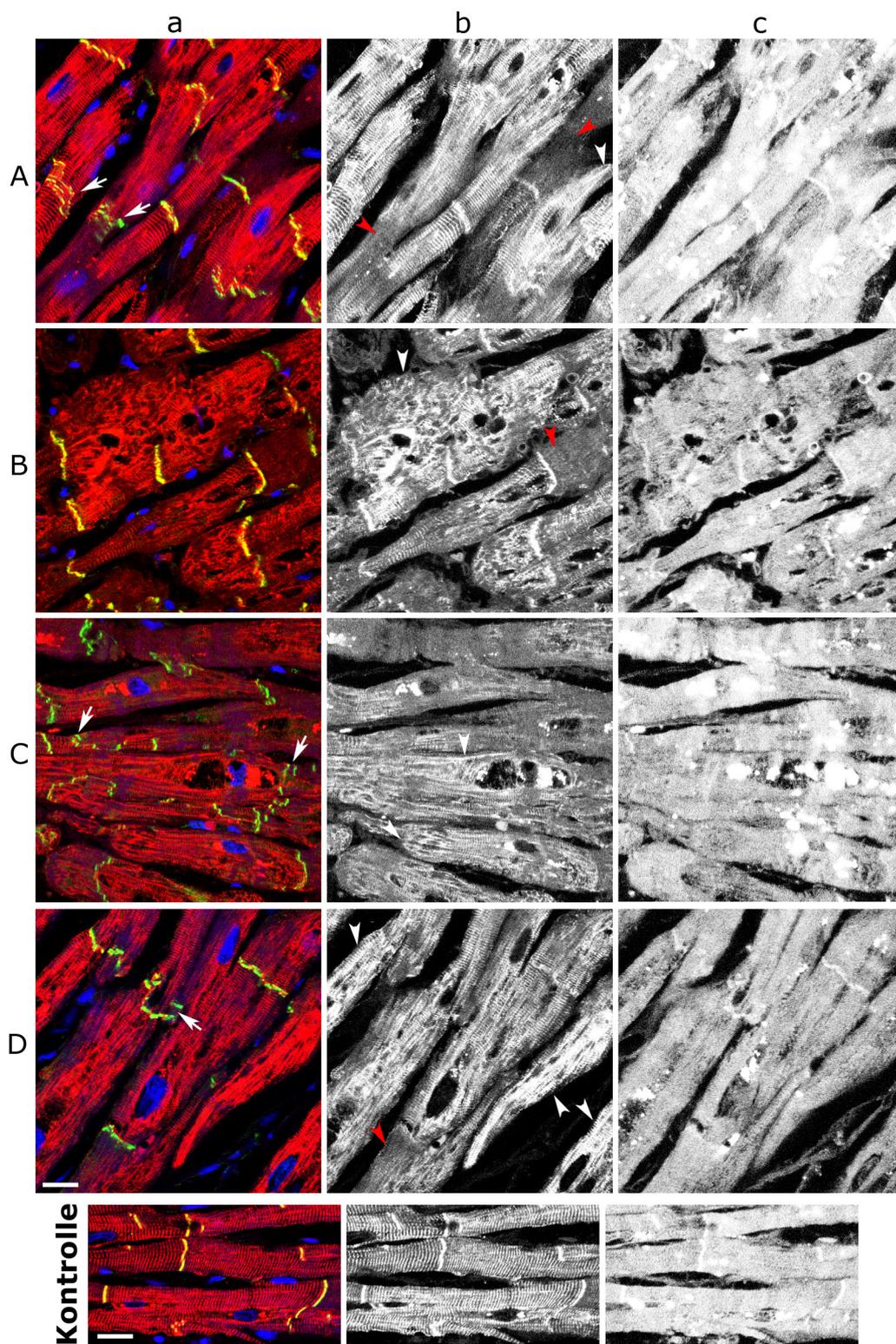


←-- Abb. 35. Vierfach immunfluoreszent markierte Paraffinschnitte aus dem humanen LV von DCM Patienten für die Darstellung des kardialen Intermediärfilament Proteins Desmin (a in rot, b), des AJ Proteins β -Catenin (a in grün), des F-Aktin (c) und der Kerne (a, in blau). Bei allen DCM Patienten ist im Vergleich zur Kontrolle ein unregelmäßiges Desmin Signal ausgebildet mit zellautonom starken Anreicherungen (weiße Pfeilköpfe, in b), gleichzeitiger Störung der gebänderten sarkomen Struktur, und einer unregelmäßigen Zellform. Oft ist im Areal um die ID kein sarkomeres Desmin Signal zu erkennen (rote Pfeilköpfe, in b), jenes könnte wie bei P18 mit Schnittunebenheiten in Verbindung stehen, aufgrund intensiverer Phalloidin Färbung (durch die sehr kleine Größe überall durchgängig; Vergleiche rote Pfeilköpfe in b, c). Bei der Kontrolle ist sehr selten zellautonom auch kein Desmin enthalten. (A,A') P15 mit einer bekannten FDCM seit dem 27.LJ (w., 56), weist zum Teil stark ausgedünnte lange Kardiomyozyten und durchlöcherteres Myokard auf. „Doppelte“ ID sind oft ausgebildet (weißer Pfeil in a). (B) P17 mit unbekannter DCM (w.56a), weist sehr starke Desmin Anreicherung auf. Die Myozyten sind in den longitudinalen Schnitten sehr kurz und enthalten oft zwei Kerne (weiße Pfeilköpfe in a, wobei der zweite Kern hier nicht angeschnitten ist) mit viel LFG an den Zellkernpolen (schwarzer Pfeil, in c). (C) Bei P18 mit DCM und MK mit 19. LJ (m., 48a), ist ein Areal mit *Myocyte Disarray* abgebildet. LFG befinden sich bei allen Patienten (über 40a) an den Zellkernpolen. Ausserdem sind unspezifische granuläre Strukturen zwischen den Myozyten zu finden (roter Pfeil in c). Skala 20 μ m.

P19, mit einer DCM unbekannter Ursache (w., 58a), besitzt an einigen Stellen sehr regelmäßige Myozyten, welche ein sehr schönes Desmin Muster aufweisen. Jedoch sind an vielen Stellen auch ein *Myocyte Disarray* und eine Fibrose ausgebildet. Dort ist innerhalb der Myozyten das sarkomere Desmin Muster sehr unregelmäßig und wirkt reduziert (Vergleiche Abb. 36 A, Abb. 18 A). Stellenweise sind aber auch Kardiomyozyten zu finden, die Desmin stark angereichert haben. P19 besitzt sehr unregelmäßige, stark stufige und verzahnte ID, die auf extrem ausgefrante Zell-Zell-Kontakte schließen lassen. Das MyBP-C Signal weist ein sehr schönes und regelmäßiges A-Banden Muster auf (Abb.37 F).

P25 mit DCM (m., 54a) besitzt zellautonom oft sehr viel Desmin. Diese Myozyten weisen eine stark irreguläre Form auf und das quergestreifte Muster der Myofibrillen ist stark gestört. Ausserdem sind Kardiomyozyten zu sehen bei denen kaum Desmin um die Z-Scheiben zu sehen ist. Ein *Myocyte Disarray* und ein „*Spongy Heart*“ sind in fast allen Schnitten zu erkennen (Abb. 36 B).

Das Myozytengewebe von P26 (m., 57a) weist ebenso eine ungleichmäßige Desminfärbung auf. Es sind sowohl Kardiomyozyten im Gewebe zu finden, die zellautonom mehr Desmin enthalten und dessen quergestreiftes Muster durch die starke Akkumulation kaum erkennbar ist, als auch Zellen die nur sehr wenig Desmin aufweisen (Abb.36 C). Letzteres kann jedoch auch durch die Gewebequalität bedingt sein. Das auffälligste an den Schnitten von P26 ist, dass die Probe z.T. riesige d.h. sehr dicke und lange, d.h. stark hypertrophierte Kardiomyozyten beinhaltet, die zum Teil starke Verzästelungen aufweisen. Die ID sind sehr unregelmäßig. Die Myozyten weisen grundsätzlich eine stark irreguläre Gestalt auf und ein *Myocyte Disarray* ist oft ausgebildet. Extreme Verzahnungen der Kardiomyozyten sind auch zu finden. Grundsätzlich wirkt die Gewebequalität der Probe jedoch auch sehr schlecht, was wahrscheinlich durch eingesetzte Autolyse, aufgrund nicht genügend rascher Probenentnahme bzw. Stickstofffixierung verursacht wurde. Dies macht sich dadurch bemerkbar, dass



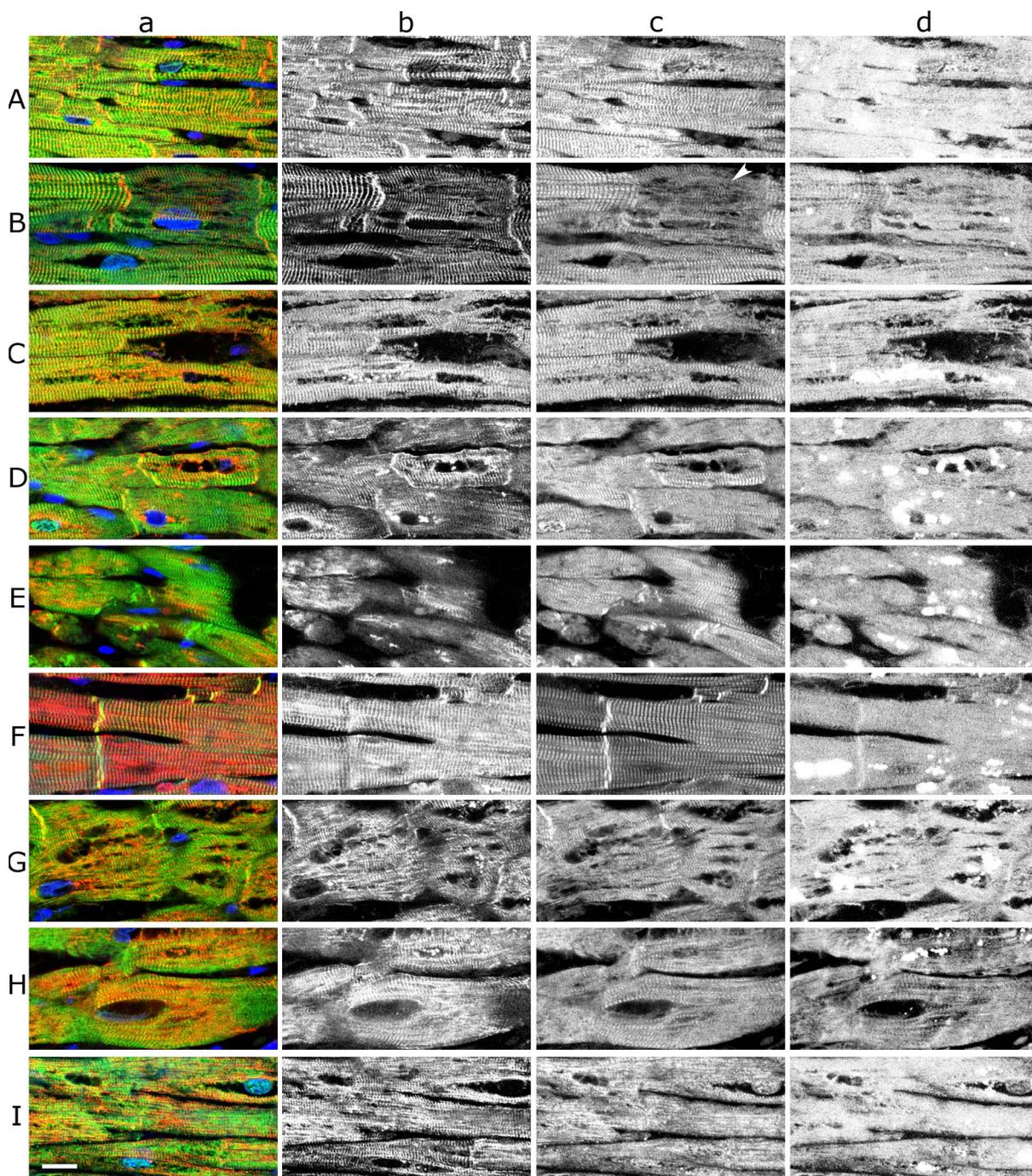
←-- Abb. 36.. Vierfach immunfluoreszent markierte Paraffinschnitte aus dem humanen LV von DCM Patienten für die Darstellung des kardialen Intermediärfilament Proteins Desmin (a in rot, b), des AJ Proteins β -Catenin (a in grün), des F-Aktin (c) und der Kerne (a, in blau). Bei (A) P19 (w., 58a), (B) P25 (m. 54a), (C) P26 (m., 57a) alle mit DCM unbekannter Ursache und (D) P27 (w., 22a) mit perinatal manifestierter DCM, weisen die Myozyten eine zum Teil stark unregelmäßige Gestalt und unterschiedlich stark ausgebildeten „Myozyten Disarray“ auf. Bei P25 sind die Myozyten oftmals regelrecht durchlöchert („Spongy Heart“). Bei allen Proben ist im Vergleich zur Kontrolle ein unregelmäßiges Desmin Signal ausgebildet. Zellautonom sind bei allen Proben mit unterschiedlichen Ausmaß Desmin Anreicherungen –mit einem gestörten sarkomeren Muster- (weiße Pfeilköpfe, in b) zu erkennen, als auch ein reduziertes Signal (rote Pfeilköpfe, in b). Bei P26 ist das reduzierte Desmin Signal wahrscheinlich hauptsächlich auf die schlechte Gewebequalität zurückzuführen. Das Desmin Signal fehlt größtenteils an den ID und die Myofibrillen weisen nur selten ein quergestreiftes Muster auf, demnach sind sie größtenteils durch eingesetzte Autolyse degradiert. Skala 20 μ m.

innerhalb vieler Areale verschiedener Schnitte und Färbungen die Myozyten kein schönes sarkomeres Muster mehr aufweisen und demnach bereits zum Teil degradierte Myofibrillen haben. Ein schönes A-Banden Muster, war jedoch beim MyBP-C Signal oft vorhanden (Abb.37 H).

Bei P27 mit PDCM (w., 22a) ist stellenweise ein Myozyten Disarray ausgebildet und zellautonom liegt Desmin in den unregelmäßigen Myozyten oft stark angereichert vor, was zu einem gestörten quergestreiften Muster der Myofibrillen führt (Abb.36 D). Die Myozyten sind sehr lang und dünn und weisen auffällig weniger Zell-Zell-Kontakte als K4 auf. Die ID sind auch weit unregelmäßiger und stark gestuft. Es sind kaum schöne MyBP-C Doppelbanden in den Kardiomyozyten ausgebildet (Abb.37 I), was wahrscheinlich weniger mit der Erkrankung als mit der Probenqualität zusammenhängt. Die Probe, die eingebettet wurde, war riesig, wodurch sie zum Teil die Qualität eines Kryoschnittes aufweist. Eine zu große Probengröße kann zu einer unzureichenden Fixierung des Gewebes führen, wodurch selbst wenn es sorgfältig geschnitten wird, die Gewebeschnitte immer eine minderwertige Morphologie aufweisen.

Die Paraffinschnitte lieferten zwar ein weitaus schöneres Ergebnis was die Strukturhaltung betrifft, leider funktionieren viele der Antikörper, v.a. die hoch spezifischen mM AK die nur an ein spezifisches Epitop binden, nicht mehr an den Paraffinschnitten. Der einzige monoklonale Maus Antikörper, der bei den Kryoschnitten verwendet wurde und auch an den Paraffinschnitten funktioniert ist der mM AK gegen Desmin, ein Protein der Intermediärfilamente, welches die Z-Scheiben benachbarter Sarkomere untereinander und über Desmosome mit der Plasmamembran verbindet.

Die Alexa633-Phalloidin Färbung funktioniert an den Paraffinschnitten öfters nicht sehr gut. Bei allen Proben waren selbst am relaxierten Muskel kaum gebänderte Aktinfilamente erkennbar.



←-- Abb. 37. Vierfach immunfluoreszent markierte Paraffinschnitte aus dem LV von (A) einer Kontrolle, (B) einem HCM Patienten und (C-I) 7 DCM Patienten. Markierung durch mM AK gegen das kardiale Intermediärfilament Protein Desmin (a, in rot; b), pR AK gegen das MyBP-C (a, in grün; c), mittels Alexa633-Phalloidin für Darstellung von F-Aktin (d) und Kernfärbung durch DAPI (a, in blau). Bei (B) HCM (P34, m.12a) sind sehr schöne MyBP-C Doppelbänder am relaxierten Muskel erkennbar. Zellautonom (weißer Pfeil, in c) ist trotz des gleichmäßigen Desmin und Phalloidin Signals das MyBP-C Signal sehr schwach. Bei einigen Proben (D-H) ist beim MyBP-C Signal die ID angefärbt. Durch die Behandlung mit Triton-X100 ist der β -catenin AK vom benachbarten Schnitt rübergeronnen. (F) P19 (DCM, w., 58a,) besitzt stellenweise eine sehr schöne regelmäßige Form und Anordnung der Myozyten. Hier ist das gestreifte Muster von Desmin und MyBP-C an den relaxierten Myozyten sehr regelmäßig. Bei den übrigen Proben ist die MyBP-C Färbung ungleichmäßig, was wahrscheinlich auf die Probenqualität zurückzuführen ist. Bei (C) P15 (FDCM, w., 56a) und (G) P25 (DCM, m., 54a) ist das Myokard regelrecht durchlöchert („Spongy Heart“). Bei (E) P18 (DCM, MK, m., 48a) ist die schlechte Desmin und MyBP-C Färbung auf überwiegende Myozyten Querschnitte zurückzuführen. (D) P17 (w., 56a, DCM); (H) P26 (m., 57a, DCM); (I) P27 (PDCM, w., 22a). Skala 20 μ m

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen der Immunfluoreszenz Analyse der gegen Desmin und das β -Catenin markierten Paraffinschnitte sagen, dass die Form der Myozyten zwischen den DCM Proben sehr stark variiert, obwohl diese aus dem ungefähr gleichem Areal des LV (Apexnähe) stammen. Die Myozytengestalt variiert sogar innerhalb einer Probe, wie z.B. bei P15 dargestellt (Abb.35 A, A').

Im Vergleich zur Kontrolle weist das Desmin Signal bei allen DCM Patienten und dem einen HCM Patienten zellautonom oft ein weit unregelmäßigeres sarkomeres Muster auf. Das bedeutet, dass es oftmals zu atypischen Desmin Akkumulationen innerhalb von in ihrer Gestalt stark unregelmäßigen Myozyten kommt. Dabei ist das reguläre quergestreifte Desmin Muster gestört. Gleichzeitig ist zellautonom oder im Areal um die ID das Desmin Signal kaum an den Z-Scheiben ausgebildet. Wobei hier nicht immer auszuschließen ist, dass es sich bei diesen Stellen weniger um stattfindende Umbauprozesse, als um Schnitt- bzw. Gewebequalität bedingte Eigenschaften handelt.

Schlussfolgernd ist anzunehmen, dass die beschriebenen Veränderungen im Desmin Muster eine sekundäre Antwort auf veränderte physiologische Bedingungen bei Patienten mit Herzversagen im Endstadium darstellen, da Akkumulationen gerade in solchen Kardiomyozyten beobachtet wurden, die sich durch eine stark unregelmäßigere Form und folglich ein generelles Missalignment der Zellen auszeichneten. In Arealen mit regelmäßig angeordneten Myozyten, welche eine schöne elongierte Gestalt aufweisen, sind keine Akkumulierungen, die zu einem gestörten Desmin Muster innerhalb der Myozyten führen, zu beobachten.

Für die Immunoblot Analyse der Expressionslevel des Desmin Proteins wurden zwei 7,5% SDS-Gele mit SDS-Proben aus dem LV von 13 DCM Patienten (2 PDCM, 3 FDCM, 3 DCM *st.p.* MK, 3 iDCM wahrscheinlich jedoch ischämisch), 2 iCMP, 1 HCM Patienten und 2 Kontrollen, sowie der rechten Ventrikel von 1 ARVD Patienten und als Kontrolle der RV und LV von 1 KHK Patienten geladen und geblottet (Western Blot) (Abb. 38). Die Detektion des Proteins ergab unterschiedliche Bandenintensitäten die sich aber zum Teil durch ungleiche Ladungsmengen an Protein ergaben,

wodurch für die genauere Analyse die Mengen von Desmin auf die jeweiligen Mengen von sarkomerischen Myosin genormt wurden (Abb. 39 A). Die Expression von Desmin erscheint beim Großteil der Proben im Vergleich zu den Kontrollen zumindest leicht hochreguliert.

Die statistische Analyse mit *einfaktorieller ANOVA* ergibt keinen signifikanten Unterschied ($p=0,139$, $F=2,419$) zwischen der Kontrollgruppe ($n=3$, da eine Kontrolle 2x geblottet wurde) und allen Patienten mit Herzversagen im Endstadium ($n=15$), wenngleich ein erhöhter Proteinlevel der HF-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe gegeben ist. Die geringe Größe der Kontrollpopulation im Vergleich zur Populationsgröße der gesamten Patienten mit Herzversagen (HF) im Endstadium, als auch die starke Streuung dieser Gruppe, schließt eine statistische Signifikanz aus (Abb.39 C).

Die statistische Analyse der Bandenintensität deutet auf einen erhöhten Level an Desmin bei iCMP und innerhalb der einzelnen „Subgruppen“ der DCM hin. Die Analyse mit *einfaktorieller ANOVA* ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, jedoch ergaben die Mehrfachvergleiche durch *Dunnett-T3-Test* lediglich einen signifikanten Unterschied (Mittlere Differenz=-5,444, $SE=1,412$, $p=0,033$) zwischen der Gruppe der sekundär verursachten DCM und der Kontrollgruppe. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, dass jene Gruppen die geringste Streuung aufweisen.

Eine Hochregulierung von Desmin bei sekundär verursachter DCM ist auch gegenüber den niedrigeren Expressionsleveln bei kongenitalen Herzdefekten gegeben (Abb.31 F).

Für eine aussagekräftige statistische Analyse hätte die Kontrollgruppe deutlich größer ausfallen und das Immunoblotting öfter wiederholt werden müssen. Die reine Vermessung der Bandenintensität ist sicherlich auch nicht so zuverlässig wie eine Dichtemessung der Banden.

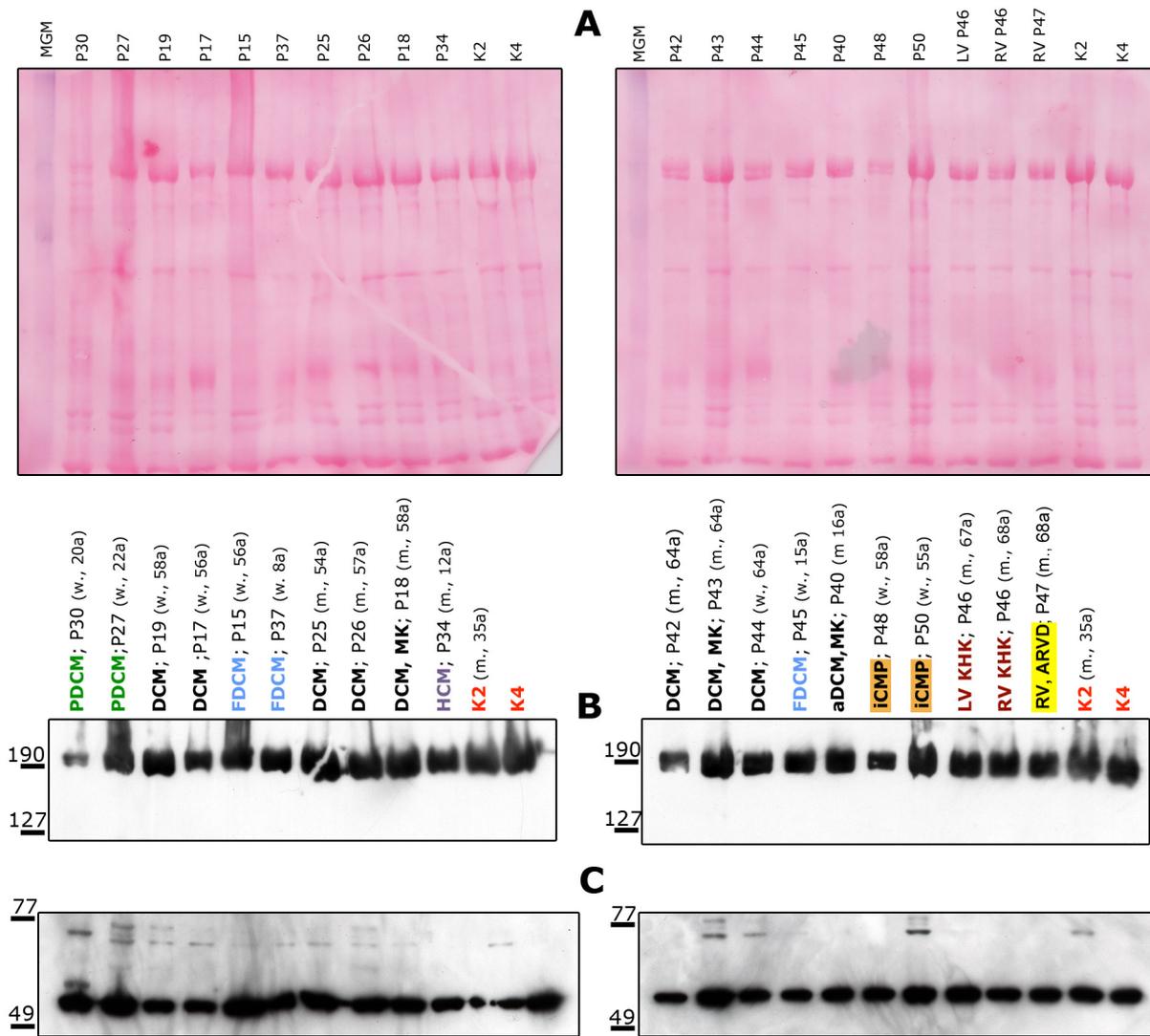


Abb. 38. Expressionslevel des Intermediärfilament Proteins Desmin in SDS-Proben aus dem Ventrikel von 20 Patienten mit Herzversagen im Endstadium und 2 Kontrollen. SDS-Proben stammen aus dem LV, mit Ausnahme von P47 mit ARVD wo nur der RV und P46 mit KHK wo der LV und RV als Kontrolle für ARVD geladen wurden. Durch Western Blotting (7,5%iges Gel) wurden (B) das ca.200kDa große sarkomerische Myosin durch einen mM Primärantikörper und (C) das ca. 53kDa grosse Desmin durch einen mM Primärantikörper detektiert. (A) Mittels Ponceau Red angefärbte Nitrocellulose zeigt dass die geladenen Ladungsmengen der SDS Proben unterschiedlich sind. Die Bandenintensitäten des sark. Myosin stimmen mit den unterschiedlichen Ladungsmengen bei (A) überein. Die Proteinmengen von Desmin sind beim Abgleich mit (A) jedoch unterschiedlich und deuten auf eine leichte Hochregulierung im Vergleich zu den Kontrollen.

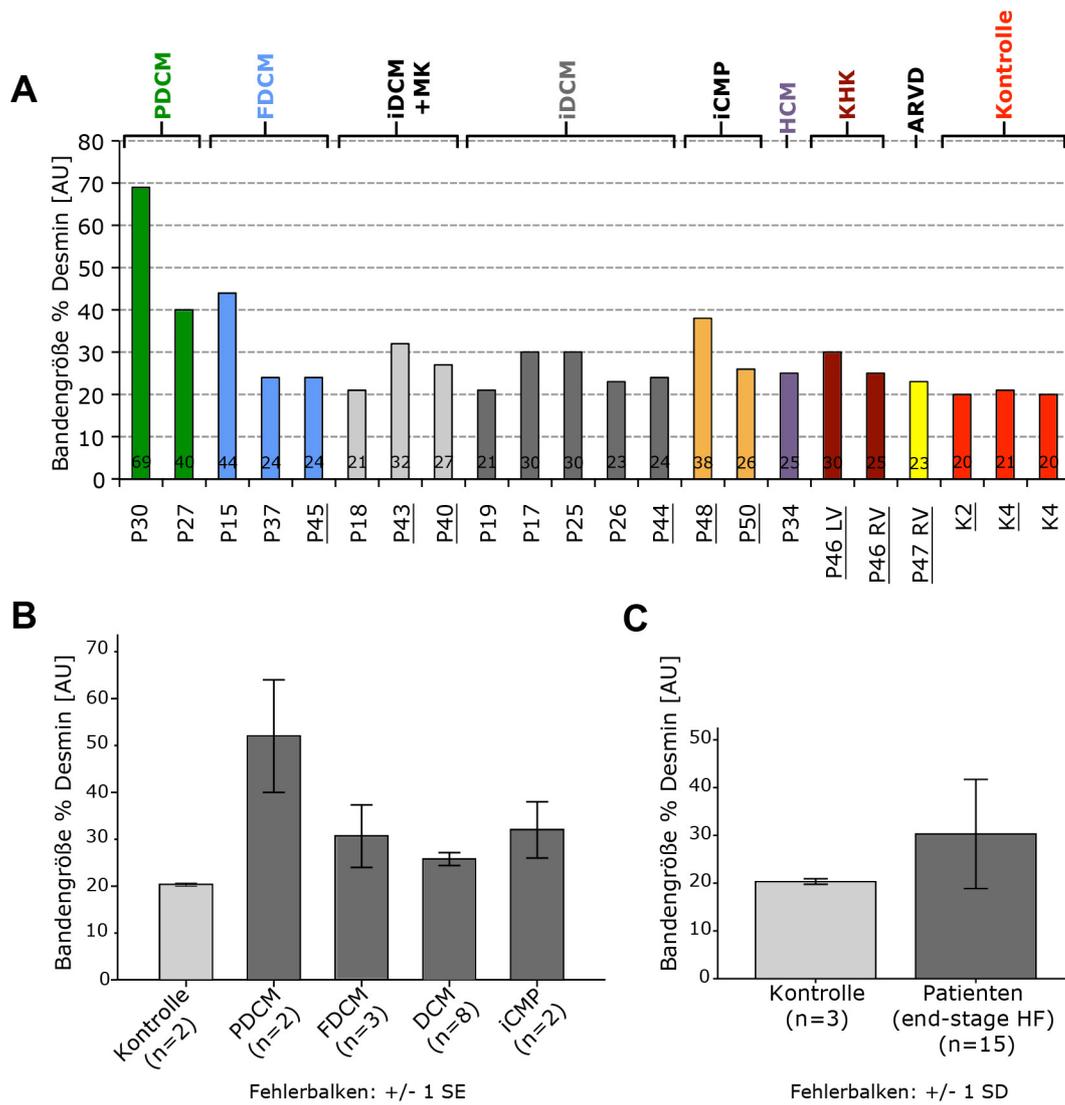


Abb. 39. Quantifizierung der Expression des Intermediärfilament Proteins Desmin im LV von Patienten mit Herzversagen im Endstadium. (A) Desmin Bandenintensitäten der einzelnen SDS-Proben aus dem LV genormt auf Bandenintensitäten des sark. MHC. (B) Die Expressionslevel vom Desmin sind bei PDCM, FDCM, den übrigen sekundär verursachten DCM (entweder durch Myokarditis oder wahrscheinlich ischämisch) und iCMP gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Die statistische Analyse mit einfaktorieller Anova ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p=0,004$, $F=6,43$). Mehrfachvergleiche durch Dunnett-T-Test (keine Varianzhomogenität) ergaben jedoch nur einen signifikanten Unterschied zwischen iDCM und Kontrolle, was darauf zurückzuführen ist, dass sie die geringste Streuung aufweist. (C) Alle Patienten mit Herzversagen im Endstadium gegen Kontrolle ergeben keinen signifikanten Unterschied ($p=0,139$, $F=2,419$) aufgrund der sehr großen Streuung der HF-Gruppe gegenüber der sehr kleinen Streuung der spärlichen Kontrollgruppe. Die Kontrollgruppe besteht aus 2 Proben wobei eine davon 2x erfolgreich geblottet wurde. Bandenintensitäten in Arbitrary Units (willkürlichen Einheiten).

3.6. Expression der humanen EH (embryonalen Herz)-Myomesin Isoform bei Kardiomyopathien

Um festzustellen ob die humane EH-Myomesin Isoform bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie im Herzen wieder exprimiert wird wurden SDS-Proben des linken Ventrikelmyokards von 13 Patienten mit einer DCM (PDCM, FDCM, DCM mit MK, unbekannter DCM) am Gradientengel (Semidry) geblottet. Um festzustellen ob diese erneute Expression lediglich auf eine DCM zutrifft, wurden die SDS-Proben einer HCM, einem kongenitaler Herzdefekt (TGA), 2 iCMP und der RV einer ARVD mitgeblottet. Als Kontrolle dienten die SDS-Proben vom Spendermyokard und einer KHK. Von einem Patienten mit ARVD wurde der rechte Ventrikel geblottet, da bei dieser Erkrankung überwiegend der RV betroffen ist. Das EH-Myomesin wurde durch einen polyklonalen Kaninchenantikörper (Agarkova et al., 2000) bei ca. 192kDa detektiert.

Bei normaler Belichtungszeit waren sehr deutliche Banden im LV von 4 iDCM Patienten (P19, P17, P25, P26), 2 FDCM Patienten (P15, P37) zu erkennen, sowie eine äußerst starke Bande im RV des einzigen ARVD Patienten (P47) (Abb.40 B, obere Reihe). Bei dem überwiegenden Teil der übrigen Proben waren sehr schwache Banden - mit Ausnahme von der einzigen Probe mit kongenitalem Herzdefekt, der einzigen HCM Probe und einer der beiden PDCM Proben (P30)- leicht zu erahnen. Eine Belichtungszeit von ungefähr 1 Stunde zeigte nicht nur deutlichere Banden bei den übrigen DCM Proben, mit Ausnahme von einer PDCM Probe (P30, Kind wies bei der Geburt auch eine DCM auf), sondern auch Banden bei den beiden Proben aus dem Spendermyokard und der KHK Probe (Abb.40 B, untere Reihe). Bei TGA war selbst nach einer einstündigen Belichtungszeit keine Bande zu erkennen. Der Abgleich der durch Ponceau Red abgefärbten Nitrocellulose zeigt jedoch dass der obere Bereich dieser SDS-Probe nicht richtig geblottet hat, da keine sarkomere MHC Bande sichtbar ist. Es ist bekannt, dass der Transfer von hochmolekulargewichtigen Proteinen bei Semdry Blotting weniger gut funktioniert als bei Tankblotting. Bei der einzigen HCM Probe war selbst nach zweistündiger Belichtungszeit keine Bande zu erkennen.

Extrem schwache Banden waren bei normaler Belichtungszeit von DCM mit MK (P43, P18, P40), erkennbar, obwohl die Proben von P43 und P40 sogar überladen wurden.

Schlussfolgernd daraus lässt sich sagen, dass das EH-Myomesin nicht nur bei einer DCM wieder exprimiert wird, da eine Expression bei den meisten Proben unterschiedlich stark gegeben ist. Ausnahmen bilden eine PDCM und eine HCM Probe. Eine schwache Expression ist sogar in den Kontrollproben nachweisbar. Trotz normaler Ladungsmenge ist im RV von ARVD die stärkste Hochregulierung erkennbar.

Die Re-Expression von EH-Myomesin erscheint demnach als Marker für eine DCM ungeeignet.

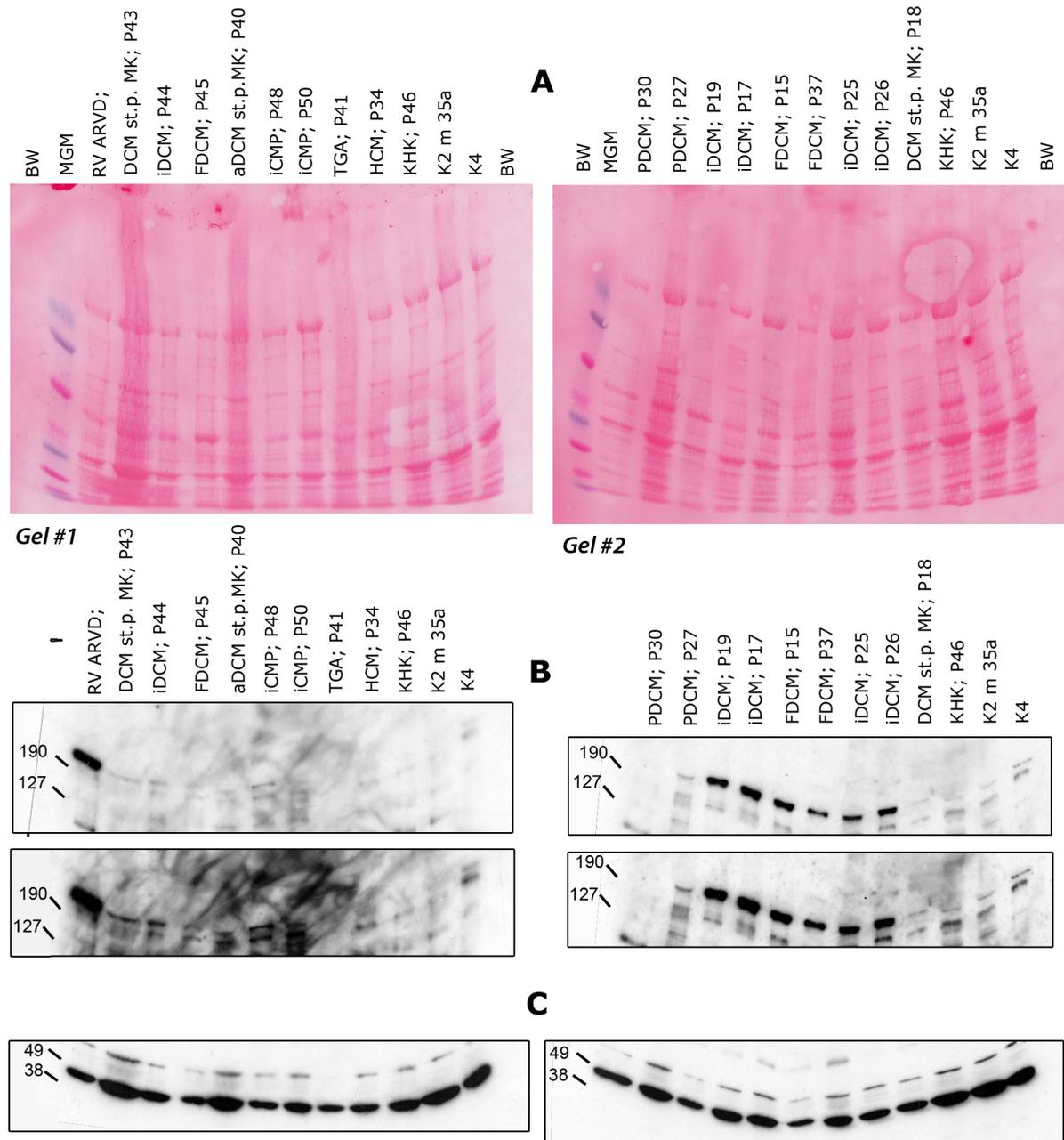


Abb. 40. Expression der embryonalen humanen EH-Myomesin Isoform im Ventrikelmyokard von Patienten mit Herzversagen im Endstadium. SDS- Proben auf 4-12%igen Gradientengel getrennt. (A) durch Ponceau Red angefärbte Nitrocellulose (SemidryBlot) zeigt unterschiedliche Ladungsmengen der SDS-Proben. (B) Detektion des humanen EH-Myomesin durch pR Primärantikörper bei ca. 192kDa. Die direkt unter der EH-Myomesin liegende Bande stellt die Splicing Variate ohne EH-Segment dar. Obere Reihe zeigt Banden bei normaler Belichtungszeit (2min), untere Reihe bei einstündiger Belichtungszeit. (C) Durch mM Primärantikörper detektierte Banden vom kardialen Aktin bei ca. 42kDa dienen als Ladekontrolle. Das hu EH-Myomesin wird am stärksten im RV bei ARVD trotz normaler Ladungsmenge exprimiert. Deutliche Banden sind auch bei 6 (von 13) DCM Patienten sichtbar. Schwache Proteinbanden werden zumindest bei langer Belichtungszeit bei den meisten geladenen SDS-Proben aus dem LV sichtbar, mit Ausnahme einer PDCM Probe (P30), der einzigen HCM Probe (P34) und dem einzigen kongenitalen Herzdefekt (TGA, P41). Letztere Probe scheint beim Abgleich mit der Ponceau Red gefärbten Nitrocellulose im hochmolekularen Bereich nicht richtig geblotet zu haben.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, mittels spezifischen Antikörpern gegen verschiedene Proteine der Zellarchitektur potentielle subzelluläre Veränderungen in einer Reihe von Proben mit Herzversagen im Endstadium zu untersuchen. Die Auswahl der untersuchten Proteine basierte zum Großteil auf Beobachtungen, die an Mausmodellen für DCM gemacht worden waren und wo vor allen Veränderungen in der Zusammenstellung der Interkalierenden Scheiben zu sehen waren (Ehler et al., 2001). Gleichzeitig wurde auch die generelle Morphologie der Proben auf subzellulärer Ebene untersucht. Die Resultate deuten darauf hin, dass die Veränderungen, die im Mausmodell zu sehen waren, nur in einigen vererbaren DCM Proben reproduziert werden können, sich in den meisten anderen Endstadiumproben jedoch ein heterogeneres Bild zeigt. Im folgenden Kapitel werden diese Ergebnisse und mögliche Gründe für die Unterschiede diskutiert.

4.1. Generelle morphologische Befunde der immunfluoreszenten Proben

In den Negativkontrollen der Kryo- und Paraffinschnitte war im roten Fluoreszenzkanal eine unspezifische Hintergrundfärbung sichtbar. Dabei handelte es sich um eine auffällig granuläre Struktur die sich überwiegend an den Zellkernpolen befand. Es handelt es sich bei diesem unspezifischen Signal vermutlich um autofluoreszente Lipofuszingranula (LFG), welches in Kardiomyozyten hauptsächlich im Myofibrillen-freien Sarkoplasma an den Kernpolen konzentriert vorkommt (Munnell & Getty, 1968).

Unter Lipofuszin versteht man eine intralysosomale, polymere Substanz, welche primär aus quervernetzten Proteinresten besteht und durch oxidative Prozesse gebildet wird. Es handelt sich sowohl chemisch als auch morphologisch um eine polymorphe, nicht homogene, Abfalls substanz welche nicht abbaubar ist, d.h. nicht durch Exozytose entfernt werden kann. Dies bedingt, dass eine zunehmende Anreicherung in nicht mehr proliferierenden Zellen, wie z.B. Kardiomyozyten, erfolgt. Der einzige bekannte Mechanismus welcher den Zellen erlaubt, sich dieser Abfallprodukte zu entledigen, ist Proliferation, wodurch die Menge der zerstörten Strukturen durch einfache Verdünnung effizient vermindert wird (Brunk & Terman, 2002).

LFG weist eine Autofluoreszenz mit einem breiten Exzitations- und Emissionsspektrum auf, dessen Maxima stark variieren (Yin, 1996; Terman & Brunk, 1998; Schnell 1999). Das Spektrum von LFG überlappt jenes von häufig für die Fluoreszenzmikroskopie benutzten Fluorophoren, wodurch die Unterscheidung der spezifischen und Unspezifischen Fluoreszenzfärbung schwer oder unmöglich macht (Schnell et al., 1999). Die breiten Exzitations- und Emissionscharakteristika von LFG, suggerieren, dass sie aus einer Mixtur verschiedener fluoreszenter Moleküle bestehen (Schnell et al., 1999).

Ein weiteres Indiz dass es sich beim autofluoreszenten Signal in den Proben um Lipofuszin handeln könnte ist, dass diese granulären Strukturen in großen Mengen in negativ Kontrollen der älteren Patienten (über 40 Jahre), jedoch bei den jüngeren Patienten (über 11 Jahre) kaum vorhanden waren.

Dies entspricht auch der weit verbreiteten Aussage, dass die Akkumulierung von LFG in postmitotischen Zellen eine lineare Abhängigkeit zum Alter aufweist (Strehler et al. 1959) und mit dem Beginn der zweiten Lebensdekade, d.h. ungefähr ab dem 10. Lebensjahr, in den humanen Kardiomyozyten gegenwärtig ist (Jayne, 1950; Ullisova, 1957; Strehler et al., 1959). Goyal (1981) beschreibt sogar, dass LF bereits ab dem 9. Lebensjahr im linken Ventrikelmyokard zu finden ist. Strehler et al. (1959) haben jedoch kein Lipofuszinpigment bei 32 untersuchten Kindern unter 10 Jahren dokumentieren können.

Die jüngsten Patienten von denen in dieser Arbeit IF markierte Gewebeschnitte aus dem linken Ventrikelmyokard ausgewertet wurden waren P34 und P39 (beide 12 Jahre), P41 (14 Jahre), P45 (15 Jahre) und P40 (16 Jahre) und alle hatten bereits manchmal vereinzelt sehr kleine LFG in ihren Kardiomyozyten. Bei den übrigen Patienten mit einem Alter von über 40 Jahren waren deutlich viel mehr LFG angereichert zu sehen. Unklar ist jedoch wieso im RV von P41, mit TGA und einem Alter von 14 Jahren, sowie P40 mit aDCM (MK und Becker Muskeldystrophie) und einem Alter von 16 Jahren im Vergleich zum LV sehr viel mehr LFG (untypisch für das Alter) an den Zellkernpolen angereichert war. Auffällig war jedoch, dass die LFG Akkumulierung bei den Patienten über 40 auch unterschiedlich zu sein schien. Bei einigen Patienten mit extremen morphologischen Ausprägungen schienen mehr LFG angereichert zu haben als bei anderen. Möglicherweise steht die Anreicherung von LFG ebenfalls in einem Zusammenhang mit zellulärem Stress und unterschiedlicher lysosomaler Aktivität zwischen Patienten. In den letzten Jahren ist klar geworden, dass der Proteinabbau eine wichtige Rolle in der Erhaltung der Herzgesundheit spielt und dass eine Störung von Prozessen, die die Funktionalität des Proteasoms bzw. die Autophagie betreffen zur Herzkrankheit führen kann (siehe Übersichtsartikel von Yamaguchi et al., 2012). Akkumulation von mutierten Proteinen bzw. von während ihrer Arbeit beschädigten Proteinen könnte dazu führen, dass der Proteinabbau überlastet wird.

4.2. Morphologische Veränderungen in Anordnung und Form der Kardiomyozyten bei Herzerkrankungen

Ein *Myocyte Disarray* wurde von vielen Autoren als ein histopathologisches Kennzeichen für eine HCM beschrieben (Hughes 2006; Seidman & Seidman 2001; Davies 2000; Varnava et al. 2000;). Varnava et al., 2000 schlagen sogar vor, dass ein *Myocyte Disarray* möglicherweise eine direkte Antwort auf funktionelle oder strukturelle Abnormalitäten des mutierten sarkomeren Proteins bei einer HCM ist. In einer weiteren Publikation wurde sogar beschrieben, dass ein *Myocyte Disarray* in einem größeren Ausmaß bei jungen HCM Patienten zu finden ist und bei diesen Patienten mit SCD (aus dem engl. *sudden cardiac death*, plötzlichen Herztod) assoziiert ist (Varnava et al., 2001). Ho et al. 2009

verweisen auf den möglichen Zusammenhang zwischen den Veränderungen in der Architektur der Myozyten (d.h. *Myocyte Disarray*, Fibrose, Hypertrophie) und einer - der früh entwickelten diastolischen Dysfunktion folgenden - systolischen Dysfunktion bei HCM.

Bei der einzigen extraplatantierten HCM Probe (P34, m., 12 Jahre.) war stellenweise ein relativ schwach ausgeprägtes *Myocyte Disarray*, mit stark unregelmäßigen und für das Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation sehr großen hypertrophierten Myozyten, ausgebildet.

Jedoch war die Ausbildung eines *Myocyte Disarray* nicht nur auf diese HCM Probe beschränkt, sondern konnte auch in Patientenproben mit einer DCM, mit kongenitalen Herzdefekten, mit ICMP und dem ARVD Patienten beobachtet werden. Der rein optisch erfasste Schweregrad des *Myocyte Disarray*, der Fibrose sowie die Myozytenform variierte dabei sehr stark innerhalb des jeweiligen Krankheitstypus, zwischen dem linken und rechten Ventrikelmyokard als auch innerhalb des gleichen IF-markierten Gewebeschnittes. Bei vielen Proben wurden sogar neben stark desorganisierten Stellen ebenso eine weitaus regelmäßigeren und schönere Anordnung des Gewebes beobachtet.

Demnach handelt es sich nicht um ein spezielles Kennzeichen für eine HCM oder gar für die Kardiomyopathie selbst, da es bei beiden kongenitalen Herzdefekten (TGA , HRHS) und sogar bei einer der Kontrollen (K2) ausgebildet war.

Die Ergebnisse gleichen mit denen von Van der Bel-Kahn (1977), der ebenfalls beschreibt, dass ein *Myocyte Disarray*, wenn auch in einem geringeren Ausmaß, in Patienten mit DCM, alkoholischer Kardiomyopathie, verschiedenen angeborenen Herzerkrankungen und Kardiovaskulären Erkrankungen (systemische Hypertension, KHK und cor pulmonale) und in normalen Herzen vorzufinden ist. Es wurde bisher auch kein Konsens über die Menge an *Myocyte Disarray* festgesetzt, der die Kriterien für die Diagnose einer HCM erfüllt (Almaas & Amlie, 2010). Die Festlegung erscheint jedoch belanglos nachdem der HCM Patient nicht die auffälligste und schwerste Desorganisation an Myozyten im Gewebe aufwies.

Vielmehr handelt es sich beim *Myocyte Disarray* um einen generellen adaptiven Umbauprozess dem, aufgrund lang andauernder ungünstiger Druckverhältnisse des Herzens, eine Degeneration an Myozyten, Vernarbung des Gewebes und in Folge höchst variable unregelmäßige Myozytengestalt die jene zelluläre desorganisierte Ausrichtung verursacht vorausgeht.

Die 9 Monate alte MLP Knockoutmaus, ein Mausmodell für die DCM (Arber et al., 1997), zeigte im Vergleich zum entsprechenden WT hingegen kein *Myocyte Dissarray* in den IF markierten Kryoschnitten auf. Die Fibrose war im Vergleich zu den gesunden und erkrankten humanen Myokardproben jedoch auch nur sehr geringfügig ausgeprägt. Bei einer myokardialen Fibrose handelt es sich um einen laufenden aktiven Prozess, bei dem eine zunehmende Ansammlung an Kollagen im Gewebe stattfindet und ist nicht einfach als eine Antwort auf myokardiale Verletzungen unterschiedlicher Ursache anzusehen (Anand & Florea, 2011.). Möglicherweise sind diese morphologischen Unterschiede zwischen Maus und Mensch einfach durch die generelle Kurzlebigkeit von Mäusen im Vergleich zum Mensch, als auch durch die weit komplexeren Umbauprozesse

(bezeichnet als *Remodelling*) und enorm heterogene Symptomatik innerhalb der humanen Herzerkrankungen erklärbar. Der Mensch muss mit den pränatal ausgebildeten Kardiomyozyten Zeit seines Lebens auskommen, nachdem bei allen Mammaliern postnatal die Kardiomyozyten keine Zellteilung mehr durchlaufen und Größenwachstum nur mehr durch Hypertrophie stattfindet. Für einen Wiedereintritt von Myozyten in den Zellzyklus mit Replikation und somit einsetzenden selbstheilenden Prozessen durch intensiven lang andauernden Stress, gibt es bisher keine eindeutigen Beweise (Anand & Florea, 2011).

Grundsätzlich ist der Schweregrad der Symptomatik bei einer DCM Erkrankung höchst variabel, selbst im Fall einer erblichen DCM (FDCM) mit derselben Genmutation (laminA/C) (Perrot et al., 2009). Ebenso ist kein einheitlicher Phänotyp beim Ausbruch der FDCM Erkrankung mit derselben Genmutation (laminA/C) feststellbar (Gupta et. al, 2010).

In dieser Arbeit war bei beiden extraplatantierten FDCM Proben, im Vergleich zu den übrigen Proben eine extrem dünne und stark elongierte Myozytengestalt auffällig. In den IF markierten Schnitten der jüngeren FDCM Patientin (P45) war dies im gesamten Gewebe dominierend und bei der Älteren (P15) zumindest stellenweise ausgebildet. Ebenso hatten beide ein „*Spongy Heart*“ auf zellulärer Ebene. Demnach wäre hier ein ähnlicher morphologischer Phänotyp ausgebildet, dem ähnliche erbliche regulative Störungen und physiologische Umbauprozesse zugrunde liegen müssten. Die Probengröße ist jedoch nicht repräsentativ.

Eine weitere morphologische Auffälligkeit war das Vorkommen von zweikernigen Kardiomyozyten im linken Ventrikelmyokard von einigen Patienten. Unverkennbar häufig waren binukleäre Myozyten bei P17, mit ischämischer DCM, in den meisten Arealen vorhanden. Eine genaue Evaluierung des Vorkommens von mono- oder binukleären Myozyten wurde nicht durchgeführt, da hierfür wenigstens die ECM angefärbt hätte werden müssen, um eine klare Zellabgrenzung zu demonstrieren. Eine Studie von Olivetti et al. (1996) zeigte jedoch, dass mononukleäre Zellen etwa 77%, binukleäre Zellen 22% und trinukleäre gemeinsam mit tetranukleären Zellen weniger als 1% der Myozytenpopulation des normalen menschlichen Herzens umfassen. Weiters wurde in dieser Studie gezeigt, dass weder der Alterungsprozess, noch eine kardiale Hypertrophie, verursacht u.a. durch ischämische Kardiomyopathie, einen Einfluss auf die Häufigkeit im Vorkommen von mononukleären und multinukleären Myozyten im Myokard haben.

4.3. Proteine des Sarkomers in versagenden menschlichen Herzen

Bei allen Patienten mit Herzversagen im Endstadium (iCMP, DCM, ARVD, kongenitale Herzdefekte) war die strukturelle Verankerung der elastischen und kontraktile Elemente an den Z-Scheiben und M-Banden, als auch die Stabilisierung des Myosinfilaments innerhalb der A-Banden durch das MyBP-C von keinerlei sichtbaren Umbauprozessen betroffen. Dies ist analog zu den Beobachtungen an Mausmodellen für die DCM, in denen auch keine besonderen Veränderungen in der Anordnung der Sarkomere selber gefunden werden konnten (Ehler et al., 2001; Perriard et al., 2003).

Herman et al. haben 2012 postuliert, dass 27% der Fälle von vererbbarer DCM durch eine Trunkierung des Titinmoleküls verursacht werden. Nachdem in den hier untersuchten Proben immer das C-terminale Epitop von Titin (m8 Epitop) nachgewiesen werden konnte, kann angenommen werden, dass das Titinmolekül intakt ist und der DCM andere Ursachen zugrunde lagen.

Die ARVD stellt eine Erkrankung des Herzmuskels dar, bei der es sich um eine Erkrankung handelt die aus Desmosomaler Dysfunktion resultiert (Towbin & Jefferies, 2011).

Bei der familiären HCM kommt es hingegen bei ungefähr 70% der Fälle zu Mutationen in Genen die Proteine des Sarkomers kodieren und zu einer Störung in der Kraftgenerierung führen (Towbin & Bowles, 2002; Towbin & Jefferies, 2011). Bei der einzigen Probe die eine HCM Erkrankung aufwies konnten weder Veränderungen am C-Terminalen und N-Terminalen Titin Epitop, noch in der Organisation von α -Aktinin oder Myomesin festgestellt werden. Grundsätzlich war auch ein sehr regelmäßiges MyBP-C Muster innerhalb der Sarkomere zu erkennen. Hinweise für eine Zellautonome Reduktion des MyBP-C Signal waren jedoch auch zu erkennen.

4.4. Veränderungen in den Kardialen MLP Proteinleveln bei Menschen mit Herzversagen im Endstadium

Eine Vielzahl an Studien zeigt auf, dass Mutationen in humanen CSRP3 Gen kodierend für MLP, mit Kardiomyopathien (HCM und DCM) assoziiert sind (Gehmlich et al. 2008; Buyandelger et al., 2011). Veränderungen in der Expression des MLP stehen im Zusammenhang mit Herzversagen im Endstadium bei Menschen (Zolk et. al, 2000; Boateng et al., 2007; Gehmlich et al., 2008). In Infarkt Herzen von Mäusen und Ratten kommt es zu einer Zunahme der MLP Proteinlevel (Heinecke et al., 2005; Wilding et al., 2006). Die Hypertrophie der Myozyten, stellt eine gut bekannte Reaktion eines nach post Infarkt einsetzenden Umbauprozesses dar (Heinecke et al., 2005).

Der Expressionslevel von MLP wird ebenso bei Stimulierung einer Hypertrophie in Kardiomyozyten von Ratten hochreguliert, indem die Überexpression an sich die Zunahme der Größe der Myozyten und die sarkomere Organisation fördert (Heinecke et al., 2003). Zolk et al. 2000 haben beschrieben, dass es bei ungefähr 50% der Patienten mit Herzversagen im Endstadium verursacht durch ischämische oder dilatative Kardiomyopathie, zu einer Abnahme der MLP Proteinlevel kommt. Gehmlich et al., 2008 haben eine reduzierte Menge an MLP Protein, die durch den Einsatz eines Assistance Device weiter herabgesetzt werden, im LV bei Menschen mit einer DCM im Vergleich zum nicht-versagenden Herzen festgestellt. Nachdem MLP -/- Mäuse den Phänotyp einer dilatativen Kardiomyopathie entwickeln (Arber et al., 1997) und es in der humanen DCM zu einer Herunterregulierung an MLP kommt (Gehmlich et al., 2008), ist es anzunehmen, dass der Verlust an MLP ein Charakteristikum für eine DCM darstellt, wohingegen erhöhte MLP Proteinlevel das Charakteristikum für eine HCM darstellen (Heinecke et al., 2003; Heinecke et al., 2005; Wilding et al. 2006). Erhöhte Level an MLP stellen dadurch möglicherweise eine wichtige hypertrophe Antwort auf mechanischen Stress, verursacht durch langwierige hämodynamische Überlastung des Herzmuskels,

dar (Wilding et al. 2006; Boateng et al., 2007). Wobei nicht klar ist ob niedrige MLP Proteinlevel zum fortschreitenden Prozess des Herzversagens beitragen, ein Epiphänomen, oder einen Teil der kompensatorischen Antwort darstellen (Wilding et al. 2006; Katz et al., 2000).

Die Ergebnisse der Immunoblot Analyse dieser Arbeit zeigten jedoch signifikant hochregulierte Expressionslevel von MLP im LV von Patienten mit Herzversagen im Endstadium gegenüber der Kontrollgruppe. Signifikant erhöhter Proteingehalt an Total MLP im LV wurden sowohl bei dilatativer Kardiomyopathie, als auch ischämischer Kardiomyopathie gegenüber einer Kontrollgruppe festgestellt. Selbst bei den kongenitalen Defekten war eine Erhöhung gegenüber der DCM erkennbar. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass eine Hochregulierung nicht nur auf eine Hypertrophe Kardiomyopathie zutrifft.

Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der Studie von Boateng et al. (2007) überein, bei der eine Quantifizierung des totalen MLP bei nicht-versagenden und 7 versagenden menschlichen Herzen (nicht-ischämische, ererbte Form) eine signifikante Erhöhung bei Herzversagen zeigt. Gleichzeitig kam es zu einer Abnahme im oligomeren MLP und einer Zunahme vom monomeren MLP im Nukleus. Das gleiche Phänomen wurde in Infarkt- und Druck-Überladenen Rattenmodellen für Herzversagen beschrieben. Wilding et al. (2006) stellten fest, dass eine reduzierte Auswurfsfraktion des LV (LVEf) mit der Zunahme an totalem kardialen MLP im Rattenherzen nach dem Infarkt assoziiert ist. Dies deutet eigentlich darauf hin, dass es zu einer generellen Akkumulierung vom totalen MLP bei Herzversagen kommt. Die LVEf lag bei allen Patienten mit Herzversagen im Endstadium unter $\leq 25\%$ und einem Durchschnittswert von ca. 15%. Die Analyse der Bandenintensitäten im Immunoblot zeigt zwei Ausreißer, bei denen die MLP Level im Vergleich zur Kontrolle hochreguliert sind. Diese Patienten (P44, P17) mit iDCM wiesen zugleich die höchste LVEf auf (25%). Gleichzeitig konnte ein Zusammenhang mit stärksten Bandenintensitäten und sehr niedriger LVEf beobachtet werden.

Die von Zolk et. al (2000) beschriebene große Variabilität des MLP Protein Gehaltes in nicht-versagenden Kontroll-Herzen, schließen nicht nur die Verwendung der MLP Proteinlevel für diagnostische Ziele im Falle einer Herzerkrankung bei Menschen aus, sondern könnten auch eine Erklärung für die Diskrepanzen in den Ergebnissen der verschiedenen Studien betreffend des Total MLP Gehaltes darstellen.

Eine weitere mögliche Erklärung für die abweichenden Ergebnisse der Studien könnte eine unterschiedliche Methodik oder die Behandlung der Patienten mit unterschiedlichen Medikamenten liefern. In der Studie von Zolk et al., 2000 wurden die Patienten z.B. mit Nitraten behandelt um die Level des Stickstoffmonoxids zu erhöhen, was wiederum zur Herunterregulierung von MLP führen kann (Heinecke et al., 2003).

4.5. Veränderungen an den Interkalierenden Scheiben bei Herzerkrankungen

Die Ergebnisse der konfokalen Analyse zeigen, dass Veränderungen in der Komposition und Struktur des Zytoskeletts von Kardiomyozyten aus dem linken und rechten Ventrikelmyokard von Patienten mit Herzversagen im Endstadium hauptsächlich die mechanische und oder elektrische Koppelung der Zellen, aber auch das mit der Plasmamembran assoziierte stabilisierende Gerüst in unterschiedlicher Ausprägung betreffen.

Eine der ersten Auffälligkeiten bei der konfokalen Analyse der humanen Proben des Ventrikels, war das Vorkommen von scheinbaren doppelten Interkalierenden Scheiben (ID), die möglicherweise durch ein fast senkrechtes Hineinstrecken einer Myozyte zwischen zwei benachbarte Myozyten zustande kommen. Dieses Phänomen war häufig in den immunfluoreszent gegen Proteine der ID angefärbten Schnitten des Spendergewebes (n=2, <40 Jahren) zu finden. Wohingegen solche Strukturen weder bei der MLP Knockoutmaus, noch dem entsprechendem Wildtyp zu finden waren. Bei Patienten mit Herzversagen im Endstadium (n=21) waren solche doppelten ID nicht immer in den willkürlich gewählten Aufnahmen der ventrikulären Gewebeschnitte vorhanden. Das Vorkommen war dabei erkrankungs- und altersunabhängig.

Frühe morphologische Studien haben gezeigt, dass die ventrikulären Kardiomyozyten nicht einfach zylindrisch sind, sondern dass aus deren Zellkörper multiple säulenartige Endfortsätze entspringen, welche sich wiederum in Subsegmente aufteilen und endstehende ID bilden (Hoyt et al., 1989). Daraus ergibt sich ein irreguläres verästeltes Muster von multiplen, annähernd transvers zur Längsachse ausgerichteten, ID durch welche eine Myozyte (bei Hund und Mensch) via *end-to-end* und *side-to-side* ID zu durchschnittlich 9-12 benachbarten Zellen in Kontakt steht (Hoyt et al. 1989; Luke & Saffitz, 1991; Peters et al., 1993; Kanter et al. 1995; Yamamoto et al., 1996). Aufgrund der relativ hohen Schnittdicke handelt es sich wahrscheinlich bei diesen in der konfokalen Mikroskopie beobachteten scheinbar doppelten ID, einfach um die Kontakte von verschiedenen Zellfortsätzen und somit um ein allgemeines morphologisches Charakteristikum. Die Anzahl der durchschnittlichen Zell-Zell-Kontakte mit denen eine Myozyte zu benachbarten Zellen in Kontakt steht, ist für Mäuse nicht beschrieben worden. Möglicherweise liegt bei jenen dieses Verästelungs-ähnliche Muster von ID Kontakten weniger ausgeprägt vor, wodurch in der konfokalen Analyse solche scheinbaren doppelten ID, wie sie in extremer Form besonders häufig im humanen Spendergewebe vorlagen, nicht anzutreffen sind.

Luke & Saffitz (1991), beschrieben außerdem bei Hunden einen deutlichen Unterschied im Muster der interzellulären Verbindungen von Myozyten der Zone des Herzens, welche an das Infarktarnbengewebe grenzt (bezeichnet als *Infarct Border Zone*) im Vergleich zum gesunden Gewebe. Die Anzahl der Zellen die in Verbindung zu einer einzelnen Myozyte der *Infarkt border Zone* stehen beträgt 6,5 Zellen, verglichen zu 11,3 im normalen Gewebe. Diese Reduktion kommt durch die Akkumulierung von Kollagen im verheilten Infarktgewebe zustande. Diese Reduktion betrifft überwiegend die *Side-to-Side ID*. Yamamoto et al. (1996) beschreiben einen signifikanten

Anstieg an interzellulären Kontakten einer einzelnen Myozyte zu benachbarten Myozyten bei Patienten mit konzentrischer Hypertrophie.

Bei einer dilatativen Kardiomyopathie kommt es aufgrund vom Absterben von Zellen durch Apoptose und Nekrose folglich zu einer starken interstitiellen Fibrose, wodurch folglich auch eine Reduktion an Zell-Zell Kontakten stattfinden müsste. Indizien für eine solche Reduktion zeigt z.B. P45 (15 Jahre, FDCM) mit extrem dünnen elongierten Kardiomyozyten, einem Spongy Heart auf zellulärer Ebene, *Myocyte Disarray* und starker Fibrose. Die zuvor beschriebenen doppelten ID wurden bei diesem Patienten nicht beobachtet und ebenso erscheint die Anzahl der ID im Vergleich zu den Kontrollen in den Aufnahmen reduziert. Eine genaue quantitative Analyse wurde hier jedoch nicht durchgeführt, es handelt sich um eine reine qualitative Beobachtung.

4.5.1. Veränderungen an den Interkalierenden Scheiben bei Kongenitalen Herzfehlbildungen bei Kindern

Die konfokale Analyse der gegen verschiedenen Proteine der Interkalierenden Scheiben markierten Kryoschnitte aus dem linken und rechten Ventrikel von zwei Patienten mit kongenitalen Herzdefekten, die durch operative Eingriffe korrigiert wurden, zeigte bei einer von beiden Proben (P41) extreme Veränderungen in der Ausbildung von GJ im LV. Diese lagen nicht wie sonst üblich in einer linearen Anordnung an den ID sondern es war eine immense Anzahl an verstreuten einzelnen Connexin43 Spots im LV zu erkennen. Die AJ waren hingegen, sowohl im RV als auch LV, normal polar angeordnet und es war keine laterale Tendenz zu erkennen. Die Kardiomyozyten des LV waren bei P41 für das Alter untypisch klein ausgebildet, mit einer allgemein unregelmäßigen Zellgestalt und folglich stark desorganisierten Stellen, wo die Myozyten ihre parallele Ausrichtung zueinander verloren haben. Von allen jungen extraplatantierten Herzproben verschiedener Patienten mit Herzversagen im Endstadium besaß P41 deutlich die kleinsten Myozyten im LV. Im RV war hingegen eine normale Gewebesituation vorhanden.

P39 (12J, w.) litt unter HRHS (hypoplastisches Rechtsherzsyndrom), mit einer Triskupidalatresie (TA) und Pulmonalatresie (PA). Eine Fontan-OP wurde durchgeführt. Bei einer Fontan-OP handelt es sich um keine spezifische Operation, sondern um mehrere aufeinanderfolgende Operationen welche zur Trennung des pulmonalen und systemischen Blutflusses bei Patienten mit einer Ein-Kammer-Herz Physiologie, führen (Lok et al. 2006). Bei HRHS handelt es sich um eine kongenitale Herzfehlbildung, die in einem zum Teil sehr kleinen unterentwickelten RV resultiert. Eine Hypoplasie des rechten Ventrikels kommt mit einer Vielfalt von assoziierten Läsionen vor, von denen am häufigsten eine Triskupidalatresie auftritt, bei welcher der linke Ventrikel sowohl die systemische als auch die pulmonale Zirkulation bewältigt (Weldon et al., 1979). Generell resultiert eine Atresie der artioventrikulären oder semilunaren Klappen in physiologischen Single-Ventricle, bzw. Ein-Kammer-Herz Komplexen, welche eine komplette Mischung der systemischen und pulmonalen venösen Zirkulation aufweisen (Marino et al., 2006). Eine Triskupidalatresie (TA) ist definiert als eine

komplette Obstruktion der artioventrikulären Klappe des RV (Triskupidalklappe), wodurch keine direkte Verbindung mehr zwischen RA und RV besteht (Lok et al., 2006). Da bei P39 neben einer TA auch eine PA ausgebildet war, d.h. eine komplette Obstruktion der Pulmonalklappe vorlag, entsprach diese Herzfehlbildung hämodynamisch wahrscheinlich der Typ IA Triskupidal Atresie. Bei Typ IA Triskupidal Atresie ist die Lage der großen Arterien unverändert, jedoch ist zusätzlich zur TA eine PA mit einem (Ventrikelseptumdefekt) VSD ausgebildet, wodurch nur ein stark unterentwickelter kleiner (hypoplastischer) RV ausgebildet ist (siehe Abb. 41, Lok et al., 2006). Das Venenblut des gr. Kreislaufes fließt in das RA und über das patente Foramen ovale (PFO) oder einen Artriumseptumdefekt (ASD) in das linke Atrium (LA). Das gesamte Blut fließt durch den LV, der den großen Kreislauf versorgt, und über einen patenten Ductus arteriosus (PDA, Ductus Botalli) in den Lungenkreislauf (Lok et al., 2006; Keck et al., 1977). Der Ductus arteriosus Botalli und ein offenes Foramen ovale dient im foetalen Kreislauf der Umgehung des Lungenkreislaufes.

Der LV und LA ist bei einer TA und PA aufgrund Volumenüberladung vergrößert und hypertrophiert (Lok et al., 2006; Bitchell et al., 2006). Die gesamte Architektur der Muskelfasern in TA Herzen ist nicht nur hypertrophiert sondern auch untypisch ausgerichtet und unregelmäßig (O'Connor et al., 1988; zitiert aus Lok et al., 2006). Das hypertrophierte Myokard des RV bei einer PA ohne VSD (Ventrikelseptumdefekt) mit einer Triskupidalklappenstenose zeigt das stärkste *Myocyte Disarray* (O'Connor et al., 1988). Der RV ist praktisch immer hypoplastisch (unterentwickelt) bei einer TA. Die Größe des RV Cavums ist abhängig vom anatomischen Typ einer TA, wobei er im generellen kleiner ist. Bei Typ IA TA ist nur ein sehr kleiner RV vorhanden (Lok et al., 2006).

Die konfokale Analyse der Kryoschnitte von P39 zeigte sowohl im LV als auch im RV ein, mit einer starken Fibrose assoziiertes *Myocyte Disarray*, wobei im RV die desorganisierte Anordnung und unregelmäßigere Zellform stärker ausgebildet war.

P41 hatte eine angeborenen TGA mit diskordanter Ventrikulo-Atrialen (VA) Verbindung, die mittels *Arterial Switch Operation* korrigiert wurde.

Bei einer TGA (Transposition der großen Arterien), handelt es sich allgemein um eine kongenitale Herzfehlbildung, bei welcher die Aorta vorwiegend an einen anatomischen RV und die Pulmonalarterie (PA) vorwiegend an einen anatomischen LV verbunden ist, eine Situation die als diskordante VA Verbindung bekannt ist, bei der eine konkordante AV Verbindung besteht. Der pulmonale und systemische Kreislauf sind dadurch parallel, anstatt wie in gesunden Herzen in Serie, geschaltet. Die Sauerstoffversorgung und demnach das Überleben ex utero, hängt vom Vorhandensein von einer oder mehrerer Querverbindungen und Vermischungspunkten (PFO, ASD, VSD, oder PDA) des arteriellen und venösen Blutes, zwischen diesen beiden Kreisläufen, ab (siehe Abb. 41).

Eine isolierte diskordante VA Verbindung mit einem patenten Foramen ovale (PFO) oder patenten Ductus arteriosus (PDA, Ductus Botalli) ist bei ungefähr 75% der TGA Patienten vorhanden. Bei 50% der Säuglinge mit TGA persistiert der PDA bis zu einem Alter von 2 Wochen, verbessert die arterielle Sauerstoffversorgung und hält ein günstiges LV/RV Blutdruckverhältniss aufrecht, wobei

dies auf die Kosten eines erhöhten pulmonalen Blutflusses geschieht. Ein VSD kommt bei 20% der TGA Fälle vor. Eine Aorta Obstruktion ist selten in TGA mit intaktem Ventrikelseptum (IVS) kommt aber bei 7 bis 10% der Fälle einer TGA mit VSD vor. (Karl & Kirshbom, 2006)

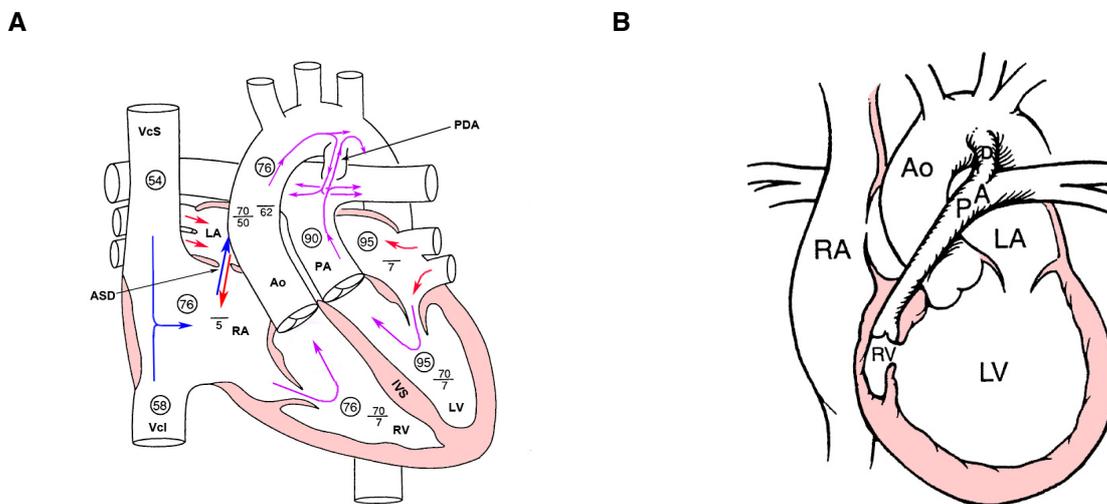


Abb. 41. (A) Unbehandelte TGA mit diskordanter VA Verbindung, konkordanter AV Verbindung ohne VSD. (B) Unbehandelte Native TA Typ IA (HRHS). (A) Vermischung des venösen und arteriellen Blutes erfolgt am ASD und PDA, wodurch die Sauerstoffversorgung gewährleistet wird. Im RV ist der Blutdruck leicht erhöht und im LV leicht erniedrigt. Die Sättigungswerte (eingekreist) und Blutdruckwerte (Systole/Diastole) sind angegeben (modifiziert nach Karl & Kirshbom, 2006). (B) Triskupidalatresie mit Atresie der Pulmonalarterie mit normal verbundenen großen Gefäßen. Nur ein Gefäß (die Aorta) verlässt das Herz. Das O₂-arme Blut fließt, aus der unteren und oberen Hohlvene, in das RA und über eine Lücke oder einen Vorhofseptumdefekt (bzw. das noch offene Foramen ovale) in das linke Atrium. Eine komplette Mischung der systemischen und pulmonalen venösen Zirkulation findet statt. Das venöse Blut wird zum Teil über noch einen offenen Ductus arteriosus Botalli (auch bezeichnet als persistierender Ductus arteriosus) von der Aorta in die Lungenarterien geführt (modifiziert nach Lok, et al. 2006). (Ao) Aorta; (ASD) Atriumseptumdefekt; (D) Ductus arteriosus Botalli; (IVS) intaktes Ventrikelseptum; (LA) Linkes Atrium; (LV) Linker Ventrikel; (PA) Pulmonalarterie; (PDA) patenter Ductus arteriosus; (RA) rechtes Atrium; (VcI) Vena cava inferior; (VcS) Vena cava Superior.

Neugeborene mit einer TGA (diskordante VA Verbindung) ohne zusätzliche Missbildungen, sind aufgrund der fetalen Kreislauftsituation gut entwickelt und wohl gestaltet. Jedoch führt die Umstellung des Kreislaufes zum Zeitpunkt der Geburt, und je nach Verschluss der fetalen Querverbindungen, zur drastischer Verschlechterung der Situation in der Neugeborenenperiode (Keck, 1977).

Neugeborene mit TGA/IVS und einem kleinen PFA oder ASD sind bereits am 1. Lebenstag schwer zyanotisch, wodurch es in Folge zur metabolischen Acidose und einem kardiovaskulären Kollaps kommen kann. Neugeborene mit TGA/VSD oder TGA/IVS mit einem großen ASD oder PDA, weisen eine bessere Vermischung des venösen und arteriellen Blutes aus den beiden Kreisläufen (die effizienteste Vermischung erfolgt am Level der Atrien), und demnach eine bessere Sauerstoffsättigung, auf. Hier ist die phasische Druckänderung, die Volumenüberladung und der PA Druck nicht so kritisch. Jedoch weisen diese Patienten eine höhere Tendenz auf, eine kongestive Herzinsuffizienz zu entwickeln. (Karl & Kirshbom, 2006)

Ein Überleben ohne operative Intervention ist bei einer TGA, je nach Schweregrad, bis zum 6. Lebensmonat oder gar über die Neugeborenenperiode hinaus unwahrscheinlich. Die Säuglinge neigen dazu eine pulmonale vaskuläre Erkrankung zu entwickeln. Als frühester operativer Prozess wird ein ASD angelegt oder vergrößert, um die Vermischung am Level der Atrien zu verbessern. In weiterer Folge wird eine *Arterial Switch Operation* durchgeführt, bei der die PA und Aorta, über dem Aortensinus aus dem die Herzkranzgefäße entspringen, korrekt vertauscht werden. Die Herzkranzgefäße werden ebenfalls auf ihre korrekte Position gebracht. (Karl & Kirshbom, 2006)

Zum Zeitpunkt der Geburt sind die Wände des RV bei TGA Patienten mit einer VA-Diskordanz, untypisch verdickt. Die Verdickung nimmt mit der Zeit zu. Im Vergleich zu Herzen mit einer VA-Konkordanz bleibt die Masse des LV, trotz somatischen Wachstum, bei einer TGA ziemlich konstant, was im Alter von 2 bis 4 Monaten in einem relativ dünnwandigen LV und demnach Linksinsuffizienz resultiert. (Karl & Kirshbom, 2006)

Nach den Ergebnissen aus der konfokalen Mikroskopie, die eine aberrante Anordnung der GJ des LV aufzeigten, müsste der Patient P41 unter enormen Arrhythmien gelitten haben. Kardiale GJ Kontakte stellen eine geregelte Verbreitung der wellenartigen Erregungsleitung sicher und sind somit für die synchrone Kontraktion des Herzens verantwortlich. Es ist demnach sehr naheliegend, dass eine Störung dieser in Myozyten axial ausgerichteten Impulsweiterleitung zur Entstehung von Arrhythmien führt. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Entstehung von Arrhythmien bei adulten erworbenen Herzerkrankungen und der Veränderung in der Organisation der GJ als auch der Expression von Connexin43 wird in vielen Übersichtsartikeln diskutiert (Severs et al., 2004, 2008). Leider fehlten hierzu die genauen klinischen Daten von P41.

Bei jenen Veränderungen die im Zusammenhang mit Arrhythmien stehen sollen, handelt es sich hauptsächlich um eine lichtmikroskopisch erkennbare Lateralisierung der GJ als auch eine Reduktion an GJ Plaques im Herzgewebe mit gleichzeitiger Runterregulierung der Connexin43 Expression. Bei P41 war jedoch eine Hochregulierung des Connexin43 in den Immunoblots erkennbar und weniger eine Lateralisierung als eine generell verstreute Anordnung von vielen einzelnen GJ Spots zu erkennen. Der Hochregulierung des β -Catenins im Vergleich zum Spendergewebe scheint die enorme Anzahl an AJ innerhalb einer konfokalen Aufnahme zugrunde zu liegen, nicht jedoch einem breiteren AJ Signal. Nachdem die Myozyten auch äußerst klein ausgebildet waren ist dieser Zustand im LV von P41 eher mit den altersabhängigen postnatal stattfindenden Umbauprozessen in der Organisation der ID zu vergleichen.

Angst et al., 1997 beschrieben die postnatal stattfindenden Umbauprozesse der ID im Ventrikelmyokard von Ratten und Hunden. Während der postnatalen Reifung des Ventrikelmyokards erreichen die Desmosomen und die Adhäsionszellverbindungen (Adherens Junctions, AJ) nach der Geburt relativ schnell ein polarisiertes Anordnungsmuster an den Enden der Myozyte, wobei die GJ hingegen anfangs ihre verstreute Verteilung über die Myozytenmembran beibehalten und erst langsam durch postnatales Wachstum der Myozyten zunehmend ihre gemeinsam mit den Zell-

Adhäsionsverbindungen korrelierte polare Anordnung erreichen. Diese postnatale Entwicklung geht unterschiedlich schnell bei Ratten, Hunden (Angst et al. 1997) oder Mensch (Peters et al., 1994) vonstatten und scheint mit deren Langlebigkeit korreliert. Peters et al., 1994 beschrieben jene altersabhängigen Umbauprozesse in der Organisation der GJ zuvor bei pädiatrischen Patienten mit kongenitalen Herzdefekten, bei der das endgültige Arrangement ungefähr mit einem Alter von 6-7 Jahren vollzogen ist. Die adaptiven Umbauprozesse finden infolge hämodynamischer Veränderungen im reifenden Herzen statt (Peters et al., 1994). P41 (14 Jahre) weist eine ähnliche verstreute Anordnung der Connexin43 Gap Junctions und eine schon polare Anordnung der AJ auf, wie sie bei den postnatalen Umbauprozessen beschrieben wurde. Möglicherweise ist dieser postnatale Umbauprozess im stärker belasteten LV durch die bei dem Herzdefekt wirkenden gestörten Volumen und Blutdruckverhältnisse arretiert.

Im LV von P39 mit HRHS (w., 12 Jahre) liegen die Gap und Adherens Junctions auf die Interkalierenden Scheiben begrenzt vor. Im RV sind jedoch auch laterale GJ vorhanden. Bei beiden kongenitalen Herzdefekten ist eine aberrante Anordnung der GJ dort vorhanden, wo das *Myocyte Disarray* stärker ausgebildet ist.

Sepp et al. 1996, haben bei adulten HCM Patienten ein ähnliches Muster in der Anordnung der GJ in Arealen mit *Myocyte Disarray* vorgefunden, bei welchen die GJ anstatt auf die ID begrenzt, verstreut über die gesamte Oberfläche der Myozyten vorlagen.

Die größte Problematik bei der Arbeit mit humanen Myokardproben stellt wohl die Tatsache dar, dass es sich um Momentaufnahmen eines bestimmten Zustandes handelt, bei denen die Umbauprozesse meistens sehr weit fortgeschritten sind. Dadurch ist die Interpretation von primär oder sekundär verursachten Umbauprozessen für spezifische Erkrankungen nur durch Vergleiche mit Tiermodellen möglich.

Nachdem bei kongenitalen Herzdefekten äußerst ungünstige und unterschiedliche Volumen und Blutdruckverhältnisse durch anatomische Fehlleitungen vorherrschen, die folglich zu einer Erhöhung an interstitieller Fibrose (durch Apoptose und Nekrose der Zellen), zu einer grundsätzlich unregelmäßigen Zellform und folglich einem *Myocyte Disarray* führen, ist anzunehmen, dass aberrante Anordnungen der GJ auf sekundäre adaptive bzw. maladaptive Umbauprozesse, die primär durch ungünstige Volumen und Blutdruckverhältnisse verursacht werden, zurückzuführen sind.

Laterale GJ wurden nicht nur bei P39 mit HRHS, sondern auch bei einigen anderen extraplatantierten Herzen mit Kardiomyopathie gefunden. Sie waren hauptsächlich im RV ausgebildet. Bei allen war dabei im RV ein stärkeres *Myocyte Disarray* ausgebildet als im LV.

Wie bereits zuvor erwähnt wird eine Lateralisierung der GJ gemeinsam mit einer reduzierten Expression des Connexin43 als eine der vielen möglichen Ursachen für das Auftreten von Arrhythmien in Verbindung gebracht, nachdem die Geschwindigkeit der Impulsweiterleitung durch die Orientierung der Myozyten beeinflussbar erscheint und die myokardiale Weiterleitung parallel zur Längsachse der Zellen um einiges schneller als transvers ist (Severs et al., 2004; Smith et al., 1991).

Wobei gerade bei der Arrhythmogenen Rechtsventrikulären Dysplasie, eine Kardiomyopathie die mit schweren Arrhythmien assoziiert ist (im Gegensatz zum häufigen Vorkommen bei den kongenitalen Herzdefekten), waren fast gar keine, wenn dann nur äußerst unscheinbare laterale GJ in den Gewebeschnitten aus Apexnähe ausgebildet. Bei einer FDCM Patientin (P45) war es bekannt, dass sie unter Ventrikulären Tachykardien litt, laterale Gap Junctions konnten jedoch nicht beobachtet werden. Grundsätzlich ist die DCM oft mit schweren Arrhythmien assoziiert und die meisten DCM Patienten besaßen Implantierbare Kardioverter-Defibrillatoren (siehe Tab. 1). Laterale GJ waren jedoch hauptsächlich bei Patienten ohne bekannte Arrhythmien ausgebildet, was eigentlich darauf schließen lässt, dass eine Lateralisierung nicht als eine der primären Ursachen gesehen werden kann, die zur Ausbildung von Arrhythmien führt.

Das Vorkommen positiver Antikörperfärbung kann strenggenommen lediglich als das Auftreten dieses Proteins interpretiert werden und stellt nicht zwangsläufig einen Marker für das voll funktionsfähige GJ Protein dar (Smith et al. 1991). Bei auftretenden Lateralisierungen von GJ kann somit eine vorliegende Internalisierung oder Endozytose der GJ, verändertes Phosphorylierungsmuster und somit Vorliegen nicht funktionsfähiger GJ nicht ausgeschlossen werden.

4.5.2. Veränderungen an den Interkalierenden Scheiben bei dilatativer Kardiomyopathie.

Eine familiäre hypertrophe Kardiomyopathie (FHCM) wurde als eine Erkrankung des Sarkomers beschrieben, die hauptsächlich durch Mutationen in Proteinen verursacht wird, welche in den kontraktile Prozess involviert sind und demnach die Kraft generieren (Seidmann & Seidmann, 2001). Die Familiäre und demnach erbliche dilatative Kardiomyopathie entwickelt sich hingegen hauptsächlich durch eine geschädigte Kraftübertragung und ist phänotypisch durch eine Verdünnung der ventrikulären Wand mit gestörter Kontraktion charakterisiert und oft mit tödlichen Arrhythmien assoziiert (Perriard et al., 2003).

Ehler et al. 2001, haben erstmals anhand konfokaler Mikroskopie und Immunoblots Veränderungen in der Struktur und Komposition der ID bei zwei verschiedenen Mausmodellen mit unterschiedlichen Ätiologien, welche als Adulte den Phänotyp einer DCM entwickeln, beschrieben und somit vorgeschlagen, dass veränderte Zell-Zell Verbindungen zwischen den Kardiomyozyten möglicherweise eines der Kennzeichen einer DCM darstellen könnten. Bei beiden Mausmodellen für eine DCM, bei denen das MLP ausgeschaltet ist (Arber et al., 1997) oder Tropomodulin hochreguliert ist (Sussman et al., 1998), ist die Expression der mit Adherens Junctions assoziierten Proteine hochreguliert, wohingegen die Expression von Connexin43 herunterreguliert ist. Die konfokale Lichtmikroskopie zeigte bei beiden Mausmodellen eine Reduktion der Anzahl der GJ im LV und ein breiteres β -Catenin und N-RAP Signal an den ID.

Die konfokale Analyse der Proteine der Interkalierenden Scheiben bei adulten MLP $-/-$ Mäusen und dessen entsprechenden WT zeigte hier die gleichen Ergebnisse. Trotz einer normalen Struktur der Sarkomere war eine mehr irreguläre Form der Kardiomyozyten von MLP $-/-$ erkennbar und eine

veränderte ID Struktur im Vergleich zum WT. Sowohl β -Catenin als auch N-RAP wiesen ein deutlich breiteres Signal an den ID auf, wohingegen Connexin43 GJ reduziert waren.

Die konfokale Analyse der Gewebeschnitte des LV von humanen extraplatantierten Herzen mit DCM zeigte hingegen kein einheitliches Muster in der Ausbildung der ID. Das Signal vom AJ Protein β -Catenin war nicht bei allen DCM Proben mehr ausgeprägt und eine Reduktion an Connexin43 GJ war nicht immer ersichtlich, wobei bei letzterem die Probengröße sehr klein ausgefallen ist. Ein breiteres Signal von β -Catenin stand in Verbindung mit stark unregelmäßigen Form der AJ, was auf die bereits von Ehler et al. (2001) anhand von Ultrastruktur beschriebene erhöhte Anzahl an Faltungen der Plasmamembran in der Region der ID hindeutet. Die allgemeine Struktur der AJ im LV von DCM Patienten war auch unterschiedlich ausgeprägt und beinhaltete eine immens ausgebildete Interdigitation von benachbarten Zellen im Fall von einem der DCM Patienten.

Die Immunoblot Analyse der Expressionslevel von β -Catenin und Connexin43 im LV von DCM Patienten im Vergleich zum Spendergewebe zeigt ebenfalls einen stark variierenden Proteingehalt. Nicht überall ist eine klare Hochregulierung des β -Catenin und Runterregulierung des Connexin43 nachweisbar. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die Expressionslevel von β -Catenin oder Connexin43 zwischen den Kontrollen kaum voneinander. Grundsätzlich erscheint dies ein Indiz dafür, dass beim Menschen im Vergleich zu Mäusen die Proteine der ID weitaus komplexeren Regulierungsmechanismen unterliegen und deren Störungen äußerst distinktive Umbauprozesse in der Komposition der ID verursachen.

Demzufolge scheint es sich bei der veränderten Komposition und Struktur der ID, betreffend AJ und GJ, auch nicht um einen primären Effekt bei einer DCM zu handeln. Die gleiche Schlussfolgerung wurde bereits von Ehler et al. (2001) und Perriard et al. (2003) gezogen, nachdem Veränderungen der Expressionslevel der meisten mit den ID assoziierten Proteine erst in adulten Stadien von TOT und MLP $-/-$ Maus auftreten, wenn der Phänotyp einer DCM bereits gut ausgebildet war.

In mehreren Studien wurden reduzierte Connexin43 Level bei Patienten mit Herzversagen im Endstadium, d.h. sowohl bei idiopathischer DCM als auch bei ischämischen Herzerkrankungen und bei Myokarditis festgestellt (Dupont et al., 2001; Kostin et al., 2003).

Die Immunoblot Analyse zeigte jedoch heterogene Connexin43 Proteinlevel im LV von Patienten mit Herzversagen im Endstadium, wobei die Expressionslevel der Kontrollgruppen sich kaum voneinander unterschieden. Die Studie von Boulaksil et al., 2010 zeigte ebenso eine heterogene Connexin43 Expression im LV von Patienten mit Herzversagen im Endstadium (iCMP und DCM, mit oder ohne VT).

Die Biopsien entstammten dabei auch aus der apikalen Region des LV. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang in der Expression von Connexin43 und dem bestimmten Ventrikelareal.

Relevant erscheint jedoch, dass die erbliche Form der DCM, d.h. mit positiver familiärer Anamnese, als einzige „Subgruppe“ der DCM (im Gegensatz zu PDCM, DCM *st.p.* MK, iDCM größtenteils wahrscheinlich ischämisch) die gleichen Veränderungen in der Komposition und Struktur der ID

aufweist wie die Tiermodelle. Bei beiden FDCM Patienten von denen IF markierte Gewebeschnitte des LV gemacht werden konnten, ist ein deutlich breiteres β -Catenin Signal an den ID ausgebildet. Als einzige Untergruppe weisen beide Patienten auch ein deutlich verbreitertes N-RAP Signal an den ID auf und zeigen ausgeprägte Akkumulierungen von N-RAP innerhalb der Myozyten. Die Gap Junctions sind nicht nur innerhalb der willkürlich am konfokalen Mikroskop gewählten Immunfluoreszenz-Aufnahmen in der Anzahl reduziert, sondern auch eine Reduktion an GJ Spots innerhalb der einzelnen ID ist zu erkennen, wobei hier nur eine Probe erfolgreich angefärbt werden konnte. Auch in der Morphologie der Myozytengestalt und Anordnung gibt es durchaus Ähnlichkeiten, wie die Tendenz zu stark elongierten dünnen Myozyten. Die Immunoblot Analyse unterstützt das Ergebnis betreffend einer Hochregulierung von β -Catenin und N-RAP bei allen 3 getesteten FDCM Proben. Connexin 43 ist bei zwei der 3 Proben deutlich herunterreguliert, dabei handelt es sich um jüngere Patienten. Die andere Probe weist einen ähnlichen Connexin43 Proteinlevel wie das Spendergewebe auf, das eventuell durch stattfindende Umbauprozesse aufgrund der langen Dauer der Erkrankung angehoben wurde.

Wie auch immer, Veränderungen in der Connexin43 Expression und subzelluläre Verteilung scheinen einen sekundären Effekt bei Herzerkrankungen darzustellen.

Im Kontrast dazu hat die Studie von Ehler et al (2001) gezeigt, dass N-RAP eine erhöhte Expression bei MLP Knockoutmaus bereits nach der Geburt und bei TOT (*Tropomodulin Overexpressing*) Maus im juvenilen Stadium aufzeigt, selbst bevor die Veränderungen in den Expressionsleveln anderer mit den ID assoziierter Proteinen erscheinen, was einen frühen Marker für eine DCM liefern könnte. Bei transgenen Mäusen mit stabilisiertem β -Catenin (induziert Überexpression von β -catenin), die Adult einen DCM Phänotyp entwickeln, stellt N-RAP das einzige Protein der ID dar, bei welchem es zu Veränderungen im Expressionslevel kommt (Hirschy et al., 2010).

Die Quantifizierung der totalen N-RAP Proteinlevel im LV von Patienten mit Herzversagen im Endstadium zeigte jedoch eine heterogene Expression des Proteins, wobei die Kontrollgruppe vergleichsweise kaum Unterschiede betreffend N-RAP Proteinlevel zeigte. Diese Ergebnisse schließen die Verwendung von N-RAP als frühen Marker für eine DCM aus.

Die Heterogene Expression von N-RAP bei Patienten mit Herzversagen im Endstadium spiegelt sich in der konfokalen Analyse der subzellulären Verteilung wieder. N-RAP war im LV bei allen Proben überwiegend an den ID zu finden. Zellautonome Unterschiede zeigten sich jedoch in der zytoplasmatischen Verteilung von N-RAP, die mit einer veränderten Verteilung an den ID im Zusammenhang stand. Es waren sowohl Kardiomyozyten mit breiteren N-RAP Signal an den ID und zytoplasmatischer Akkumulierung von N-RAP an den Z-Scheiben (vorzugsweise in der Peripherie der Myozyte und den Zellkern umgebend), als auch Myozyten mit kaum zytoplasmatischen N-RAP und schwächerem N-RAP Signal an den ID im selben Schnitt zu erkennen. Diese zellautonomen Anreicherungen an N-RAP waren auch bei den Kontrollen ausgebildet. Vergleichsweise befand sich bei ARVD im gesamten LV N-RAP hauptsächlich an den ID, wohingegen im RV im Großteil der

Kardiomyozyten N-RAP etwas stärker an den ID und im Zytoplasma an den Z-Scheiben angereichert vorlag.

Bei N-RAP handelt es sich um ein Multidomänen gerüstbildendes Protein, welches mit einer Vielzahl an Proteinen interagiert (Luo et al., 1999; Ehler et al., 2001; Lu et al., 2003;). Demnach können Störungen in der Homöostase der Interaktionen durch z.B. auftretende Mutationen der Bindungspartner, die zu einer geringeren Bindungsaffinität führen, zu einer kompensatorischen N-RAP Hochregulierung führen (Gehmlich et al., 2004). Einen potentiellen Bindungspartner stellt das MLP dar, ein Protein welches möglicherweise als ein nachgeschalteter Effektor fungiert, der das Signal als Antwort auf mechanischen Stress umwandelt (Ehler et al., 2001; Gehmlich et al., 2008). Nachdem bei MLP^{-/-} bereits eine Hochregulierung an N-RAP Proteinleveln festzustellen ist und in adulten TOT Mäusen (Sussmann, et al. 1998), welche eine Hochregulierung von N-RAP zeigten, MLP runterreguliert ist, könnte folglich ein Fehlen bzw. eine Herunterregulierung von MLP zu einem erhöhten Stress an den ID führen, was in Folge zu einer Hochregulierung von N-RAP führen könnte (Ehler, et al. 2001; Perriard et al, 2003).

Die Gesamtmenge an MLP Protein bei Patienten mit Herzversagen war signifikant hochreguliert, wobei N-RAP im LV von Patienten mit Herzversagen im Endstadium heterogene Proteinlevel aufwies.

Möglicherweise kommt es ebenso durch eine Hochregulierung des gesamten MLP (und gleichzeitiger Zunahme an oligomeren MLP im Nukleus), bei fortschreitendem Herzversagen, zur gleichzeitigen Herunterregulierung der anfänglichen Überexpression an N-RAP.

Die subzelluläre Verteilung des N-RAP Proteins wurde im humanen Ventrikelmyokard erstmals in dieser Arbeit beschrieben. N-RAP ist nicht nur an den ID sondern auch an den Z-Scheiben der Myozyten, bevorzugt in der Peripherie aber auch in Nähe zum Zellkern zu finden. Wohingegen die erstmals durch Luo et al., 2005 beschriebene subzelluläre Lokalisierung von N-RAP im adulten Herzen von Mäusen, lediglich auf die ID und bisher das Vorkommen vom zytoplasmatischen N-RAP an den Z-Scheiben auf die Embryonalentwicklung beschränkt schien.

Der polyklonale Kaninchen Antikörper gegen N-RAP wurde im Labor von Dr. Ehler hergestellt. Dabei handelt es sich um ein nicht affinitätsgereinigtes Serum. Der Antikörper neigt stark zur Hintergrundfärbung, hat ein schlechtes Signal zu Rauschen Verhältnis und benötigt daher besondere Einstellungen am konfokalen Mikroskop (ein höheres Offset). Am Western Blot sind zwar deutliche und starke N-RAP Banden bei ca. 190 kDa erkennbar jedoch neigt er auch zu schwachen unspezifischen Reaktionen. Demnach könnte N-RAP in den Kryoschnitten unspezifische Bindungen eingehen, die auch eine Erklärung für die äußerst heterogene Verteilung innerhalb der Kardiomyozyten innerhalb der Proben und zwischen den Proben bzw. für die Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der IF Kryoschnitte und den Immunoblots sein könnten.

4.6. Das Intermediärfilament Protein Desmin

Die in Kardiomyozyten stattfindenden zellautonomen Desmin Akkumulationen, durch welche das quergestreifte Desmin Muster gestört ist, sind mit einer stark unregelmäßigen Myozyten Gestalt assoziiert. Folglich scheint die Anreicherung von Desmin innerhalb der Myozyte eine sekundäre kompensatorische Antwort auf stattfindende adaptive und maladaptive Umbauprozesse der Kardiomyozyten darzustellen, welche wiederum primär durch ungünstige Volumen und Blutdruckverhältnisse verursacht werden. Diese Schlussfolgerung ist naheliegend nachdem Desmin die Hauptkomponente der Intermediärfilamente darstellt und für die Erhaltung der Struktur und Stabilisierung des Zytoskeletts verantwortlich ist.

Quantitative Analyse des gesamten Desmin Proteinlevel im LV Ventrikel von Patienten mit Herzversagen im Endstadium zeigen nur leicht bis hin zu gar nicht erhöhten Expressionsmengen im Vergleich zu den Kontrollen.

Die Desmin Expression variiert und steigt bei kardialer Hypertrophie und Herzversagen (Heling et al., 2000; Kostin et al., 2000). Bei Patienten mit Herzversagen im Endstadium nimmt die Desmin Expression im Vergleich zu den Kontrollen wieder ab (Di Somma et al., 2004).

4.7. Expression der humanen EH-Myomesin Isoform bei Kardiomyopathien

Je nach Typ der gestreiften Muskulatur existieren verschiedene Isoformen von Myomesin. Das EH-Myomesin stellt im embryonalen Herzen von Vertebraten die hauptsächliche Isoform dar und wird ungefähr ab dem Zeitpunkt der Geburt runterreguliert (Agarkova et al., 2000). Schönauer et al. (2011) haben bei zwei verschiedenen transgenen Mausmodellen für die DCM eine Hochregulierung des EH-Myomesins beschrieben. Die Zunahme an totalem EH-Myomesin korrelierte dabei mit der abnehmenden kardialen Auswurffraktion. Weiters wurde durch Schönauer et al. (2011) eine Hochregulierung des EH-Myomesin in humanen menschlichen Biopsien von DCM Patienten ohne Linksventrikuläres Unterstützungssystem (LVAD) beschrieben, nicht jedoch bei einer HCM. Daraus schlussfolgernd wurde EH-Myomesin als möglicher Marker für die DCM vorgeschlagen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch die stärkste Hochregulierung des EH-Myomesin bei einer Arythmogenen Rechtsventrikulären Dysplasie. Daraus lässt sich eigentlich eine Verwendung als Markerprotein für die DCM ausschließen.

5. Schlussfolgerung

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die subzellulären Veränderungen, die anhand von Mausmodellen für DCM postuliert wurden nur in den vererbaren Fällen von humaner DCM klar nachgewiesen werden konnten. Erschwerend für die Analyse sind natürlich die heterogene genetische Herkunft des menschlichen Materials, das weit variierende Alter, undefinierter Mutationsstatus von vererbaren Kardiomyopathien, sowie unterschiedliche Medikation. Trotzdem war auffallend, dass z.B. die

Kontrollen bei der biochemischen Analyse der Expression von Proteinen der Interkalierenden Scheiben eine relativ geringe Variabilität untereinander aufwiesen. Die am konfokalen Mikroskop durchgeführte Analyse der mit hochspezifischen Antikörpern immungefärbten Proben, kann jedoch Einblicke in auf subzellulärer Ebene stattfindende Veränderungen gewährleisten. Jene gehen weit über die Information, die durch histologische Standardfärbungen erhältlich ist hinaus und können für den beobachteten Phänotyp durchaus erklärend sein, wenn auch in dieser Arbeit kein universal gültiger DCM Marker identifiziert werden konnte.

5. Literatur

- Agarkova I., Auerbach D., Ehler E., Perriard J.C. (2000). A novel marker for vertebrate embryonic heart, the EH-myomesin isoform. *J Biol Chem*, 275(14): 10256-10264.
- Almaas V.M., Amlie J.P. (2010). Histopathological Changes and Clinical Implications in Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy. *European Cardiology*, 6(2): 88-90.
- Anand I.S., Florea V.G. (2001). Alterations in Ventricular Structure. Chapter 15: Role of Left Ventricular Remodeling. *Heart Failure: A Companion to Braunwald's Heart Disease (Second Edition)*, 232-253
- Angst B.D., Khan L.U., Severs N.J., Whitely K., Rothery S., Thompson R.P., Magee A.I., Gourdie R.G (1997). Dissociated spatial patterning of gap junctions and cell adhesion junctions during postnatal differentiation of ventricular myocardium. *Circ Res*, 80(1): 88-94.
- Arber S., Hunter, J.J.; Ross J. Jr., Hongo M., Sansig G., Borg, J., Perriard J.C., Chien K.R., Caroni P. (1997). MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell*, 88: 393-403.
- Asimaki A., Tandri H., Huang H., Halushka M.K., Gautam S., Basso C., Thiene G., Tsatsopoulou A., Protonotarios N., McKenna W.J., Calkins H., Saffitz J.E. (2009). A New Diagnostic Test for Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 360: 1075-84.
- Bach I. (2000). The LIM domain: regulation by association. *Mech Dev*, 91(1-2): 5-17. Review.
- Bitchell D.P. (2006). Chapter 36: Pulmonary Atresia with Intact Ventricular Septum. Part Four: Congenital Heart Defects. *Critical Heart Disease in Infants and Children. Second Edition*, p767-776.
- Boateng S.Y., Belin R.J., Geenen D.L., Margulies K.B., Martin J.L., Hoshijima M., de Tombe P.P., Russell B. (2007). Cardiac dysfunction and heart failure are associated with abnormalities in the subcellular distribution and amounts of oligomeric muscle LIM protein. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292(1): H259-69.
- Boateng S.Y., Senyo S.E., Qi L., Goldspink P.H., Russell B. (2009). Myocyte remodeling in response to hypertrophic stimuli requires nucleocytoplasmic shuttling of muscle LIM protein. *J Mol Cell Cardiol*, 47(4): 426-35
- Boulaksil M., Winckels S.K., Engelen M.A., Stein M., van Veen T.A., Jansen J.A., Linnenbank A.C., Bierhuizen M.F., Groenewegen W.A., van Oosterhout M.F., Kirkels J.H., de Jonge N., Varró A., Vos M.A., de Bakker J.M., van Rijen H.V. (2010). Heterogeneous Connexin43 distribution in heart failure is associated with dispersed conduction and enhanced susceptibility to ventricular arrhythmias. *Eur J Heart Fail*, 12(9):913-21.
- Brunk U.T., Terman A. (2002.) Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. Serial Review: Oxidative Stress and Aging. *Free Radical Biology & Medicine*, 33 (5): 611-619.
- Burkett E.L., Hershberger R.E. (2005). Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 2005 45(7): 969-81. Review.
- Buyandelger B., Ng K.-E., Miocic S., Piotrowska I., Gunkel S., Ku C.-S., Knöll R. (2011). MLP (muscle LIM protein) as a stress sensor in the Heart. *Eur J Physiol*, 462: 135-142.

- Capetanaki Y., Ngai J., Lazarides E. (1984). Charakterisation and regulation in the expression of a gene coding for the intermediate filament protein desmin. *Proc Natl Acad Sci*, 81: 6909-6913.
- Capetanaki Y., Milner D.J., Weitzer G. (1997). Desmin in muscle formation and maintenance: knockouts and consequences. *Cell Struct Funct*, 22(1): 103-116. Review.
- Carlsson L., Thornell L.E., (2001). Desmin-related myopathies in mice and man. *Acta Physiol Scand*, 171(3): 341-348.
- Clark K.A., McElhinny A.S., Beckerle M.C., Gregorio C.C. (2002). Striated Muscle Cytoarchitecture: An Intricate Web of Form and Function. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 18: 637-706.
- Craig R.W., Padrón R. (2004). Molecular Structure of the Sarcomere. In Engel A.C. & Franzini-Armstrong (eds), *Myology*, 3rd Edition, p160-161
- Crawford G., Horowitz R. (2011). Scaffolds and chaperones in myofibril assembly: putting the striations in striated muscle. *Biophysical Reviews*, 3: 25-32
- Dähmow S., Erdmann J., Knueppel T., Gille C., Frömmel C., Hummel M., Hetzer R., Regitz-Zagrosek V. (2002). Novel mutations in sarcomeric protein genes in dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 298: 116-20.
- Davies M.J. (2000). The Cardiomyopathies: an overview. *Heart*, 83(4): 469-474.
- Dawid I.B., Breen J.J., Toyama R. (1998). LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet*, 14(4): 156-62. Review.
- Di Somma S., Di Benedetto M.P., Salvatore G., Agozzino L., Ferranti F., Esposito S., La Dogana P., Scarano M.I., Caputo G., Cotrufo M., Santo L.D., de Divitiis O. (2004). Desmin-free cardiomyocytes and myocardial dysfunction in end stage heart failure. *Eur J Heart Fail*, 6(4): 389-98.
- Dupont E., Matsushita T., Kaba R.A., Voizzi C., Coppens S.R., Khan N., Kaprielian R., Yacoub M.H., Severs N.J. (2001). Altered connexin expression in human congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 33(2): 359-71.
- Dwyer J., Iskratsch T., Ehler E. (2012). Actin in striated muscle: recent insights into assembly and maintenance. *Biophysical Reviews*, 4(1): 17-25.
- Ehler E., Rothen B. M., Hämerle S.P., Komiyama M., Perriard J.-C. (1999). Myofibrillogenesis in the chicken heart: assembly of Z-disk, M-line and the thick filaments. *J Cell Sci*, 112: 1529-1539.
- Ehler E., Perriard J.C. (2000). Cardiomyocyte Cytoskeleton and Myofibrillogenesis in Healthy and Diseased Heart. *Heart Failure Reviews*, 5: 259-269.
- Ehler E., Horowitz R., Zuppinger C., Price R.L., Perriard E., Leu M., Caroni P., Sussman M., Eppenberger H.M., Perriard J.C. (2001). Alterations at the intercalated disk associated with the absence of muscle LIM protein. *J Cell Bio*, 153:763-772.
- Ehler E. (2010). Changes at the cellular level in the diseased heart and their implications on function. In "Shaping the heart in development and disease" (eds. A. T. Mikhailov and M. Torrado). Transworld Research Network, Kerala, India. ISBN 978-81-7895-444-8.
- Ervasti J.M. (2003). Costameres: the Achilles' heel of Herculean muscle. *J Biol Chem*, 278: 13591-13594

- Ervasti J.M. (2007). Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta*, 1772(2): 108-117. Review.
- Estigoy C.B., Pontén F., Odeberg J., Herbert B., Guilhaus M., Charleston M., Ho J., Cameron D., dos Remedios C. (2009). Intercalated discs: multiple proteins perform multiple functions in non-failing and failing human hearts. *Biophysical Reviews*, 1(1): 43-49. Review.
- Ferrans V.J., Roberts W.C. (1973). Intermyofibrillar and nuclear-myofibrillar connections in human and canine myocardium. An ultrastructural study. *J Mol Cell Cardiol*, 5: 247-257,
- Flick M.J., Konieczny S.F. (2000). The muscle regulatory and structural protein MLP is a cytoskeletal binding partner of beta1-spectrin. *J Cell Sci*, 113: 1553–1564.
- Frank D., Kuhn C. (2006). The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease. *J Mol Med*, 84: 446-468.
- Fürst D.O., Osborn M., Nave R., Weber K. (1988). The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *J Cell Biol*, 106(5): 1563-72.
- Gautel M. Fürst D.O., Cocco A. (1998). Schiaffino S. Isoform transitions of the myosin binding protein C family in developing human and mouse muscles: lack of isoform transcomplementation in cardiac muscle. *Circ Res*, 82(1): 124-9.
- Gautel M. (2011). The sarcomeric cytoskeleton: who picks up the strain?. *Rev Current Opinion in Cell Biology* 23: 39-46.
- Gehmlich K., Geier C., Osterziel K.J., van der Ven P.F., Fürst D.O. (2004). Decreased interactions of mutant muscle LIM protein (MLP) with N-RAP and alpha-actinin and their implication for hypertrophic cardiomyopathy. *Cell Tissue Res*, 317: 129–136.
- Gehmlich K., Geier C., Milting H., Fürst D., Ehler E. (2008). Back to square one: what do we know about the functions of Muscle LIM Protein in the heart? *J Muscle Res Cell Motil*, 29: 155-158.
- Geier C., Gehmlich K., Ehler E., Hassfeld S., Perrot A., Hayess K., Cardim N., Wenzel K., Erdmann B., Krackhardt F., Posch M.G., Bublak A., Nägele H., Scheffold T., Dietz R., Chien K.R., Spuler S., Fürst D.O., Nürnberg, P., Özcelik C. (2008). Beyond the Sarcomere: CSRP3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet*, 17: 2753-2765.
- Gerull B., Gramlich M., Atherton J., McNabb M., Trombitás K., Sasse-Klaassen S., Seidman J.G., Seidman C., Granzier H., Labeit S., Frenneaux M., Thierfelder L. (2002). Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy. *Nat Genet*, 30(2): 201-204.
- Grove B.K., Kurer V., Lehner C., Doetschman T.C., Perriard J.C., Eppenberger H.M. (1984). A new 185,000-dalton skeletal muscle protein detected by monoclonal antibodies. *J Cell Biol*, 98(2): 518-24.
- Goldfarb L. G., Vicart P., Goebel H.H., and Dalakas M.C. (2004). Desmin myopathy. *Brain*, 127(4): 723-734. Review
- Goyal V.K. (1981). Early appearance and rate of lipofuscin pigment accumulation in human myocardium. *Experimental Gerontology*, 16(3): 219-222.

- Gupta P., Bilinska Z.T., Sylvius N., Boudreau E.; Veinot J.P., Labib S., Bolongo P.M., Hamza A., Jackson T., Ploski R., Walski M., Grzybowski J., Walczak E., Religa G., Fidzianska A, Tesson F. (2010). Genetic and ultrastructural studies in dilated cardiomyopathy patients: a large deletion in the lamin A/C gene is associated with cardiomyocyte nuclear envelope disruption. *Basic Res Cardiol*, 105(3): 365-377.
- Haegel H., Larue L., Ohsugi M., Fedorov L., Herrenknecht K., Kemler R. (1995). Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development*. 121(11):3529-3537.
- Heineke J, Kempf T, Kraft T, Hilfiker A, Morawietz H, Scheubel RJ, Caroni P, Lohmann SM, Drexler H, Wollert KC. (2003). Downregulation of cytoskeletal muscle LIM protein by nitric oxide: impact on cardiac myocyte hypertrophy. *Circulation*. 107(10):1424-32.
- Heineke J., Ruetten H., Willenbockel C., Gross S.C., Naguib M., Schaefer A., Kempf T., Hilfiker-Kleiner D., Caroni P., Kraft T., Kaiser R.A., Molkentin J.D., Drexler H., Wollert K.C. (2005). Attenuation of cardiac remodeling after myocardial infarction by muscle LIM protein-calcineurin signaling at the sarcomeric Z-disc. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(5): 1655-60.
- Heling A., Zimmermann R., Kostin S., Maeno Y., Hein S., Devaux B., Bauer E., Klövekorn W.P., Schlepfer M., Schaper W., Schaper J. (2000). Increased expression of cytoskeletal, linkage, and extracellular proteins in failing human myocardium. *Circ Res*, 86(8): 846-53.
- Herman D.S., Lam L., Taylor M.R., Wang L., Teekakirikul P., Christodoulou D., Conner L., DePalma S.R., McDonough B., Sparks E., Teodorescu D.L., Cirino A.L., Banner N.R., Pennell D.J., Graw S., Merlo M., Di Lenarda A., Sinagra G., Bos J.M., Ackerman M.J., Mitchell R.N., Murry C.E., Lakdawala N.K., Ho C.Y., Barton P.J., Cook S.A., Mestroni L., Seidman J.G., Seidman C.E (2012). Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 366(7): 619-628.
- Herrera A.H., Elzey B., Law D.J., Horowitz R. (2000). Terminal regions of mouse nebulin: sequence analysis and complementary localization with N-RAP. *Cell Motil Cytoskeleton*, 45(3): 211-22.
- Hershberger R.E. (2005). Familial dilated cardiomyopathy. *Progress in Pediatric Cardiology*, 20(2): 161-168. Review.
- Hirschy A., Croquelois A., Perriard E., Schoenauer R., Agarkova I., Hoerstrup S.P., Taketo M.M., Pedrazzini T., Perriard J.C., Ehler E. (2010). Stabilised beta-catenin in postnatal ventricular myocardium leads to dilated cardiomyopathy and premature death. *Basic Res Cardiol*, 105(5): 597-608.
- Ho C.Y., Carlsen C., Thune J.J., Havndrup O., Bundgaard H., Farrohi F., Rivero J., Cirino A.L., Andersen P.S., Christiansen M., Maron B.J., Orav E.J., Køber L. (2009). Echocardiographic Strain Imaging to Assess Early and Late Consequences of Sarcomere Mutations in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*, 2(4): 314-321.
- Hoyt R.H., Cohen M.L., Saffitz J.E. (1989). Distribution and three-dimensional structure of intercellular junctions in canine myocardium. *Circ Res*, 64(3):563-574.
- Hughes S.E. (2006). Heart Muscle Disease. *Medicine*, 34(6): 207-209.
- James J., Robbins J. (2011). Signaling and Myosin-binding Protein C. Minireview. *J Biol Chem*, 286: 9913–9919.
- Jayne E. P. (1950). Cytochemical Studies of age pigments in the human heart. *J Gerontol*, 5(4): 319-325.

- Kanter H.L., Beyer E.C., Saffitz J.E. (1995). Structural and molecular determinants of intercellular coupling in cardiac myocytes. *Microsc Res Tech*, 31(5): 357-63. Review.
- Karl T.R., Kirshbom P.M. (2006). Chapter 33: Transposition of the Great Arteries and the Arterial Switch Operation. Part Four: Congenital Heart Defects. *Critical Heart Disease in Infants and Children*. Second Edition, p715-729.
- Katz A.M. (2000). Cytoskeletal abnormalities in the failing heart: out on a LIM? *Circulation*, 101: 2672–2673.
- Keck E.W., Brode P., Bruns H.A., Marcsek Z., Passarge E. (1977). *Pädiatrische Kardiologie. Herzkrankheiten im Säuglings- und Kindesalter*. 2. Auflage
- Knöll R., Hoshijima M., Hoffman H.M., Person V., Lorenzen-Schmidt I., Bang M.L., Hayashi T., Shiga N., Yasukawa H., Schaper W., McKenna W., Yokoyama M., Schork N.J., Omens J.H., McCulloch A.D., Kimura A., Gregorio C.C., Poller W., Schaper J., Schultheiss H.P., Chien K.R. (2002). The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell*, 111(7): 943-955.
- Konno T., Shimizu M., Ino H., Matsuyama T., Yamaguchi M., Terai H., Hayashi K., Mabuchi T., Kiyama M., Sakata K., Hayashi T., Inoue M., Kaneda T., Mabuchi H. (2003). A novel missense mutation in the myosin binding protein-C gene is responsible for hypertrophic cardiomyopathy with left ventricular dysfunction and dilation in elderly patients. *J Am Coll Cardiol*, 41: 781-786.
- Kong Y., Flick M.J., Kudla A.J., Konieczny S.F. (1997). Muscle LIM protein promotes myogenesis by enhancing the activity of MyoD. *Mol Cell Biol*, 17: 4750–4760
- Kostin S., Heling A., Hein S., Scholz D., Klövekorn W.-P., Schaper J. (1998). The Protein Composition of the Normal and Diseased Cardiac Myocyte. *Heart Failure Reviews*. 2(4): 245-260.
- Kostin S., Hein S., Arnon E., Scholz D., Schaper J. (2000). The cytoskeleton and related proteins in the human failing heart. *Heart Fail Rev*, 2000 5(3):271-80.
- Kostin S., Rieger M., Dammer S., Hein S., Richter M., Klövekorn W.P., Bauer E.P., Schaper J. (2003). Gap junction remodeling and altered connexin43 expression in the failing human heart. *Mol Cell Biochem*, 242(1-2): 135-44.
- Lange S., Xiang F., Yakovenko A., Vihola A., Hackman P., Rostkova E., Kristensen J., Brandmeier B., Franzen G., Hedberg B., Gunnarsson L.G., Hughes S.M., Marchand S., Sejersen T., Richard I., Edström L., Ehler E., Udd B., Gautel M. (2005). The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science*, 308(5728): 1599-603.
- Lange S., Ehler E., Gautel M. (2006). From A to Z and back? Multicompartment proteins in the sarcomere. *Rev Trends in Cell Biology*, 16: 11-18. Review.
- Li Z., Colucci-Guyon E., Pincon-Raymond M., Mericiskay M., Pournin S., Paulin D., Babinet C. (1996). Cardiovascular lesions and skeletal myopathy in mice lacking desmin. *Dev Biol*, 175: 362-366.
- Li D., Tapscoft T., Gonzales O., Burch P.E., Quiñones, Zoghbi W.A., Hill R., Bachinski L.L., Mann D.L., Roberts R. (1999). Desmin Mutations responsible for Idiopathic dilated Cardiomyopathy. *Circ*, 100: 461-464

- Lok J.M., Spevak P.J., Nichols D.G. (2006). Chapter 39: Tricuspid Atresia. Part Four: Congenital Heart Defects. *Critical Heart Disease in Infants and Children*. Second Edition, p799-822.
- Louis H.A., Pino J.D., Schmeichel K.L., Pomies P., Beckerle M.C. (1997). Comparison of three members of the cysteine-rich protein family reveals functional conservation and divergent patterns of gene expression. *J Biol Chem*, 272: 27484–27491.
- Luke R.A., Saffitz J.E. (1991). Remodeling of ventricular conduction pathways in healed canine infarct border zones. *J Clin Invest*, 87(5):1594-1602.
- Luo G., Zhang J.Q., Nguyen T.-P., Herrera A.H., Paterson B., Horowitz R. (1997). Complete cDNA Sequence and Tissue Localization of N-RAP, a Novel Nebulin-Related Protein of Striated Muscle. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 38: 75–90.
- Luo G., Herrera A.H., Horowitz R. (1999). Molecular Interactions of N-RAP, a Nebulin-Related Protein of Striated Muscle Myotendon Junctions and Intercalated Disks. *Biochemistry*, 38: 6135-6143.
- Lu S., Carroll S.L., Herrera A.H., Ozanne B., Horowitz R. (2003). New N-RAP-binding partners alpha-actinin, filamin and Krp1 detected by yeast two-hybrid screening: implications for myofibril assembly. *J Cell Sci*, 116(11): 2169-78.
- Marian A.J., Roberts R. (2001). The Molecular Genetic Basis for Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33(4): 655–670.
- Marino B.S., Wernovsky G., Greeley W.J. (2006). Chapter 38: Single-Ventricle Lesions. Part Four: Congenital Heart Defects. *Critical Heart Disease in Infants and Children*. Second Edition, p 789-797.
- Maron B.J., Towbin J. A., Thiene G., Antzelevitch C., Corrado D., Arnett D., Moss A.J., Seidman C.E., Young J.B. (2006). Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies: An American Heart Association Scientific Statement From the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*, 113:1807-1816
- Martin A.F. (1981). Turnover of cardiac troponin subunits. Kinetic evidence for a precursor pool of troponin-I. *The Journal of biological chemistry*, 256(2): 964-968
- Messerli J.M., Eppenberger-Eberhardt M.E., Rutishauser B.M., Schwarb P., von Arx P., Koch-Schneidemann S., Eppenberger H.M., Perriard J.C. (1993). Remodelling of cardiomyocyte cytoarchitecture visualized by three-dimensional (3D) confocal microscopy. *Histochemistry*, 100(3): 193-202.
- Milner D.J., Weitzer G., Tran D., Bradley A., Capetanaki Y., (1996). Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. *J Cell Biol*, 134: 1255-1270.
- Milner D.J., Taffet G.E., Wang X., Pham T., Tamura T., Hartley C., Gerdes A.M., Capetanaki Y. (1999). The Absence of Desmin leads to Cardiomyocyte Hypertrophy and Cardiac Dilation with Compromised Systolic Function. *J Mol Cell Cardiol*, 31: 2063-2076.
- Munnell J.F., Getty R. (1968). Rate of accumulation of cardiac lipofuscin in the aging canine. *J Gerontol*, 23(2): 154–158.

- O'Connor W.N., Stahr B.J., Cottrill C.M., Todd E.P., Noonan J.A. (1988). Ventriculocoronary Connections in Hypoplastic Right Heart Syndrome: Autopsy Serial Sections Study of Six Cases. *J Am Coll Cardiol*, 11: 1061-72.
- Obermann W.M., Gautel M., Steiner F., van der Ven P.F., Weber K., Fürst D.O. (1996.) The structure of the sarcomeric M band: localization of defined domains of myomesin, M-protein, and the 250-kD carboxy-terminal region of titin by immunoelectron microscopy. *J Cell Biol*, 134(6): 1441-53.
- Otey C. A., Carpen O. (2004). Alpha-actinin revisited. A fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton*, 58: 104-111.
- Olivetti G., Cigola E., Maestri R., Corradi D., Lagrasta C., Gambert S.R., Anversa P. (1996) Aging, Cardiac Hypertrophy and Ischemic Cardiomyopathy Do Not Affect the Proportion of Mononucleated and Multinucleated Myocytes in the Human Heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 28(7): 1463–1477.
- Perhonen M., Sharp W.W., Russell B. (1998). Microtubules are needed for dispersal of alpha-myosin heavy chain mRNA in rat neonatal cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 30(9): 1713-22.
- Perriard J.C., Hirschy A., Ehler E. (2003). Dilated cardiomyopathy: a disease of the intercalated disc?. *Trends Cardiovasc*, 13(1): 30-8. Review.
- Perrot A., Hussein S., Ruppert V., Schmidt H.H., Wehnert M.S., Duong N.T., Posch M.G., Panek A., Dietz R., Kindermann I., Bohm M., Michalewska-Wludarczyk A., Richter A., Maisch B., Pankuweit S., Ozcelik C. (2009). Identification of mutational hot spots in LMNA encoding lamin A/C in patients with familial dilated cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol*, 104: 90–99
- Peters N.S., Severs N.J., Rothery S.M., Lincoln C., Yacoub M.H., Green C.R. (1994). Spatiotemporal relation between gap junctions and fascia adherens junctions during postnatal development of human ventricular myocardium. *Circulation*, 90(2): 713-25.
- Peters N.S., Green C.R., Poole-Wilson P.A., Severs N.J. (1993). Reduced content of connexin43 gap junctions in ventricular myocardium from hypertrophied and ischemic human hearts. *Circulation*, 88(3): 864-75.
- Price M.G. (1987). Skelemins: cytoskeletal proteins located at the periphery of M-discs in mammalian striated muscle. *J Cell Biol*, 104(5): 1325-1336.
- Ratti J., Rostkova E., Gautel M., Pfuhl M. (2011). Structure and interactions of myosin-binding protein C domain C0: cardiac-specific regulation of myosin at its neck?. *J Biol Chem*, 286(14): 12650-8.
- Richard P., Charron P., Carrier L., Ledeuil C., Cheav T., Pichereau C., Benaiche A., Isnard R., Dubourg O., Burban M., Gueffet J.-P., Millaire A., Desnos M., Schwartz K., Hainque B., Komajda M. (2003). Hypertrophic Cardiomyopathy: Distribution of Disease Genes, Spectrum of Mutations, and Implications for a Molecular Diagnosis Strategy. *Circulation*, 107: 2227-2232.
- Richardson P., Mckenna W., Bristow M., Maisch B., Mautner B., O'connell J., Olsen E., Thiene G., Goodwin J., Gyarfás I., Martin I., Nordet P. (1996). Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation*, 93: 841-842.

- Schneider A.G., Sultan K.R., Pette D. (1999). Muscle LIM protein: expressed in slow muscle and induced in fast muscle by enhanced contractile activity. *Am J Physiol*, 276(4 Pt 1): C900-6.
- Schnell S.A., Staines W.A., Wessendorf M.W. (1999). Reduction of Lipofuscin-like Autofluorescence in Fluorescently Labeled Tissue. *J Histochemistry & Cytochemistry*, 47(6): 719–730.
- Schoenauer R., Emmert M.Y., Felley A., Ehler E., Brokopp C., Weber B., Nemir M., Faggian G.G., Pedrazzini T.; Falk V., Hoerstrup S.P., Agarkova I. (2011). EH-myomesin splice isoform is a novel marker for dilated cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol*, 106(2): 233-47.
- Seidman J.G., Seidman C. (2001). The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell*, 104(4): 557-67.
- Sen-Chowdhry S., Syrris P., McKenna W.J. (2007). Role of Genetic Analysis in the Management of Patients With Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 50:1813–21.
- Sepp R., Severs N.J., Gourdie R.G. (1996). Altered patterns of cardiac intercellular junction distribution in hypertrophic cardiomyopathy. *Heart*, 76(5):412-7.
- Severs N.J. (1989). Gap junction shape and orientation at the cardiac intercalated disk. *Circ Res*, 65(5):1458-1462.
- Severs N.J., Coppens S.R., Dupont E., Yeh H.I., Ko Y.S., Matsushita T. (2004). Gap junction alterations in human cardiac disease. *Cardiovasc Res*, 62(2): 368-377. Review.
- Severs N.J., Bruce A.F., Dupont E., Rothery S. (2008). Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc Res*, 80(1): 9-19. Review.
- Smith J.H., Green C.R., Peters N.S., Rothery S., Severs N.J. (1991). Altered patterns of gap junction distribution in ischemic heart disease. An immunohistochemical study of human myocardium using laser scanning confocal microscopy. *Am J Pathol*, 139(4): 801-21.
- Strehler B. L., Mark D. D., Mildvan A. S., Gee M. V. (1959). Rate of magnitude of age pigment accumulation in the human myocardium. *J Gerontol*, 14(4): 430–439.
- Sussman M.A., Welch S., Cambon N., Klevitsky R., Hewett T.E., Price R., Witt S.A., Kimball T.R. (1998). Myofibril degeneration caused by tropomodulin overexpression leads to dilated cardiomyopathy in juvenile mice. *J Clin Invest*, 101(1): 51-61.
- Terman A., Brunk U.T. (1998). Lipofuscin: mechanisms of formation and increase with age. *APMIS*. 106(2): 265-76. Review.
- Thornell L.-E., Eriksson A., Johansson B., Kjörrell U., Franke WW., Virtanen I., Lehto V.-P. (1985). Intermediate Filament and associated proteins in heart Purkinje fibers: A membrane-myofibril anchored cytoskeletal system. *Ann N Y Acad Sci*, 455: 213-40.
- Thornell L.-E., Carlsson L., Li Z., Mericskay M., Paulin D. (1997). Null Mutation in Desmin Gene gives Rise to a Cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*, 29: 2107-2124.
- Towbin J.A., Jeffries J.L. (2011). Heart Failure as a consequence of genetic Cardiomyopathy. Chapter 27. Heart Failure: A Companion to Braunwald's Heart Disease. Second Edition.
- Towbin J.A., Bowles N. E. (2002). Heart Failure. *Nature*, 415: 227-233.

- Tskhovrebova L., Trinick J. (2003). Titin: properties and family relationships. *Nature Reviews Molecular cell Biology*, 4: 679-689.
- Udd B., Vihola A., Sarparanta J., Richard I., Hackman P. (2005). Titinopathies and extension of the M-line mutation phenotype beyond distal myopathy and LGMD2J. *Neurology*, 64(4): 636-42.
- Ulissova T.N. (1957). Age changes in Lipofuscin Content of human Heart Muscle. *Biull Eksp Biol Med*, 43(5): 118-21.
- Van Der Bel-Kahn J. (1977). Muscle fiber disarray in common heart diseases. *Am J of Cardiology*, 40(3): 355-364.
- Van der Ven P.F.M., Bartsch J.W., Gautel M., Jockusch H., Fürst D.O. (2000). A functional knock-out of titin results in defective myofibril assembly. *J cell Sci*, 113: 1405-1414.
- Varnava A.M., Elliott P.M., Mahon N., Davies M.J., McKenna W.J. (2001). Relation between myocyte disarray and outcome in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, 88(3): 275-279.
- Varnava A.M., Elliott P.M., Sharma S., McKenna W.J., Davies M.J. (2000). Hypertrophic cardiomyopathy: the interrelation of disarray, fibrosis, and small vessel disease. *Heart*, 84(5): 476-482.
- Vincent R.N., Dooley K.J. (2007). Chapter 85, Myocarditis and Cardiomyopathy. p558-566; *Comprehensive Pediatric Hospital Medicine*, First Edition.
- Weldon C.S., Hartmann A.F., Clark R.E., Ferguson T.B. (1970). Surgical Management of the Hypoplastic Right Heart Syndrome. *J Ann Thorac Surg*, 10: 489-502.
- Wilding J.R., Lygate C.A., Davies K.E., Neubauer S., Clarke K. (2006). MLP accumulation and remodelling in the infarcted rat heart. *Eur J Heart Fail*, 8(4): 343-6.
- Yamaguchi O., Taneike M., Otsu K. (2012). Cooperation between proteolytic systems in cardiomyocyte recycling. *Cardiovasc Res*, 96(1): 46-52. Review.
- Yamamoto S., James T.N., Sawada K., Okabe M., Kawamura K. (1996). Generation of new intercellular junctions between cardiocytes. A possible mechanism compensating for mechanical overload in the hypertrophied human adult myocardium. *Circ Res*, 78(3): 362-70.
- Yin D. (1996). Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Rad Biol Med*, 21(6): 871-888.
- Zhang J.Q., Elzey B., Williams G., Lu S., Law D.J., Horowitz R. (2001). Ultrastructural and biochemical localization of N-RAP at the interface between myofibrils and intercalated disks in the mouse heart. *Biochemistry*, 40(49):14898-906.
- Zolk O., Caroni P., Bohm M. (2000). Decreased expression of the cardiac LIM domain protein MLP in chronic human heart failure. *Circulation*, 101: 2674-2677

Zusammenfassung

Die Herzfunktion wird durch präzise regulierte Interaktionen zwischen Proteinen des Muskelzytoskeletts und den essentiellen kontraktilen Proteinen gewährleistet. Kardiomyopathien führen zu fortschreitendem Herzversagen und stellen die häufigste Erkrankung dar, die eine Herztransplantation notwendig macht. Mittlerweile ist bekannt, dass durch Mutationen verursachte Störungen dieser präzise regulierten Protein-Protein Interaktionen des Muskelzytoskeletts zu einer veränderten Proteinzusammensetzung führen, was in Folge zur Entwicklung von Kardiomyopathien beiträgt.

Ziel dieser Diplomarbeit war es die subzelluläre Organisation verschiedener Proteine der Kardiomyozyten, die durch Studien an Tiermodellen als mögliche frühe Marker für Kardiomyopathien vorgeschlagen worden waren, in versagenden menschlichen Herzen im Vergleich zu Kontrollproben zu charakterisieren. Dazu wurden spezifische Antikörper gegen diese Proteine zur Immunfluoreszenzfärbung von Kryo- und Paraffinschnitten mit darauffolgender Analyse durch konfokale Mikroskopie verwendet. Gleichzeitig wurde auch die Morphologie der Proben auf subzellulärer Ebene untersucht. Die Ergebnisse der konfokalen Mikroskopie bestimmten die weitere Richtung der Analyse mit Immunoblots.

Die Resultate deuten darauf hin, dass die Veränderungen in der Komposition und Struktur der Interkalierten Scheiben, die bei der MLP (muscle LIM protein) Knockoutmaus (einem Mausmodell für die dilatative Kardiomyopathie, DCM) zu sehen waren, nur in einigen vererbaren DCM Proben nachgewiesen werden können. Sowohl lichtmikroskopisch als auch an den Immunoblots war dabei eine Hochregulierung des N-RAP (nebulin-related anchoring protein) und des Adherens Junctions Proteins β -Catenin sowie eine Herunterregulierung des Gap Junction Proteins Connexin-43 zu erkennen. In den meisten anderen Proben mit DCM im Endstadium zeigte sich jedoch ein heterogenes Bild. Für die vergleichende Analyse sind dabei natürlich die heterogene genetische Herkunft, das weit variierende Alter, sowie eine unterschiedliche Medikation erschwerend. Trotzdem war auffallend, dass die Kontrollen bei der Analyse der Expression von Proteinen der Interkalierten Scheiben eine relativ geringe Variabilität untereinander aufwiesen.

Die erneute Expression des humanen EH-(embryonales Herz)-Myomesin, welches als Marker für eine DCM vorgeschlagen wurde, konnte in den meisten versagenden humanen Herzproben nachgewiesen werden. Nachdem das Protein am stärksten bei einer Arrhythmogenen Rechtsventrikulären Dysplasie hochreguliert war erscheint es allerdings als spezifischer Marker für DCM ungeeignet.

In dieser Arbeit wurde auch erstmals die subzelluläre Verteilung des N-RAP, eines aktinbindenden Proteins der Interkalierten Scheibe, im humanen Ventrikelmyokard beschrieben. Das N-RAP war, entgegen der bisher an Mäusen beschriebenen Lokalisierung, im humanen Ventrikelmyokard nicht nur an den Interkalierten Scheiben sondern auch unterschiedlich stark an den Z-Scheiben der Myozyten, bevorzugt in der Peripherie aber auch in der Nähe des Zellkerns zu finden.

Nachdem die präzise Funktion von MLP und auch dessen Rolle in Herzerkrankungen bei Tiermodellen und Mensch ungeklärt ist, wurden Immunoblot Analysen der Proteinnengen von MLP in Proben von Patienten mit Herzversagen im Endstadium durchgeführt. Die Expressionslevel von MLP im LV der Patienten mit Herzversagen im Endstadium mit einer durchschnittlichen linksventrikulären Auswurffraktion (LVEf) von 15% waren gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Daraus lässt sich ableiten, dass eine Hochregulierung nicht ausschließlich auf eine Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) zutrifft, sondern dass ein Anstieg der Expression mit verminderter LVEf korreliert ist.

Auch wenn in dieser Arbeit kein universal gültiger Marker für eine DCM gefunden werden konnte, kann die Immunfluoreszenzfärbung mit hochspezifischen Antikörpern Einblicke in die auf subzellulärer Ebene stattfindenden Veränderungen gewährleisten. Jene gehen weit über die Information der histologischen Standardfärbungen hinaus und können für den beobachteten Phänotyp durchaus erklärend sein.

Abstract

The functional integrity of the heart is maintained by precise interactions between proteins of the muscle cytoskeleton and essential contractile proteins. Cardiomyopathies lead to progressive heart failure and are the most common reason for heart transplantations. Today it is well known that mutations can cause disturbances between these precisely regulated protein-protein interactions, which lead to a modified composition of the muscle cytoskeleton and results in the development of cardiomyopathies.

The goal of this diploma thesis was to analyze in failing human hearts the subcellular organization of different proteins of cardiomyocytes, which had previously been shown to be altered in animal models of cardiomyopathies and had been suggested as potential early markers. Samples from human patients with different cardiomyopathies were compared with healthy human heart tissue. Specific antibodies against different cytoskeletal proteins were used for immunofluorescence labeling of paraffin- and cryosections, which were then analyzed using confocal microscopy. Additionally the morphology of the samples was investigated at the subcellular level. The results of these investigations determined the further direction of immunoblot analysis.

The results indicate that the altered composition and structure of the intercalated discs that had been described in the MLP (muscle LIM protein) knockout-mouse (a mouse model for dilated cardiomyopathy, DCM), could only be demonstrated in a few inheritable DCM samples. There, light microscopy and immunoblot analysis revealed an upregulation of N-RAP (nebulin-related anchoring protein) and of the adherens junction protein β -catenin, as well as a downregulation of the gap junction protein connexin-43. However, most other DCM samples showed a more heterogeneous picture. The comparative analysis was made more complicated by the heterogeneous genetic origin, varying ages, as well as different medication of the patients. Nevertheless it is interesting, that the protein expression levels of the intercalated discs in healthy control samples showed relatively low variation.

The renewed expression of human EH-(embryonic heart)-myomesin, which had been suggested as a marker for DCM, could be demonstrated in most of the human failing heart samples. However, since the protein showed the highest upregulation in the case of arrhythmogenic right ventricular dysplasia, it cannot be used as a specific marker for DCM.

This diploma thesis also characterized for the first time the subcellular distribution of N-RAP, an actin-associated protein from the intercalated disc in the human ventricular myocardium. N-RAP could be found not only at the intercalated disc, but also, with varying amounts, in the Z-discs of the myocytes, mainly in the periphery as well as close to the nucleus. This localization is different to N-RAP's localization in mouse hearts.

Since the exact function of MLP as well as its role in heart disease is still unknown, immunoblot analyses of MLP levels were conducted in samples from patients with heart failure in final stages. The MLP expression levels were significantly higher in the left ventricle of patients with an average left ventricular ejection fraction (LVEf) of 15% in comparison to controls. This suggests that an

upregulation of MLP does not only occur in hypertrophic cardiomyopathy (HCM), but also indicates a correlation with decreased LVEf.

Even though this diploma thesis did not yield a universal marker for DCM, immunofluorescence labeling with highly specific antibodies can give insights into alterations at a subcellular level. This technique goes far beyond the information level of standard histological stains and can provide useful data for the explanation of the examined phenotype.

Lebenslauf

Name: Luiza Stankiewicz
Geburtsjahr/-ort: 1982/ Waldenburg, Polen
Staatsangehörigkeit: Österreich (seit 1999)
Familienstand: ledig, Lebensgemeinschaft, Lebensgefährtin: Mag. Clemens Hanserl, 1 gemeinsamer Sohn: Niklas Vincent Hanserl

Ausbildung / Weiterbildung:

2002 - 2013 Biologiestudium an der Universität Wien
Studienzweig Zoologie
Diplomarbeitsthema: „Das Zytoskelett des menschlichen Ventrikelmyokards und dessen Veränderungen aufgrund von Herzversagen.“

2010 Geburt von Niklas Vincent Hanserl

Februar 1996 - 2002 Bundesgymnasium und Bundesrealgymnasium, Zirkusgasse (Wien), Reifeprüfung im Juni 2002

1993 - Februar 1996 Öffentliche Hauptschule, Konstanziagasse (Wien)

1991 - 1996 Öffentliche Volksschule, Herbststraße (Wien)

1989 - 1991 Grundschule, Waldenburg (Polen)

1988/89 Vorschule, Waldenburg (Polen)

Berufserfahrung:

Juli-August 2008 Sommerpraktikum am King's College London, UK
Abteilung: The Randall Division of Cell and Molecular Biophysics, bei Dr. Elisabeth Ehler

2008 Tutorin des Kurses: „Morphologisches Spezialpraktikum - Vergleichende Embryologie“