

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Calcineurin bei humaner Herzhypertrophie

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Susanne Hack

aus Würzburg

Würzburg, August 2005

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Johann Bauersachs

Korreferent: Prof. Dr. med. Wolfram Voelker

Dekan: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.06

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinen lieben Eltern in tiefer Verbundenheit
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Methoden.....	6
2.1.1. Material.....	6
2.1.2. Bezugsquellen und verwendete Reagenzien.....	8
2.1.3. Probenaufbereitung.....	10
2.1.4. Bestimmung der Calcineurin-Proteinkonzentration.....	11
2.1.5. Bestimmung der Calcineurin-Aktivität.....	14
2.1.6. Bestimmung der Calcineurin-mRNA-Expression.....	17
2.1.7. 5`Prime Race.....	18
2.1.8. NF-ATc Phosphorylierungsgrad.....	24
3. Ergebnisse.....	25
3.1.1. Calcineurin-Proteinkonzentration.....	25
3.1.2. Calcineurin-Aktivität.....	30
3.1.3. Calcineurin mRNA-Expression.....	32
3.1.4. Splicevarianten von NF-ATc4.....	33
3.1.5. NF-ATc Phosphorylierungsstufen.....	34
4. Diskussion.....	35
5. Zusammenfassung.....	40
6. Nachtrag.....	42
7. Literaturverzeichnis.....	43
8. Anhang.....	47
9. Abkürzungsverzeichnis.....	49

1. Einleitung

Das Herz ist ein dynamisches Organ, welches seine Größe und Architektur der Arbeitsbelastung anpassen kann (Wilkins et al. 2002). Sowohl physiologische als auch pathophysiologische Reize sind für die Entwicklung der Herzhypertrophie verantwortlich. Sie ist definiert als eine Zunahme der Herzgröße in Folge einer Volumenzunahme der Kardiomyozyten, nicht aber ihrer Zellzahl (Frey et al. 2003, Olson et al. 1999).

Während die Herzhypertrophie zu Beginn eine hämodynamische Mehrbelastung kompensieren und zeitweise sogar die Ejektionsfraktion erhöhen kann, stellt eine anhaltende Herzhypertrophie einen prognostisch ungünstigen Faktor für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz und des plötzlichen Herztodes beim Menschen dar (Molkentin, 2000, Lim et al., 1999, Sussman et al., 2002).

Während die klinischen Gründe und Mechanismen der Entstehung einer Herzhypertrophie seit längerem bekannt sind, bemühte man sich in den letzten Jahren verstärkt um die Klärung der molekularen Vorgänge, die der Hypertrophieentwicklung zugrunde liegen. In weiten Teilen der Literatur werden intrazelluläre Signalwege beschrieben, die über eine Stimulation zu einer veränderten Genexpression und damit zur Entstehung der Herzhypertrophie führen (Wilkins et al., 2002, Yunzeng et al., 2001).

Verschiedene Signalkaskaden können zur veränderten Genexpression führen. Unter anderem können Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs), Proteinkinase C (PKC) und G-Proteine diese Signalkaskade aktivieren (Mc Kinsey et al., 1999). Eine wichtige Rolle als Signaltransduktionsfaktoren spielen intrazelluläre Proteinphosphatasen, die die Antwort auf eine vermehrte Arbeitsbelastung vermitteln, und dadurch das Wachstum in einem weiten Bereich von Zelltypen regulieren (Molkentin, 2000). Besonderes Augenmerk wurde in den letzten Jahren auf die Proteinphosphatase 2B (PP2B), auch Calcineurin genannt, gelegt. Bei Calcineurin handelt es sich um eine Serin/Threonin-spezifische Phosphatase, die durch erhöhte intrazelluläre Kalziumspiegel aktiviert wird (Schulz et al., 2003). Bei Säugern wurden drei verschiedene Calcineurin A-Gene beschrieben (α, β, γ), die in 81% der kata-

lytischen Untereinheiten identisch sind (Molkentin, 2000). Während CnA α und CnA β ubiquitär im Körper, und damit auch in Kardiomyozyten vorkommen, konnte CnA γ dort nicht identifiziert werden (Molkentin, 2000).

Das Enzym Calcineurin setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen, dem 59kDa schweren Calcineurin A (CnA) und dem 19kDa schweren Kalzium bindenden Protein, Calcineurin B (CnB), welches eng an Calcineurin A gebunden ist.

Calcineurin A besteht aus einer katalytischen (N-terminales Ende) und regulatorischen (C-terminales Ende) Untereinheit (Bueno et al., 2002, Ritter et al., 2002). Die regulatorische Domäne beinhaltet die Calcineurin B-bindende Untereinheit, die Calmodulin bindende Untereinheit und eine autoinhibitorische Domäne am C-Terminus (Klee et al., 1998, Tsao et al., 2000). Hervorzuheben ist, dass die katalytische Untereinheit resistent gegenüber Proteolyse ist (Hubbard et al., 1989), die regulatorische Domäne, die am C-Terminus die autoinhibitorische Domäne beinhaltet jedoch nicht (Crabtree, 1999, Yang et al., 2000). Der Mechanismus des Calcineurin- Signalweges wurde erstmals an T-Zellen beschrieben (Crabtree, 1999).

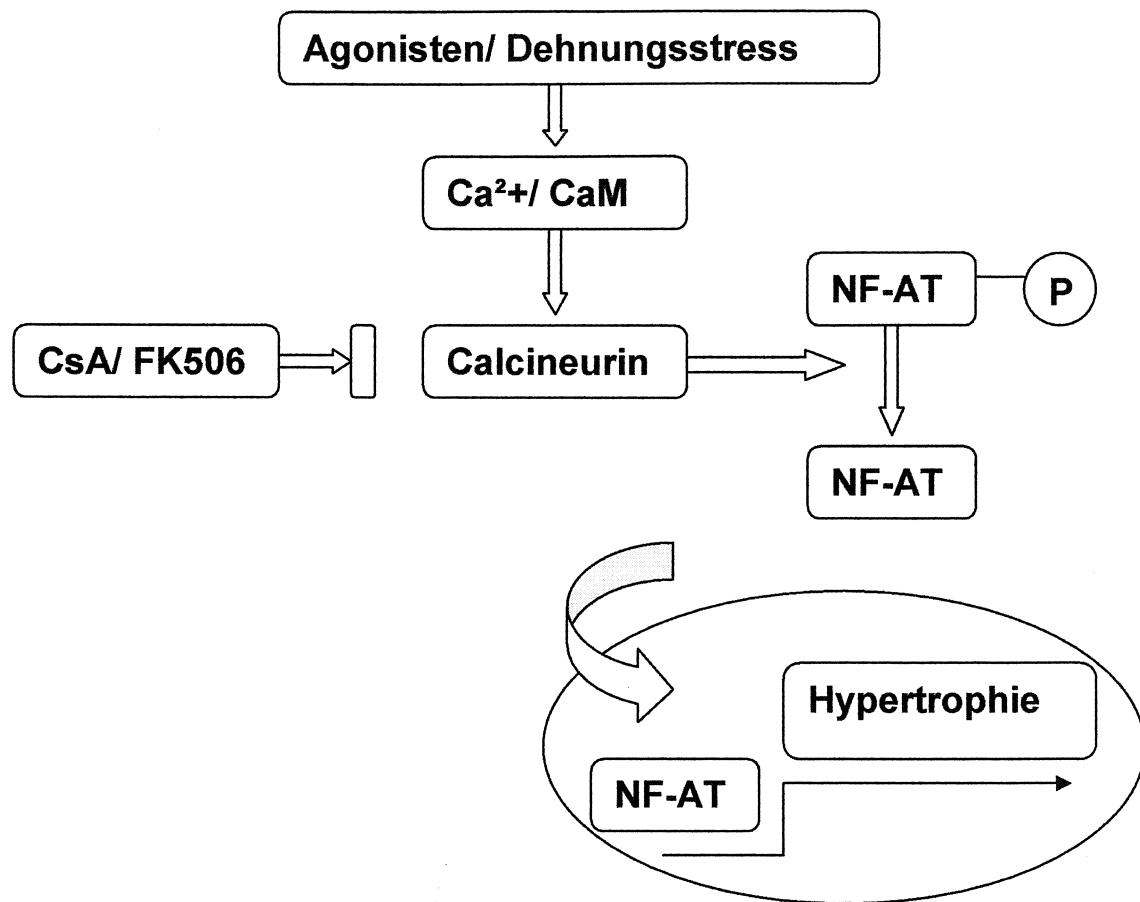


Abbildung 1) Calcineurin Signalkaskade

Verschiedene Signale an der Zelloberfläche, wie z.B. Dehnungsstress führen zu einem intrazellulären Anstieg der Kalziumkonzentration, wodurch die Phosphatase Calcineurin aktiviert wird. Calcineurin dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor NF-ATc4, der daraufhin in den Zellkern transloziert. Nach Bindung an die Promotorregion wird die Expression hypertrophierelevanter Gene induziert. Die Immunsuppressiva CsA und FK506 hemmen Calcineurin und können somit den Ablauf der Signalkaskade stoppen.

Bei erhöhten Kalziumkonzentrationen ermöglicht die Bindung des Kalziums an Calcineurin B die Bindung von Calmodulin an Calcineurin A, wodurch es zu einer Konformationsänderung der autoinhibitorischen Domäne und dadurch zu einer Aktivierung des Enzyms Calcineurin kommt (Sadoshima et al., 1997). Calcineurin dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor NF-ATc (Nuclear factor of activated T-cells), der seinerseits im dephosphorylierten Zustand in den Zellkern transloziert wird (Izumo et al., 1998, Clipstone et al., 1992).

Nach Bindung an die Promotorregion wird die Expression hypertrophie-relevanter Gene (z.B. β -MHC) induziert.

Dieser Signalweg kann durch das Medikament Cyclosporin A (CsA), welches die Aktivierung von Calcineurin hemmt, blockiert werden.

Bei den zuvor bereits erwähnten Nuclear factors of activated T-cells (NF-ATc) handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die erstmals in der T-Zelle beschrieben wurden (Chow et al., 1999, Durand et al., 1998). Inzwischen wurde nachgewiesen, dass NF-ATc ebenfalls Einfluss auf die Phänotypen verschiedener Zellen außerhalb des Immunsystems, wie z.B. skeletale Muskelzellen hat (Gonzales Bosc et al., 2004, Delling et al., 2000, Horsley et al., 2001). Es gibt fünf NF-ATc Isoformen (NF-AT 1-5), die in verschiedenen Gewebetypen zu finden sind.

Der durch Kalzium und Calmodulin aktivierten Calcineurin/NF-ATc Signalkaskade wird eine besondere Stellung in der multifaktoriellen Entwicklung der Hypertrophie zugeschrieben. Molkentin et al. zeigten 1998, dass die Überexpression der konstitutiv aktiven katalytischen Untereinheit von Calcineurin bei der Maus zur Ausbildung einer massiven Hypertrophie führte, die schließlich in einer Herzinsuffizienz und Tod mündete. Ebenso konnte Molkentin (2000) nachweisen, dass elektrophysiologische Veränderungen im hypertrophierten Herzen durch das Calcineurin hemmende Medikament Cyclosporin A positiv zu beeinflussen waren. In transgenen Tiermodellen konnte also eindeutig nachgewiesen werden, dass die Hypertrophieentwicklung mit der Aktivität des Enzyms Calcineurin in engem Zusammenhang steht.

Über die Expression und das Aktivierungsmuster von Calcineurin bei humaner Herzhypertrophie ist weitaus weniger bekannt. Einige Daten zeigten erhöhte Calcineurinkonzentrationen bei Patienten, bei denen bereits eine Herzinsuffizienz eingetreten ist. Im Gegensatz dazu werden in dieser Arbeit Gewebeproben zweier Patientengruppen untersucht, die zum einen aufgrund einer hypertrophen obstruktiven Kardiomyopathie, zum anderen aufgrund einer hochgradigen Aortenstenose, eine Herzhypertrophie vorweisen. Beide Patientengruppen befinden sich im kompensierten Stadium der Herzinsuffizienz, mit erhaltener systolischer Funktion. Um einen Zusammenhang zwischen der Calcineurin-Signalkaskade und der humanen Herzhypertrophie nachzuweisen, wurden sowohl die Calcineurinproteinkonzentration als auch die

spezifische Enzymaktivität der Phosphatase Calcineurin gemessen. Anhand einer speziellen Polymerase-Kettenreaktion versuchten wir weiter festzustellen, ob bei verschiedenen Patientengruppen im Vergleich zum Normalherzen Splicevarianten von NF-ATc zu erkennen sind.

2. Methoden

2.1.1. Material

Geräte:

Ikamag Ret

Heizrührplatte

Eppendorf

ThermoStat plus

Biometra

Power Pack P25

Uno-Thermoblock

Hanna Instruments

Magnetic Stirrer HI 300N

Heidolph Instruments

Duomax 1030

Shimadzu

UV-visible recording spectrometer, UV 160

Heraeus

Biofuge pico

IKA Labortechnik

Eurostar digital

Kern&Sohn

Waage, Typ 510-63 300/2000 9

Liebherr

Kühlschrank, Liebherr Comfort +4C

Gefrierschrank, Liebherr Comfort -25C

National Lab

Profi Star -80C

Hybaid

Mini Oven

Braun Biotech International

Certomat H

Perkin Elmer

DNA Thermal Cycler

Biorad

Mini-Transilluminator

Hofer

Gelkammer, HE 33

Daewoo

Microwave, Kor-6305 BL

Sigma

Zentifuge, 2K 15

2.1.2. Bezugsquellen und verwendete Reagenzien

Amersham Pharmacia Biotech

Gene Ruler 1kb DNA Ladder

Donkey-anti-rabbit Ig, Batch 184131

ECL, Western blotting detection reagents

Hybond-ECL-Membran, Nitrocellulose-Membran

BioRad

Laemmli Sample Buffer

Merck-Schuchardt

2-Mercaptoethanol

Trishydroxymethyl-aminomethan

Glycin

Dinatriumhydrogenphosphat

Natriumdihydrogenphosphat

Natriumchlorid

Salzsäure

Biomol

Anti-Calcineurin A, rabbit polyclonal, Lot #901405

Lysis Buffer, Lot #2010

Reagenzien aus QuantiZyme Assay system, AK-816

Santa Cruz, Biotechnology

Anti-PP2-B1 (C-17), Lot #E127

Anti-PP2-Aa (C-20), Lot #D238

Anti-PP2-Ab (C-20), Lot #J027

Anti-NFATc1, Lot #1249

Anti-NFATc2, Lot #190

Anti-NFATc3, Lot #B201

Anti-NFATc4, Lot #A280

Anti-Actin (I-19), Lot #G097

Donkey-anti-goat, IgG HRP, Lot #E101

Anti-goat, Igg HRP, Lot #J049

Sigma

Trichloressigsäure

Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate (Tween 20)

Lauryl Sulfate

Bromophenolblau

Ponceaurot

Serva Electrophoresis

Glycerol

J.T.Baker

Methanol

Töpfer

Magermilchpulver Instant

Retina

x-ray Filme

Clontech

Reagenzien aus Marathon-Ready cDNA, Protocol #PT1156-1

Reagenzien aus Advantage PCR Cloning Kit, Katalog #K1901-1

Reagenzien aus Advantage cDNA PCR Kit, Katalog #K1905-1,-y

Reagenzien aus Advantage cDNA Polymerase Mix, Katalog #8417-1

Macherey-Nagel

Reagenzien aus Nucleobond AX METHODEN

Puffer N5: 100 mM Tris/H₃PO₄, 15% Ethanol, 1000 mM KCL, pH 8.5

Puffer R1: 100 mM Tris/Azetat, 15% Ethanol, 400 mM KCL, pH 6.3

Puffer R2: 100 mM Tris/Azetat, 15% Ethanol, 900 mM KCL, pH 6.3

Puffer R3: 100 mM Tris/Azetat, 15% Ethanol, 1150 mM KCL, pH 6.3

Puffer R4: 100 mM Tris/Azetat, 15% Ethanol, 1150 mM KCL, 6 M Urea, pH 6.3

2.1.3. Probenaufbereitung

Es wurde humanes Herzgewebe zweier Patientengruppen untersucht. Es handelte sich um 19 Patienten mit hypertropher obstruktiver Kardiomyopathie und 13 Patienten mit einer hochgradigen Aortenstenose. Alle Patienten befanden sich, zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme, in der kompensierten Phase der Herzhypertrophie ohne systolische Dysfunktion. Die Gewebeproben der Patienten mit hypertropher obstruktiver Kardiomyopathie wurden bei einer transaortalen subvalvulären Myektomie entnommen (Schulte et al., 1993), die der Aortenstenosepatienten bei Klappenersatzoperationen.

Als Vergleichsgruppe diente Herzgewebe von sechs gesunden Menschen, deren Herz nach einem Unfalltod nicht transplantiert werden konnte.

Die Proben für den Western Blot und für den Calcineurin-Assay wurden wie folgt aufbereitet:

Von den bei -80°C gelagerten Proben wurde unter ständiger Kühlung mit -70°C kaltem flüssigen Stickstoff, ein stecknadelkopfgroßes Stückchen abgeteilt.

Nachdem jeder Probe $100\mu\text{l}$ Lyse-Puffer zugegeben wurden, wurden die Gewebeprobe homogenisiert. Anschließend wurden die Proben bei $14000\text{U}/\text{Min.}$ für die Dauer von fünf Minuten zentrifugiert. Die bindegewebigen Anteile der Proben, die kaum noch Protein enthielten, setzten sich als Pellet ab. Der proteinreiche Überstand, der für die Versuche verwendet wird, wurde abpipettiert.

Zusammensetzung des Lyse-Puffers:

50mM Tris, pH 7,5

0,1 mM EDTA

0,1 mM EGTA

1mM DTT

0,2% NP-40

pro 10ml Lyse-Puffer: 1 Tablette Protease-Inhibitor-Cocktail

Die Proteinkonzentration der Proben wurde per Photometrie bestimmt.

2.1.4. Bestimmung der Calcineurin-Proteinexpression

Der Western Blot diente zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Calcineurin.

Den Proben wurde im Verhältnis 1:1 Sample-Puffer hinzugegeben. Um eine optimale Laufgeschwindigkeit zu erreichen, wurden die Füllmengen jeder Tasche per Zugabe von Elektrophorese-Puffer einander angeglichen. Die Proben kochten für die Dauer von fünf Minuten bei 95°C. Anschließend wurden die Proteinproben auf ein 10%iges Acrylamidgel aufgetragen. Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer, die mit Elektrophorese-Puffer gefüllt ist, eingespannt. Die Anode und Kathode der Gelkammer befanden sich beide am Deckel. Es wurde eine Spannung von 70 Volt angelegt, wodurch die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt wurden.

Anschließend wurde das Gel, eine ECL-Membran und in Transfer-Puffer getränkte Filterpapiere in „Sandwichbauweise“ übereinandergeschichtet und zwischen Anode und Kathode gelegt. In der Gelkammer befand sich ein Transferpuffer. Durch Gel und Membran flossen für einen Zeitraum von 18 Stunden 100mA Strom, wodurch die Proteine vom Gel auf die Membran transferiert wurden. Danach wurde die Membran 1 Stunde lang in Blockierlösung eingelegt. Anschließend wurden die Membranen der ersten Serie mit dem ersten Antikörper PP2-A α (St.Cruz) und die eines weiteren Durchgangs mit dem ersten Antikörper PP2-A β (St.Cruz) in einer Konzentration von 1:1000 inkubiert. Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurden die Membranen 30 Minuten lang mit PBS/T gewaschen. Bei allen Membranen wurde nun als zweiter Antikörper Anti-Ziege (St.Cruz) in einer Konzentration von 1:5000 verwendet. Nach erneutem Waschen der Membranen, wurden sie anschließend mit ECL, welches eine chemische Lumineszenzreaktion hervorruft, detektiert. Nach Belichtungszeiten zwischen 1 und 20 Minuten, konnten die Banden auf den Röntgenfilmen bewertet werden.

Stammlösungen:

10%iges Acrylamidgel :	1,9ml Aqua dest. 1,7ml Acrylamid 1,5M Tris (pH 8,8) 0,05ml 10% SDS 0,05ml Ammoniumpersulfat 0,002ml Temed
5xElektrophoresepuffer:	15g Tris-Base (pH 8,3) 72g Glycin 5g SDS 800 ml Aqua dest.
Transferpuffer:	200ml 5xElektrophoresepuffer 200ml Methanol 600ml Aqua dest.
3xSample-Puffer:	4ml Aqua dest. 3ml 0,5M Tris, pH 6,8 2,4ml Glycerin 4,8ml 10% SDS 1,2ml 2-b-Mercaptoethanol 0,6ml Bromophenolblau 0,05%
5xPBS:	41,17g Dinatriumhydrogen-phosphat 11,73g Natriumdihydrogen-phosphat 20,0g Natriumchlorid 1000ml Aqua dest.

Blockierlösung: 10ml 10xPBS
 70ml Aqua dest.
 5g Milchpulver
 100µl Tween 20
 auf 100ml mit Aqua dest. auffüllen

PBS/T: 200ml 5xPBS
 500µl Polyoxyethylensorbitan Monolaurate
 800ml Aqua dest.

2.1.5. Bestimmung der Calcineurin-Aktivität

Da es sich bei dem Enzym Calcineurin um eine Phosphatase handelt, ließ sich die Aktivität indirekt über die Menge des freiwerdenden Phosphats messen.

Im Experiment wurde den Gewebeproben ein Phosphopeptid hinzugegeben, welches spezifisch von Calcineurin gespalten wird. Die Versuche wurden unter sättigenden Konzentrationen von Kalzium und Calmodulin durchgeführt. Das aktivierte Calcineurin spaltet Phosphat vom Phosphopeptid ab. Das freigewordene Phosphat wurde mit Malachitgrün angefärbt und konnte dadurch mittels einer Absorptionsmessung bestimmt werden.

Um möglichst präzise nur das von Calcineurin abgespaltene Phosphat zu ermitteln, wurde erst eine Positivkontrolle unter Anwesenheit von Kalzium gemessen. So konnte man die gesamte Aktivität der Phosphatasen erfassen. Anschließend wurde durch Zugabe des Kalzium blockierenden EGTA-Puffers die Aktivität von Calcineurin ausgeschaltet. Dies bedeutet, man misst die Aktivität aller anderen Phosphatasen. Um nun die reine Calcineurin-Aktivität (CaN) zu erhalten verwendet man folgende erste Gleichung:

$$1) \text{ CaN} = \text{Total} - \text{EGTA}$$

In einem weiteren Ansatz wurden durch Okadainsäure (OA) die Phosphatasen PP1 und PP2A, nicht aber Calcineurin gehemmt. Im folgenden ergibt sich die reine Calcineurin-Aktivität durch Messung der Calcineurin-Aktivität unter Anwesenheit von Okadainsäure (OA) abzüglich der Summe der Aktivitäten aller Restphosphatasen (OA+EGTA). Die zweite Gleichung lautet:

$$2) \text{ CaN} = \text{OA} - (\text{OA} + \text{EGTA}).$$

Die Aktivität der Phosphatasen wurde mittels folgender Versuchsanordnung gemessen: Wie bereits beschrieben wurden die Gewebeproben mit Lyse-Puffer inklusive eines Protease-Inhibitors aufbereitet. Anschließend wurden sie zentrifugiert und mit dem Überstand gearbeitet.

Um unverfälschte Ergebnisse zu erhalten, mussten die Proben nun von freiem Phosphat gereinigt werden. Hierfür wurde der Überstand in eine gereinigte Tropfsäule gegeben und bei 800 x g für 3 Minuten zentrifugiert.

Bevor die Proben auf die Mikrotiterplatte aufgetragen wurden, wurde an Hand einer Verdünnungsreihe aus Phosphat und destilliertem Wasser auf der Mikrotiterplatte die Standardkurve angelegt.

Im nächsten Schritt wurden die verschiedenen Vergleichswerte nach folgendem Schema auf die Mikrotiterplatte pipettiert.

Sample	Standardkurve	Proben
Well #	1,2	4,5
A	2nmol Phosphat	Hintergrund
B	1	Total
C	0,5	EGTA-Puffer
D	0,25	Okadainsäure
E	0,125	Okadainsäure+EGTA
F	0,063	Positivkontrolle
G	0,031	
H	0	

Diesen Reagenzien, deren Zusammensetzung aus nachfolgender Tabelle zu ersehen ist, wurden nun das Substrat Phosphopeptid RII und unsere Gewebeproben hinzugegeben.

	Aqua dest.	2xAssay Puffer mit Calmodulin	2xEGTA Puffer	Okadainsäure	Substrat (0,75mM)	Probe
Hintergrund	20µl	25µl	0	0	0	5µl
Total	10µl	25µl	0	0	10µl	5µl
EGTA Puffer	10µl	0	25µl	0	10µl	5µl
Okadainsäure	5µl	25µl	0	5µl	10µl	5µl
Okadainsäure+EGTA	5µl	0	25µl	5µl	10µl	5µl
Positivkontrolle	10µl	25µl	0	0	10µl	5µl

Während die Platte für die Dauer von 30 Minuten bei 30°C inkubiert wurde, wurde das Phosphoprotein RII von dem Enzym Calcineurin dephosphoryliert. Anschließend wurde die Reaktion, auf der Basis von Malachitgrün durch das Biomol-Green-Reagenz unterbrochen.

Nach 30 Minuten wurden die Ergebnisse per Absorptionsmessung ausgewertet.

2.1.6. Bestimmung der Calcineurin-mRNA-Expression

Die reverse Transkriptions-PCR wurde durchgeführt, um die mRNA-Spiegel von Calcineurin zu bestimmen.

Hierzu wurde mit Hilfe des Trizol-Reagenz (Life Technologies) aus Gewebeproben von sechs Patienten je Gruppe mRNA isoliert.

Anschließend wurde sowohl die mRNA des normalen, als auch des hypertrophierten Herzens, anhand der semiquantitativen 1-step reversen Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (Qiagen) analysiert. Die Oligonukleotidsequenzen für Calcineurin lauteten, entsprechend der veröffentlichten Sequenzen (Gene Bank Accession No.XM 011860) CTATCCAGCAGTGTGTA und CTGAGGCACAGCAAGTTGC.

2.1.7. 5`Prime Race

In einer der bereits beschriebenen Aktivierungskaskaden, die unter anderem zur Entstehung der Herzhypertrophie beitragen, spielt der Transkriptionsfaktor NF-ATc4 eine entscheidende Rolle. Nach Dephosphorylierung durch das aktivierte Calcineurin transloziert NF-ATc4 in den Zellkern und induziert dort die Expression hypertrophierelevanter Gene. Bei dem bisher beschriebenen Transkriptionsfaktor NF-ATc4 handelt es sich um die aus T-Zellen bekannte Isoform. In folgendem Versuch sollte untersucht werden, ob im humanen Herzgewebe eine andere Isoform von NF-ATc4 vorliegt, als die aus T-Zellen bereits bekannte.

Wir isolierten aus Normalherzproben mRNA und versuchten durch von der Maus bekannten Sequenzen einen Primer herzustellen, der es ermöglicht, die Sequenz zu lesen. Da nur ein Primer bekannt war, versuchten wir mit den folgenden Methoden, die vollständige NF-ATc4 Sequenz herauszufinden.

Bei einem 5`Prime Race handelt es sich um eine besondere Form einer PCR, bei der im Vorfeld an beide Enden der cDNA bekannte Adaptor-Primer ligiert werden. Somit wird es möglich, ohne Kenntnis der Primersequenz, das Gen zu vervielfältigen. Eine zusätzliche Voraussetzung für das Gelingen des Race ist, dass mindestens 23-28 Nukleotide des Gens bekannt sind. Aus diesen bekannten Nukleotiden wird ein genspezifischer Primer (GSP) hergestellt. Vor diesem Hintergrund eignet sich diese Methode besonders, um Gene zu amplifizieren, von denen bisher nur Teilsequenzen bekannt sind (Sikela et al., 1993). Wir arbeiteten mit einem Kit (Marathon Ready cDNA) der Firma Clontech. Die eingesetzte humane cDNA war bereits wie folgt von der Firma Clontech vorbereitet. Aus RNA wurde per reverser Transkriptase die Einzelstrang-DNA gelesen. Nach Zugabe von T4 DNA-Polymerase, RNase H, DNA pol I und DNA-Ligase wurde die Doppelstrang-DNA synthetisiert. Nun wurde sowohl an das 5`Ende, als auch das 3`Ende der cDNA ein Adapter (AP1) ligiert.

Mit dieser präparierten cDNA führten wir einen 5`Prime Race durch. Das Prinzip des 5`Prime und 3`Prime Race beruht darauf, dass man der PCR-Reaktion sowohl den AP1, als auch zwei GSP (GSP1 und GSP2) hinzufügt.

Die GSPs wurden aus der von der Maus bekannten NF-ATc4 Sequenzen hergestellt. Die ligierte cDNA enthält keine Bindungsstelle für AP1. Im ersten Zyklus des 5`Prime Race bindet nun der GSP1 an die cDNA und liest sie bis zum Ende des ligierten Adapters. Dadurch wurde eine Bindungsstelle für AP1 hergestellt. In den folgenden Zyklen können nun sowohl AP1, als auch die GSPs binden und in beide Richtungen lesen. Dies ermöglicht eine exponentielle Vervielfältigung der cDNA: Das gleiche Prinzip wird beim parallel laufenden 3`Prime-Race angewendet. Da wir die GSP so gewählt haben, dass jeweils ein Teilstück des 5`Race-Produkts, als auch ein Teilstück des 3`Race-Produkts überlappen, können wir dieses Überlappungsgebiet zur Herstellung des Gesamtproduktes nutzen. Die sich überschneidende Region wurde an beiden Genprodukten reseziert und diese anschließend ligiert. Somit erhielten wir die volle Länge der gewünschten cDNA.

Die für 5`Prime Race nötigen Substanzen wurden nach folgendem Schema pipettiert:

	Experimental sample	G3PDH Pos. Ktrl.	AP1 only Neg. Ktrl.	GSP1 only Neg. Ktrl.
Marathon-Ready cDNA	5µl	5µl	5µl	5µl
AP1 Primer(10µM)(hier:RACE revII)	1µl	1µl	1µl	---
GSP1(antisense primer;10µM)	1µl	---	---	1µl
GSP2(sense primer;10µM)	---	---	---	---
Kontrol 5`-Race G3PDH primer(10µM)	---	1µl	---	---
Aqua dest.	---	---	1µl	1µl
Master Mix	43µl	43µl	43µl	43µl

Der verwendete Master Mix war folgendermaßen zusammengesetzt:

36µl Aqua dest.

5µl 10X cDNA PCR Reaction Buffer

1µl dNTP mix (10mM)

1µl Advantage 2 Polymerase Mix (50X)

43µl Gesamtvolumen

Die PCR, die 35 Zyklen mit Temperaturunterschieden zwischen 68° und 94°C durchlief, wurde gestartet. Währenddessen wurden durch eine zugegebene Taq-Polymerase, einzelne Desoxyriboadenosine an die 3`Enden der amplifizierten cDNA geheftet. Dadurch wurde es ermöglicht die vervielfachten Genprodukte, nach Ligation zu einem Gesamtprodukt, in den pT-Adv-Vector zu

ligieren. Nachdem die 5`- und 3`-Race-Produkte an ihrer überlappenden Region reseziert wurden, konnten sie zu einer vollständigen cDNA ligiert werden.

Bevor man diese cDNA sequenziert, wird sie kloniert. Dies geschieht mit Hilfe eines Vektors. Vor Ligation der gewonnenen Gesamtlängen-DNA in den pT-Adv-Vektor, wurde zur Kontrolle ein 1%-Agarose-Gel mit den PCR- Proben beladen, um sicher zu gehen, dass die PCR erfolgreich war. Das erwartete Genfragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten und per Gelelution wieder frei gewaschen. Anschließend wurde die DNA-Konzentration per Photometrie bestimmt.

Das PCR-Produkt wurde nun in den pT-Adv-Vektor ligiert. Die einzusetzende DNA-Menge wurde nach der Formel: $x \text{ ng PCR-Produkt gleich } (y \text{ bp PCR-Produkt}) (50 \text{ ng pT-Adv}) / (\text{Größe des pt-Adv: ca. } 3,900\text{bp})$ berechnet.

Nach Berechnen der Formel, ergab sich folgender Ligationsansatz:

6µl PCR-Produkt
1µl 10xLigationspuffer
2µl pt-Adv-Vektor (25ng/µl)
1µl T4 DNA-Ligase
10µl Gesamtvolumen

Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert.

Als Vorarbeit zur Transformation wurden auf Agarplatten, die Ampicillin enthielten, jeweils 10µl IPTG und 100µl X-Gal ausplattiert. Um den Ligationsansatz in 10`F superkompetente E.coli Bakterien zu transformieren, wurden 60µl der Bakterien und 2µl 2-Mercaptoethanol mit dem Ligationsansatz vermischt und 30 Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend wurde dieser Ansatz bei 42°C für 30 Sekunden durch Hitze geschockt. Nach zwei minütigem erneuten Abkühlen auf Eis, wurde den transformierten Bakterien als Nährmedium 600µl LB-Medium zugegeben.

Der Ansatz wurde eine Stunde lang bei 37°C inkubiert und anschließend je 50µl und 500µl auf zwei vorbereiteten Agarplatten ausplattiert.

Die Platten wurden für die Dauer von 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach gelungener Transformation waren auf den Platten weiße und blaue Bakterienkolonien gewachsen. Bei den blauen Bakterien hat keine Transformation stattgefunden, denn ihr Genbereich, der für die Verstoffwechslung von X-Gal verantwortlich ist, wurde nicht vom pT-Adv-Vektor ersetzt. Sie verstoffwechseln IPTG und werden blau.

Die weißen Bakterien sind diejenigen, bei denen der Genbereich, der für diesen Stoffwechselfvorgang verantwortlich ist, durch den Vektor ersetzt wurde.

Die weißen Bakterien wurden isoliert, mit jeweils 5ml LB-Medium vermischt und wiederum über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Plasmide der gewachsenen Klone wurden nach Anleitung per Nucleo Spin Plasmid isoliert und anschließend in zwei Stufen verdaut.

Zur Kontrolle wurden die Klone erneut auf ein 1%-Agarosegel aufgetragen. Nach der Gelelektion wurde die DNA-Konzentration per Photometrie gemessen und die Klone anschließend zur Sequenzierung eingeschickt.

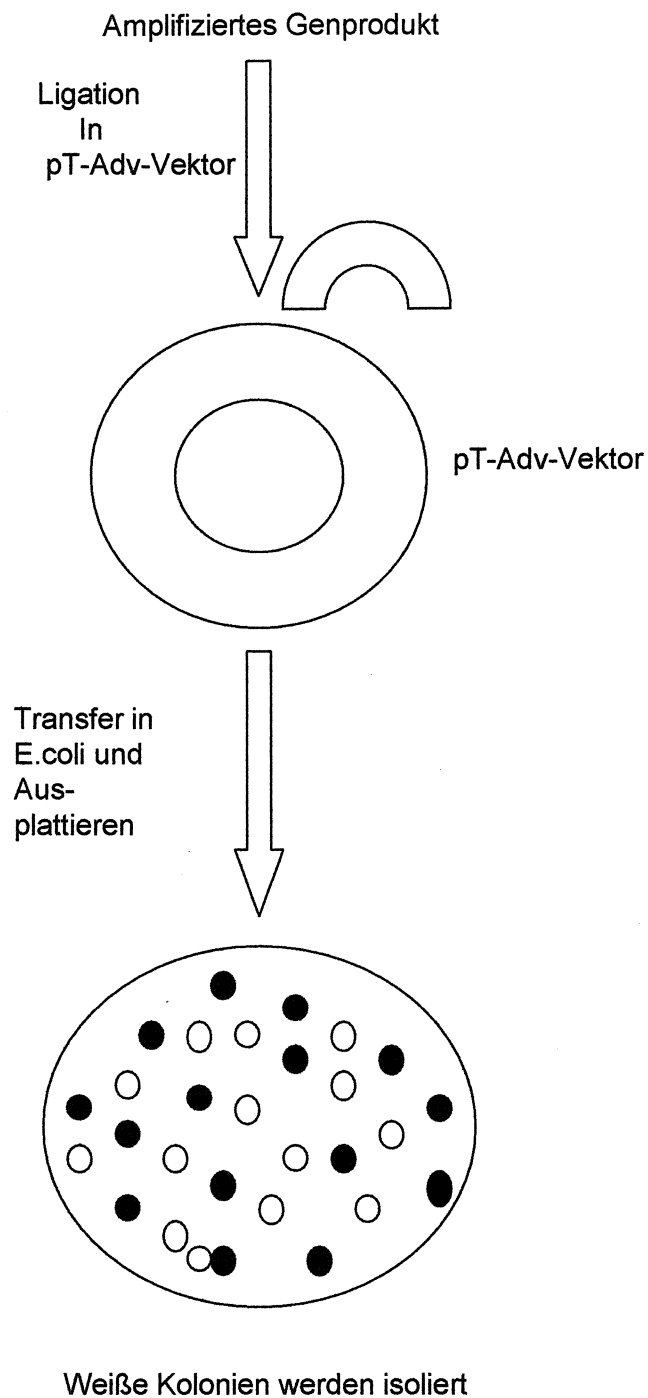


Abbildung 2) Schema des PCR advantage cloning sets

Das angewandte Verfahren besteht aus drei Hauptschritten. Im ersten wurde das amplifizierte Genprodukt in einen Vektor ligiert. Dieser wurde in Top 10F kompetente E.coli Bakterien transformiert. Die Bakterien wurden auf einem LB-Medium, welchem Ampicillin, X-Gal und IPTG zugesetzt waren, ausplattiert. Im letzten Schritt wurden die Bakterien, bei denen die Transformation gelungen ist, isoliert und weiter aufbereitet.

2.1.8. NF-ATc- Phosphorylierungsgrad

Die Migrationsfähigkeit von NF-ATc ist im dephosphorylierten Zustand höher, als im phosphorylierten Zustand. Aus diesem Grund wurden die Proteine der beiden Patientengruppen in einem 6%-SDS-Gel ihrer Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde mit monoklonalen Antikörpern gegen NF-ATc1 detektiert. Als Vergleichsgruppe dienten ebenfalls Gewebeproben von sechs Normalherzen.

3. Ergebnisse

3.1.1. Calcineurin-Proteinexpression

Die Western Blot-Analysen wurden durchgeführt, um die Proteinkonzentrationen von Calcineurin in den verschiedenen Patientengruppen zu messen. Es handelte sich hierbei um Patienten, die sich alle noch im Stadium der kompensierten Herzinsuffizienz befanden. 13 Patienten litten unter einer Aortenstenose. Während eines operativen Aortenklappenersatzes wurden die Proben entnommen. Weitere 19 Patienten waren an einer hypertrophen obstruktiven Kardiomyopathie erkrankt, die den Ausflusstrakt des linken Ventrikels einengte. Aus diesem Grund wurde ein Teil des hypertrophierten Gewebes entnommen und ebenfalls hier als Probe eingesetzt.

Klinische Daten zu den Patienten:

Patient	Proteinkonzentration in µg	IVS in mm	EF	LVEDP in mmHg
Aortenstenosen:				
1	1736	20	79	12
2	3708	20	Nicht angegeben	32
3	6229	14	Nicht angegeben	24
4	7436	24	70	12
5	9686	17	57	35
6	10205	16	70	20
7	11413	24	Nicht angegeben	18
8	13602	18	75	42
9	14607	15	73	19
10	14675	13	76	12
11	14684	18	Nicht angegeben	36
12	15318	23	59	31
13	16469	22	72	26
Normalherzen:				
14	7671	Nicht angegeben	Nicht angegeben	Nicht angegeben
15	15823	Nicht angegeben	Nicht angegeben	Nicht angegeben
16	18307	Nicht angegeben	Nicht angegeben	Nicht angegeben
17	19678	Nicht angegeben	Nicht angegeben	Nicht angegeben
Patient	Proteinkonzentration	IVS in mm	EF	LVEDP in mmHg

	in µg			
HOCM:				
18	2775	22	87	20
19	3085	24	53	22
20	3158	16	80	20
21	3406	18	nicht angegeben	29
22	3762	17	81	17
23	4097	20	80	24
24	4271	17	62	35
25	4574	15	83	19
26	5155	20	75	25
27	6219	23	82	23
28	7562	24	75	19
29	9970	24	80	12
30	11066	24	81	24
31	11396	22	79	26
32	11541	28	79	18
33	12723	14	74	32
34	13310	20	58	12
35	14796	31	77	42
36	16546	15	86	12

IVS: intraventrikuläres Septum

EF: Ejektionsfraktion

LVEDP: linksventrikulärer enddiastolischer Druck

Unter Gebrauch eines Antikörpers, der speziell auf das N-terminale Ende (katalytische Domäne des Calcineurins) zugeschnitten ist, zeigten sich, im Vergleich zu den Normalherzen, auf bis zu 178+/- 38% (Bereich 113%-278%; $P < 0.01$) erhöhte CnA-Proteinkonzentrationen bei den HOCM-Patienten.

Bei den Aortenstenosen war die Proteinkonzentration auf 151+/-27% (Bereich 111% bis 223%; $P < 0.05$) erhöht (Abbildung 4a).

Im Gegensatz dazu zeigten sich bei Einsatz eines Antikörpers gegen das C-terminale Ende (autoinhibitorische Domäne des Calcineurin) bei beiden Patientengruppen, im Vergleich zum Normalherzen erniedrigte Proteinkonzentrationen. Die Gruppe der Aortenstenosen zeigte bis auf 60+/-8% (Bereich 47%-69%; $P < 0.01$) erniedrigte CnA α -Proteinspiegel.

CnA β war ebenfalls auf 68 \pm 10% (Bereich 43%-86%; P<0.019) reduziert. Als Vergleichswert diente immer das Normalherz, für das eine Proteinkonzentration von 100% angenommen wurde. Bei den HOCM-Patienten war CnA α auf 53 \pm 7% (Bereich 17% to 63%;P<0.01) und CnA β auf 50 \pm 11% (Bereich 22% to 59%; P<0.01) erniedrigt (Abbildung 4b).

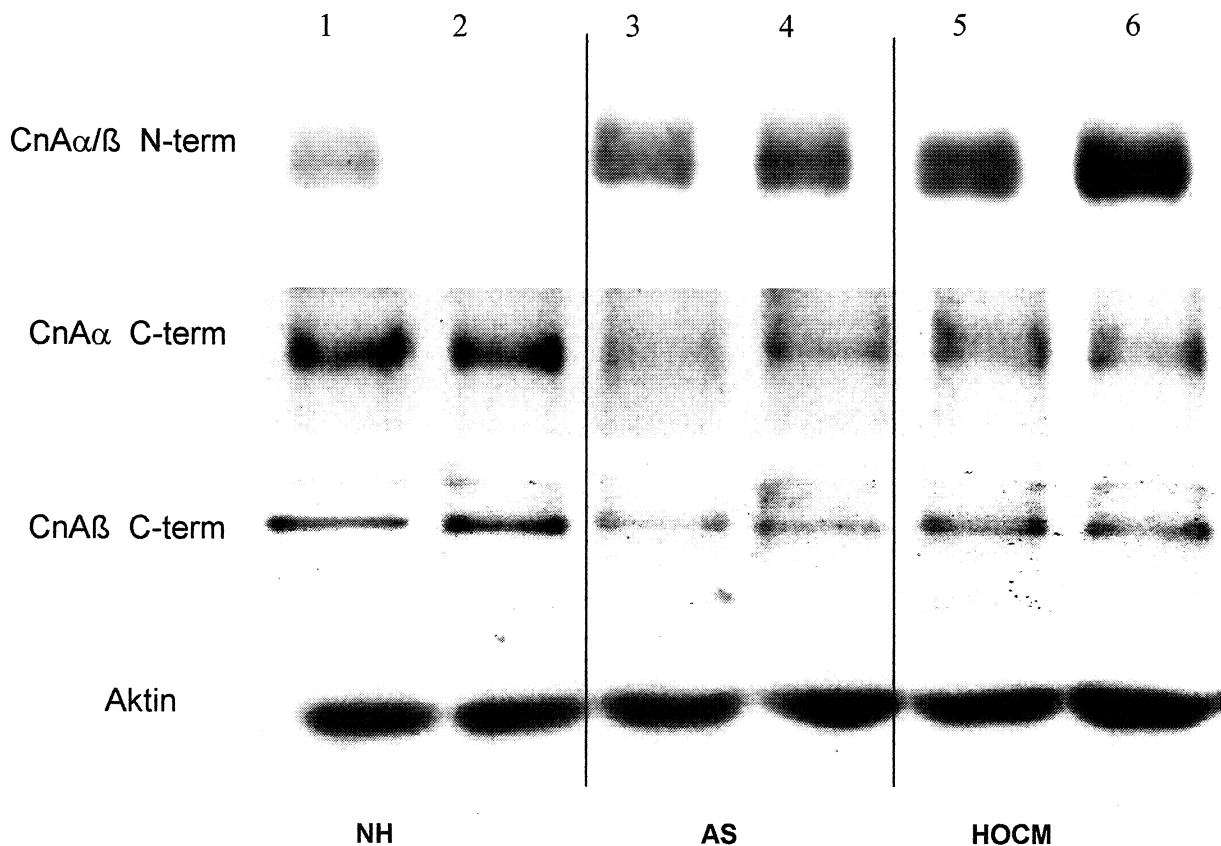
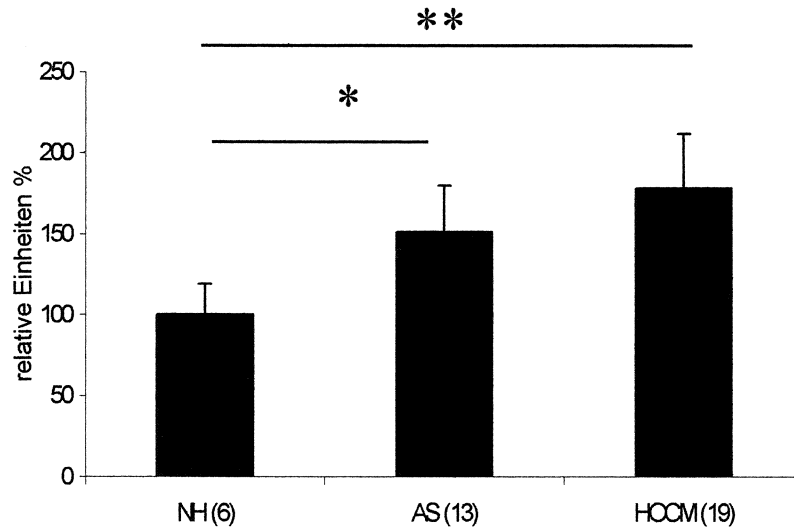


Abbildung 3) Calcineurin-Proteinkonzentration bei verschiedenen Formen kardialer Hypertrophie

Spalte 1 und 2 zeigen das Normalherz (NH), Spalte 3 und 4 die Aortenstenosen (AS), Spalte 5 und 6 die hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie (HOCM). Es wurden 20µg Herzmuskelprotein in jeder Tasche verwendet.

In der ersten Versuchsreihe wurde ein Antikörper gegen das N-terminale Ende von CnA eingesetzt. Der verwendete Antikörper war nicht spezifisch für eine bestimmte Untereinheit. Es konnten sowohl bei der Gruppe der Aortenstenosen, als auch bei der HOCM-Gruppe Banden für den N-terminalen Bereich von Calcineurin gesehen werden, was eine mögliche partielle Proteolyse im Bereich des C-Terminus andeutet. Antikörper, die gegen das C-terminale Ende von Calcineurin gerichtet sind, z.B. CnA-α oder CnA-β wurden ebenfalls verwendet, um eine mögliche Proteolyse des C-terminalen Endes aufzuzeigen. Als Ladekontrolle wurde Aktin eingesetzt.

a)



b)

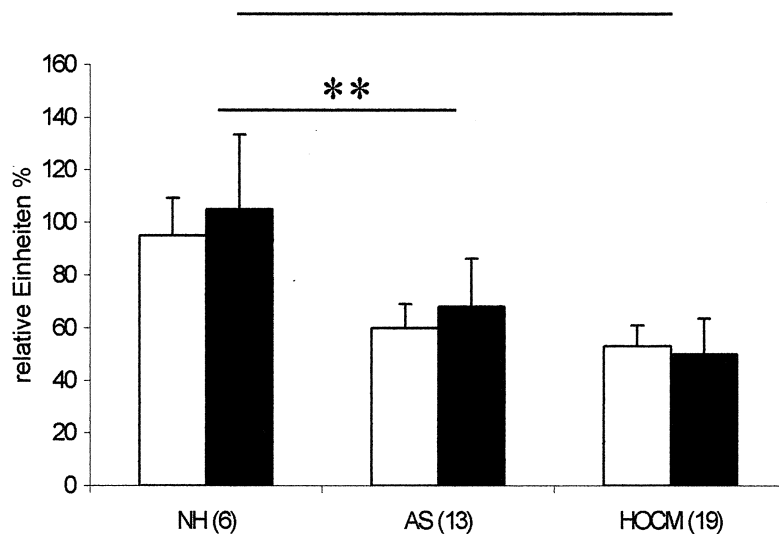


Abbildung4) Calcineurin-Proteinexpression im humanen hypertrophierten Herzen

a) und b)

a) Calcineurin A-Expression im hypertrophierten menschlichen Herzgewebe. Bei Einsatz eines Antikörpers, der gegen den N-terminalen Anteil Calcineurins gerichtet ist, d.h. mit CnA- α und - β reagiert, lässt sich ein klarer Anstieg der Proteinexpression im hypertrophierten Herzen zeigen. * $P > 0.05$; ** $P < 0.01$

b) Calcineurin A-Expression im hypertrophierten menschlichen Herzgewebe. Antikörper, die gegen das C-terminale Ende von CnA- α und - β gerichtet sind zeigten gegenüber dem Normalherzen eine erniedrigte Expression von Calcineurin A.

3.1.2. Calcineurin-Aktivität

Die Calcineurin-Aktivität wurde anhand eines Assays indirekt über die Menge des frei werdenden Phosphats gemessen. Wie bereits im Methodenteil beschrieben, wurden zwei Gleichungen gewählt, um die reine Calcineurin-Aktivität möglichst präzise zu errechnen.

Wie man aus der Abbildung ersehen kann, ergaben beide Gleichungen ähnliche Ergebnisse, so dass man davon ausgehen kann, tatsächlich die reine Calcineurin-Aktivität erfasst zu haben.

Bei der ersten Gleichung ($\text{CaN} = \text{Total} - \text{EGTA}$) zeigte sich gegenüber den Messwerten der sechs Normalherzen, die als 100% Aktivität angenommen werden, in der Gruppe der Aortenstenosen eine Erhöhung der Aktivität auf 165 % und in der Gruppe der HOCM-Patienten auf 290%.

Aus der zweiten Gleichung ($\text{CaN} = \text{OA} - (\text{OA} + \text{EGTA})$) ergaben sich folgende Werte: reine Calcineurin-Aktivität in der Gruppe der Aortenstenosen, verglichen zu den Normalherzen beträgt hier 160% und in der HOCM-Gruppe 260%.

Im Durchschnitt der Ergebnisse beider Gleichungen lässt sich in der Gruppe der Aortenstenosen insgesamt eine Erhöhung auf $163 \pm 11\%$ ($P < 0.001$, Bereich 11%- 217%) feststellen.

Die HOCM-Patienten zeigten eine durchschnittliche Erhöhung auf $275 \pm 13\%$ ($P < 0.001$), mit einer Bandbreite von 112% - 336%.

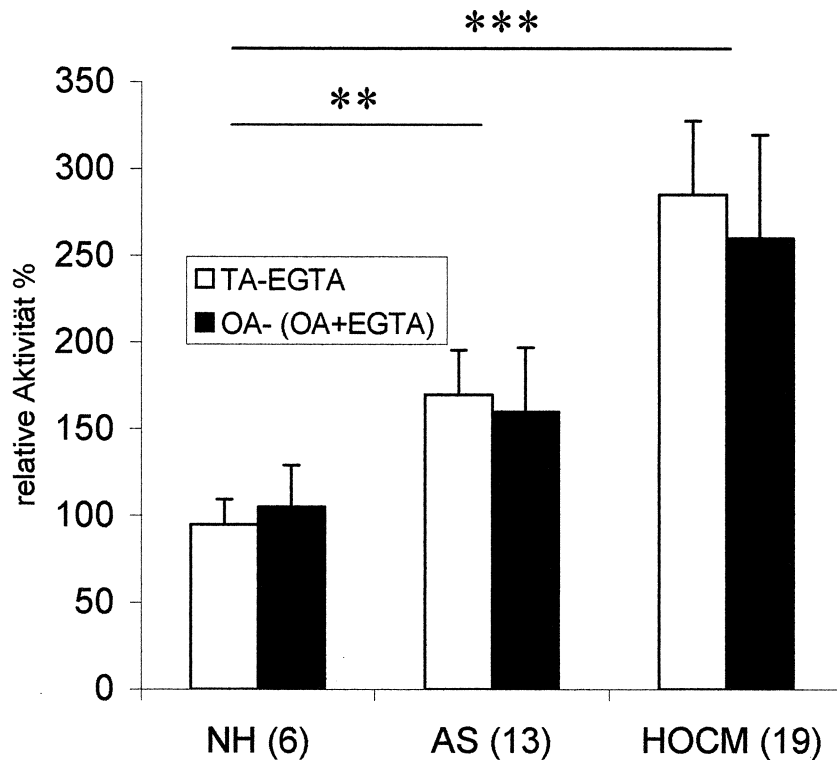


Abbildung 5) Calcineurin-Aktivität

Zur Bestimmung der Phosphatase-Aktivität von Calcineurin wurden jeweils für alle drei Proben (Normalherz (NH), Aortenstenosen (AS) und hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie (HOCN)) zwei Messwerte bestimmt, um die Aktivität korrekt erfassen zu können.

1) Calcineurin-Aktivität entspricht der totalen Aktivität (TA), abzüglich der Aktivität in Gegenwart von EGTA (weißer Balken).

2) Calcineurin-Aktivität gemessen an dem freigesetzten Phosphat unter Zugabe von Okadainsäure, abzüglich der Phosphatmenge, die unter Anwesenheit von Okadainsäure plus EGTA freigesetzt wird (schwarzer Balken). Es wurde keine wesentliche Abweichung der Ergebnisse beider Ansätze beobachtet (Korrelationskoeffizient $r=0.93$). * $P<0.01$; ** $P<0.001$.

3.1.3. Calcineurin mRNA-Expression

Die PCR von Calcineurin wurde durchgeführt, um festzustellen, ob sich im Vergleich zwischen normalem Herzgewebe und hypertrophiertem Gewebe Splicevarianten finden lassen. Die Oligonukleotide wurden so ausgewählt, dass der größte Teil der cDNA eingeschlossen wurde. Es wurde vollständige Calcineurin-mRNA gefunden, einschließlich der 3'-Region, die bei allen Patientengruppen für den C-Terminus codiert. Dieses Ergebnis deutet stark darauf hin, es sich beim Abbau im C-terminalen Bereich des Calcineurins um einen posttranslationalen Vorgang handelt.

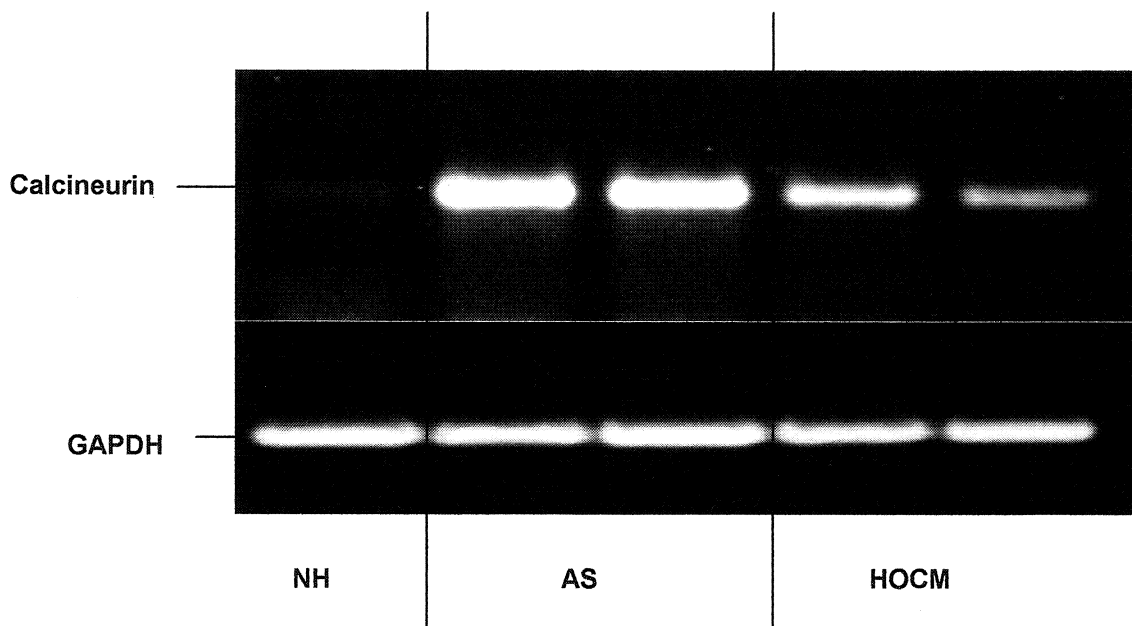


Abbildung 6): Calcineurin Transkripte

Gezeigt werden CnA- β Transkripte. Die reverse-Transkriptions-PCR wurde durchgeführt, um die Calcineurin mRNA darzustellen. Jede Patientengruppe, die der hypertrophen Kardiomyopathie (HOCM), die der Aortenstenosen (AS) und die der Normalherzen (NH), zeigte eine intakte Calcineurin-mRNA, die die autoinhibitorische und katalytische Untereinheit beinhaltet. Dies spricht für eine posttranslationale Proteolyse des C-terminalen CnA-Endes.

3.1.4. Splicevarianten von NF-ATc4

Im 5`Prime Race wurden die aus der reversen Transkription gewonnene DNA amplifiziert, um zu vergleichen, ob die Proteine der Gewebeproben der erkrankten Patienten gegenüber den Proben der gesunden Vergleichsgruppe Veränderungen ihrer Gensequenz zeigen.

Zu diesem Zweck wurde die DNA-Sequenz der gewonnenen Plasmide sequenziert und anschließend verglichen. Es wurden immer nur einzelne Fragmente gesehen, die alle übereinstimmten und keine Unterschiede zeigten.

3.1.5. NF-ATc-Phosphorylierungsstufen

Da der Transkriptionsfaktor NF-ATc von der aktivierten Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert wird, spiegeln veränderte Phosphorylierungsstufen von NF-ATc indirekt die Aktivität des Enzyms Calcineurin wieder. Des Weiteren ändert sich je nach Phosphorylierungsgrad die Migrationsfähigkeit von NF-ATc. Es wurde gezeigt, dass 11 von 13 Phosphorylierungsmöglichkeiten des NF-ATc dephosphoryliert werden, wenn NF-ATc aktiviert wird (Okamura, 2000).

In unseren Versuchen war die Migrationsgeschwindigkeit von NF-ATc1 ebenfalls sowohl in Proben von HOCM-, als auch von Patienten mit Aortenstenosen, im Vergleich zu Normalherzen, erhöht. NF-ATc1 aus Normalherzen, die mit Calcineurin behandelt wurden, zeigten eine identische Laufgeschwindigkeit. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass im hypertrophierten Herzen veränderte Phosphorylierungsstufen von NF-ATc vorliegen.

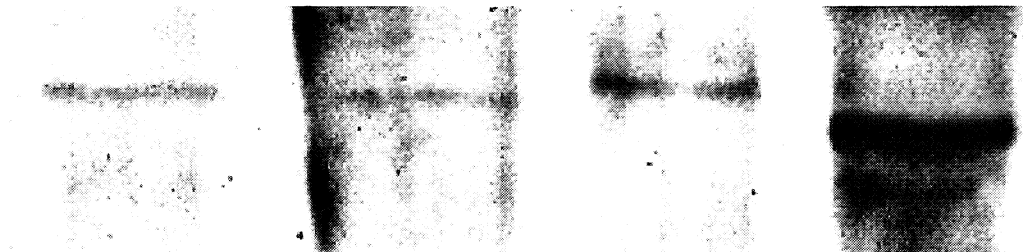


Abbildung 7) NF-ATc1-Phosphorylierungsstufen

Dieser Western Blot zeigt veränderte Phosphorylierungsstufen von NF-ATc1 in verschiedenen Herzgewebeproben. Nach Dephosphorylierung von NF-ATc1 wird das Enzym leichter und kann somit schneller durch das 6%-SDS-Gel wandern.

Spalte 1) Aortenstenose (AS), Spalte 2) hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie (HOCM), Spalte 3) Normalherz (NH), Spalte 4) Normalherz plus rekombiniertes humanes Calcineurin.

4. DISKUSSION

Ein wichtiger Gesichtspunkt humaner Herzhypertrophie ist die Heterogenität ihrer Pathogenese. Um die daraus resultierenden Schwankungsbreiten möglichst gering zu halten, wurden zwei streng definierte und relativ homogene Formen der Hypertrophie untersucht: Eine Patientengruppe litt unter dem Krankheitsbild einer hypertrophen obstruktiven Kardiomyopathie, die andere unter dem einer Aortenstenose. Beide befanden sich im Stadium der kompensierten Herzinsuffizienz, mit diastolischer Compliancestörung, aber ohne systolische Dysfunktion.

In verschiedenen vorausgehenden Studien wurde die Calcineurin-Aktivität bereits am hypertrophierten Herzen im Tiermodell untersucht (Molkentin et al., 1998, Lim et al., 2000, Sussman et al., 1998, Shimoyama et al., 1999, Eto et al., 2000, Hayashida et al., 2000). Es wurde gezeigt, dass die Calcineurin-Aktivität sowohl in einer Tierlinie mit transgener Überexpression von mutierten Proteinen (α -MHC), als auch in einer Tiergruppe mit externer Druckbelastung erhöht war (Molkentin et al., 1998, Lim et al., 2000, Sussman et al., 1998, Shimoyama et al., 1999, Eto et al., 2000, Hayashida et al., 2000). Molkentin zeigte an Mäusen, die das α -MHC-Calcineurin Transgen trugen und somit die konstitutiv aktive katalytische Untereinheit von Calcineurin exprimierten, im Vergleich zu den nicht-transgenen Mäusen eine wesentliche Zunahme der Herzmuskelmasse (Molkentin, 1998). Histologische Analysen des Herzmuskels zeigten in frühen Stadien eine konzentrische Herzhypertrophie. Im Verlauf dilatierte der linke Ventrikel. Zusätzlich konnte mikroskopisch eine Fibrosierung des Myokards festgestellt werden (Molkentin, 1998).

Im Gegensatz dazu stellten andere Gruppen entweder keine Erhöhung (Meguro et al., 1999, Zhang et al., 1999), in einem Fall sogar eine Erniedrigung der Calcineurin-Aktivität (Ding et al., 1999) fest. Es ist nicht klar, ob die unterschiedlichen Ergebnisse aus verschiedenen experimentellen Protokollen herrührten oder tatsächlich spezielle, nicht geklärte Mechanismen des Calcineurins bei der Entstehung der Herzhypertrophie aufzeigten.

Die Arbeitsgruppe um Lim untermauerte durch ihre Versuche die Bedeutung von Calcineurin und der möglichen Hemmung durch den Wirkstoff Cyclosporin A. Im Organismus der Versuchstiere wurde durch Konstriktion der abdominalen Aorta ein arterieller Hypertonus simuliert. Einem Teil der Ratten wurde einen Tag vor Operation Cyclosporin A subkutan injiziert. Lim konnte zeigen, dass die Tiere ohne Cyclosporinbehandlung eine Herzhypertrophie entwickelten, die behandelten jedoch nicht (Lim, 1999).

Die im Anhang beigefügte Tabelle (Zhang, 2002) zeigt die seit 2001 erschienenen Veröffentlichungen zusammengefasst. Hieraus lässt sich erkennen, dass bei ungefähr der Hälfte der Versuchstiere durch Anwendung von Cyclosporin A die Entstehung einer Hypertrophie vermieden werden konnte, bei der anderen Hälfte jedoch ein solch positiver Effekt nicht nachgewiesen werden konnte.

Zusätzlich zum Calcineurin-Pfad gibt es noch andere Signalkaskaden, die die Entstehung der Herzhypertrophie und häufig konsekutiven Herzinsuffizienz beeinflussen.

So waren Mitogen-aktivierte Proteinkinasen und die Proteinkinase Akt zwar im insuffizienten Herzen, nicht jedoch im noch physiologisch hypertrophierten Herzen zu finden. Haq et al. stellten im Gegensatz dazu fest, dass bei Patienten mit kompensierter Hypertrophie nur Calcineurin, nicht jedoch die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen aktiv waren. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz zeigten sowohl Calcineurin, als auch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen eine erhöhte Aktivität (Haq et al., 2000). In den hier beschriebenen Fällen handelte es sich um Patienten, die entweder unter einer hypertensiven, ischämischen oder dilatativen Kardiomyopathie litten.

Unsere Myokardproben stammten von Patienten mit hypertropher obstruktiver Kardiomyopathie oder Aortenstenosen, deren ventrikuläre Funktion jedoch nicht eingeschränkt war.

Mit einem Antikörper, der spezifisch für das N-terminale Ende Calcineurins ist, konnten beim hypertrophierten Herzen zwei Banden mit anderem Molekulargewicht detektiert werden, die im Normalherzen nicht nachzuweisen waren. Dies führt zu der Annahme, dass das Enzym partiell, und vermutlich am C-

terminalen Ende proteolysiert wurde (Ritter et al., 2002). Im weiteren spricht für unsere Hypothese, dass die Normalherzprobe bei Detektion mit einem spezifischen Antikörper gegen das C-terminale Ende eine viel stärkere Bande zeigt, als die Probe des hypertrophierten Herzen.

Auch andere Studienergebnisse (Bolli et al., 1999) deuten darauf hin, dass aufgrund einer Ischämie und anschließenden Reperfusion, eine überhöhte Kalziumkonzentration über Calpain I zu einer selektiven Proteolyse bestimmter Myofibrillen führt. Tatsächlich führt im weiteren die Proteolyse des Calcineurins zu einer dramatisch erhöhten Phosphataseaktivität (Wang et al., 1989).

Unsere Ergebnisse führen zu der Hypothese, dass die Hypertrophie bei den genannten Patientengruppen unter anderem durch Proteolyse der autoinhibitorischen Domäne des Enzyms Calcineurin verursacht wird (Ritter et al., 2002). Einerseits konnten wir eine Erniedrigung der Proteinmenge des C-terminalen Endes von Calcineurin feststellen, andererseits zeigte sich gleichzeitig eine starke Erhöhung der Calcineurin-Aktivität: In der Gruppe der Kardiomyopathiepatienten zeigte sich eine 2.8-fache Erhöhung der Calcineurin-Aktivität, in der Gruppe der Aortenstenosen eine Erhöhung um den Faktor 1.6.

In einem Übersichtsartikel von Leinwand (Leinwand, 2001) wurden Proteine beschrieben, die die Calcineurin-Phosphataseaktivität hemmen können. So konnte an transgenen Mäusen, die das Calcineurin bindende Protein hMCIP1 exprimieren, im Vergleich zu den Wildtypen eine um 5-10% reduzierte Hypertrophieentwicklung gezeigt werden (Rothermel et al., 2001).

Ein Problem, das sich bei der Bestimmung der Calcineurin-Aktivität immer wieder stellt, ist, dass nicht klar ist, ob die in vitro angenommene maximale Calcineurinkonzentration der in vivo Situation entspricht. Im Moment kann dieses Problem nicht sicher geklärt werden. Die indirekte Messmethode über den Phosphorylierungsgrad von NF-ATc, kann ein erster Hinweis auf die in vivo stattfindende Dephosphorylierung von NF-ATc sein. Rao (Rao et al., 1997) zeigte bereits, dass NF-ATc erst nach der Dephosphorylierung bestimmter Serine des N-Terminus durch Calcineurin in den Zellkern transloziert.

Es wurde gezeigt, dass NF-ATc an 13 Stellen dephosphoryliert wird (Okamura et al., 2000). Die vorliegende Arbeit zeigt bei der elektrophoretischen Aufteilung

der Proteine eines hypertrophierten Herzen eine erhöhte Laufgeschwindigkeit von NF-ATc. Dies weist darauf hin, dass das Protein vermutlich aufgrund von Dephosphorylierung leichter geworden ist. Unsere Ergebnisse erhärten schließlich die Hypothese, dass die Calcineurin-Aktivität tatsächlich einen relevanten Faktor bei der Entstehung der Herzhypertrophie darstellt.

Den vermeintlichen Widerspruch, dass ein Antikörper, der gegen das N-terminale Ende von Calcineurin gerichtet ist, im hypertrophierten Herzen zwei Banden zeigt, einer, der gegen das C-terminale Ende gerichtet ist jedoch eine wesentlich schwächere Bande zeigt, als im Normalherzen, interpretieren wir als Proteolyse des C-terminalen Endes von Calcineurin. Da das C-terminale Ende des Enzyms die autoinhibitorische Region beherbergt, erklärt die Proteolyse dieses Abschnitts eine deutliche Erhöhung der Aktivität (Ritter et al, 2000).

Diese Art der Signalkaskade würde nach dem Autor R. Sanders Williams (2002) eine völlig neue Art der Aktivierung darstellen, die die Bedeutung von Calcineurin innerhalb der Signalkaskade bestärken würde. Um unsere Hypothese der Proteolyse zu unterschreiben fordert R. Sanders Williams weitere Versuche, wie zum Beispiel die Messung der Calcineurin-Aktivität in vivo oder die Isolierung der proteolysierten Calcineurin-Form, räumt jedoch gleichzeitig ein, dass diese Versuche durch die sehr begrenzte Anzahl der Gewebeproben nur beschränkt durchzuführen sind. Es wäre von großem Interesse in sich anschließenden Experimenten nicht nur die Hypothese der Proteolyse zu untermauern, sondern auch ihren genauen Prozess beschreiben zu können. Wenn die Rolle von Calcineurin bei der Entstehung der pathologischen Herzhypertrophie geklärt ist, könnte weiter versucht werden, die Signalkaskade derart zu manipulieren, dass es möglich wird, die sonst ablaufenden pathophysiologischen Mechanismen zu hemmen. Die bisher bekannten Immunsuppressiva, wie Cyclosporin A und FK506 können im Moment nicht für die Behandlung der Herzhypertrophie eingesetzt werden, da ihre nicht-kardialen Effekte und Nebenwirkungen für die Patienten zu schädigend sind. Die im Tiermodell nötigen Dosen, die zu einer Hemmung der Herzhypertrophie führen, übersteigen die, nach Transplantation eingesetzten bei weitem. Neue Erkenntnisse über den Calcineurin-Signalweg könnten jedoch neue Angriffs-

punkte für Wirkstoffe bieten, die nur am Kardiomyozyten wirken. Bis man jedoch die Entstehung der Herzhypertrophie und die daraus resultierende Herzinsuffizienz prophylaktisch und therapeutisch medikamentös behandeln kann, sind noch viele neue Erkenntnisse erforderlich.

Die vorliegende Arbeit ist die erste, die den Calcineurin-Signalweg an humanen Gewebeproben von 19 Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie und 13 Patienten mit Aortenstenose untersucht hat. Zusammenfassend sprechen unsere Ergebnisse für die Aktivierung des Calcineurin-Pfads bei beiden Krankheitsbildern und bestärken das Konzept, dass Calcineurin bei der Entstehung der humanen Herzhypertrophie eine wichtige Rolle spielt.

5. Zusammenfassung

Bei der Herzhypertrophie handelt es sich um eine zunächst den Anforderungen des Herzens angepasste Reaktion. Verschiedene Erkrankungen, wie zum Beispiel arterielle Hypertonie, Myokardinfarkt, Herzrhythmusstörungen oder auch endokrine Erkrankungen können dem Herzen eine erhöhte Leistung abfordern, die durch Zunahme der Muskelmasse vorübergehend auch geleistet werden kann. Im Verlauf kann sich jedoch aus jeder weiter zunehmenden Herzhypertrophie schließlich eine Herzinsuffizienz entwickeln.

Aus diesem Grund ist es von großem Interesse, die molekularen Grundlagen dieser Erkrankung zu erfassen. In den letzten Jahren wurde am Tiermodell gezeigt, dass die Calcineurin-Signalkaskade bei der Entstehung der Myokardhypertrophie eine bedeutende Rolle spielt. Calcineurin ist eine 80kDa schwere Phosphatase, die aus zwei Untereinheiten besteht: Calcineurin A, welches die katalytische Untereinheit beherbergt, und Calcineurin B, welches die regulatorische Untereinheit beinhaltet. Calcineurin wird durch einen Anstieg der Kalziumkonzentration aktiviert und dephosphoryliert den nukleären Transkriptionsfaktor NF-ATc4, der anschließend in den Zellkern transloziert und die Expression hypertrophierelevanter Gene induziert. Das Immunsuppressivum Cyclosporin A hemmt Calcineurin und kann somit den Ablauf der Kaskade stoppen. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Untersuchungen zur Calcineurin-Kaskade an humanen Gewebeproben von hypertrophierten Herzen, die in ihrer Ejektionsfraktion nicht eingeschränkt waren, durchgeführt.

Die Versuche wurden an Myokardgewebeproben von 19 Patienten mit einer hypertrophen obstruktiven Kardiomyopathie (HOCM) und 13 Patienten, die unter einer hochgradigen Aortenstenose litten, durchgeführt. Die Proteinkonzentration von Calcineurin zeigte sich im hypertrophierten Gewebe im Vergleich zum Normalgewebe reduziert. Im Gegensatz dazu konnte eine erhöhte Aktivität der Phosphatase festgestellt werden. Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass die regulatorische Untereinheit, die sich am C-terminalen Ende Calcineurins befindet, proteolysiert wurde. Ob im hyper-

trophierten Herzen Splicevarianten von NF-ATc4 exprimiert werden, versuchten wir anhand des 5'Prime-Race festzustellen. Leider konnten nur einzelne Fragmente, jedoch nie das ganze Gen dargestellt werden. Die gefundenen Fragmente zeigten jedoch keine Abweichung von den bekannten Sequenzen. Abschließend lässt sich feststellen, dass der Calcineurin-Signalweg im menschlichen Herzen sowohl bei Herzhypertrophie aufgrund von externer Drucküberlastung, als auch bei HOCM aktiviert ist, obwohl die Proteinkonzentration erniedrigt ist.

Als Konsequenz könnten neue Medikamente getestet werden, die den Calcineurinweg blockieren, jedoch im Gegensatz zu den bisher bekannten Cyclosporin A und FK506 nicht immunsuppressiv wirken.

6. Nachtrag

Calcineurin stellt einen wichtigen Faktor bei der Entstehung der myokardialen Hypertrophie dar. Es konnte gezeigt werden, dass die Proteolyse der autoinhibitorischen Domäne des Calcineurins unter pathologischen Arbeitsbelastungen zu einer erhöhten Aktivität des Enzyms führt (Ritter et al., 2002). In sich anschließenden Versuchsreihen wurde der Mechanismus der Proteolyse untersucht.

Nachdem Kardiomyozyten von neonatalen Ratten mit dem Hypertrophiefaktor Angiotensin II behandelt wurden, zeigte sich eine deutlich erhöhte Aktivität der Calpain (Ritter et al., 2002), welches die Proteolyse der autoinhibitorischen Domäne von CnA induziert.

Durch Inhibition des Calpain konnte die Proteolyse verhindert werden. Im weiteren zeigte sich, dass die Aktivität von CnA auch nach Entfernen des Stimulus Angiotensin II erhöht blieb (Burkard et al. 2005).

Dies unterstreicht die These der proteolysierten autoinhibitorischen Unter-einheit. Nach Proteolyse transloziert CnA in den Zellkern.

7. Literaturverzeichnis

Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanism of myocardial stunning. *Physiol. Rev.* 1999; 79:609-634

Bueno OF, Rooij van E, Molkentin J, et al. Calcineurin and hypertrophic heart disease: novel insights and remaining questions. *Cardiovasc. Res.* 2002 Mar; 53(4):806-21.

Burkard N, Becher J, Heindl C, Neyses L, Schuh K, Ritter O. Targeted proteolysis sustains calcineurin activation. *Circ.* Mar 2005; 111(8):1045-53

Chow CW, Davis R. Integration of calcium and cyclic AMP signaling pathways by 14-3-3. *Mol. Cell. Biol.* 2000 Jan; 20(2):702-12.

Chow CW, Rincon M, Davis RJ. Requirement of transcription factor NFAT for interleukin expression. *Mol. Cell. Biol.* 1999; 19:2300-2307

Clark, J.M. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic. Acids. Res.* 1998; 16:9677-9686

Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signaling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 1992; 357:695-697

Crabtree GR. Generic signals and specific outcomes: signaling through Calcium, Calcineurin, and NFAT. *Cell* 1999; 96:611-614

Delling U, Tureckova J, Lim HW, et al. A calcineurin-NFATc3-dependent pathway regulates skeletal muscle differentiation and slow myosin heavy-chain expression. *Mol. Cell. Biol.* 2000; 17:6600-11

Ding B, Price RL, Borg TK, et al. Pressure overload includes severe hypertrophy in mice treated with cyclosporin, an inhibitor of calcineurin. *Circ. Res.* 1999; 84:729-734

Durand DB, Shaw JP, Bush MR et al. Characterization of antigen receptor response elements within the interleukin-2 enhancer. *Mol. Cell. Biol.* 1998; 8:1715-1724

Eto Y, Yonekura K, Sonoda M, et al. Calcineurin is activated in rat hearts with physiological left ventricular hypertrophy induced by voluntary exercise training. *Circ.* 2000; 101:2134-2137

Frey N, Olson EN, Cardiac Hypertrophy: The Good, the Bad, and the Ugly. *Ann. Rev. Physiol.* 2003; 65:45-79

Gonzales Bosc LV, Wilkerson MK, Bradley KN, et al. Intraluminal pressure is a stimulus for NFATc3 nuclear accumulation. *J. Biol. Chem.* 2004; 79:10702-10709

Haq S, Choukroun G, Lim H, et al. Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circ.* 2001; 103:670-677

Hayashida W, Kihara Y, Yasaka A, et al. Cardiac calcineurin during transition from hypertrophy to heart failure in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 273:347- 351

Horsley V, Friday BB, Matteson S, et al. Regulation of the growth of multinucleated muscle cells by an NFATc2-dependent pathway. *J. Cell. Biol.* 2001; 153(2):329-338

Hubbard MJ, Klee CB. Functional domain structure of calcineurin A: mapping by limited proteolysis. *Biochem.* 1989; 28:1868-1874

Izumo S., Aoki H. Calcineurin-the missing link in cardiac hypertrophy. *Nat. Med.* 1998, 4:661-662

Klee CB, Ren H , Wang X. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:13367-13370

Leinwand LA. Calcineurin inhibition and cardiac hypertrophy: A matter of balance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 2947-2949

Lim HW, Molkentin J., Calcineurin and human heart failure. *Nat. Med.* 1999; 5(3):246-7

Lim HW, De Windt LJ, Steinberg L, et al. Calcineurin Expression Activation and Function in Cardiac Pressure-Overload Hypertrophy. *Circ.* 2000; 101: 2431-2437

McKinsey TA, Olson E. Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry. *Curr. Opin. in Genet. & Develop.* 1999; 9:267-274

Meguro T, Hong C, Asai K, et al. Cyclosporine attenuates pressure-overload hypertrophy in mice while enhancing susceptibility to decompensation and heart failure. *Circ. Res.* 1999; 84:735-740

Molkentin J.D. Calcineurin and beyond, cardiac hypertrophic signaling. *Circ. Res.* 2000; 87:731-738

Molkentin JD, Dorn G. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Ann. Rev. Physiol.* 2001; 63:391-426

- Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, et al. A Calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 1998; 93:215-228
- Okamura H, Aramburu J, Garcia-Rodriguez C, et al. Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol. Cell*. 2000; 6:539-550
- Olson EN, Molkentin J. Prevention of cardiac hypertrophy by calcineurin inhibition—hope or hype? *Circ. Res.* 1999; 84:623-632
- Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Ann. Rev. Immunol.* 1997; 15:707-747
- Ritter O, Bottez N, Burkard N et al. A molecular mechanism improving the contractile state in human myocardial hypertrophy. *Exper. and Cl. Card.* 2002; 7:151-157
- Ritter O, Hack S, Schuh K et al. Calcineurin in human heart hypertrophy. *Circ.* 2002; 105:2265-2269
- Rothermel BA, McKinsey TA, Vega RB, et al. Myocyte-enriched Calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98:3328-3333
- Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Ann. Rev. Physiology* 1997; 59:551-571
- Schulte HD, Bricks WH, Loesse B, et al. Prognosis of patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy after transaortic myectomy: late results up to twenty-five years. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1993; 106:709-717
- Schulz RA, Yutzey KE. Calcineurin signaling and NFAT activation in cardiovascular and skeletal muscle development. *Dev. Biol.* 2004; 266(1):1-16
- Shimoyama M, Hayashi D, Takimoto E, et al. Calcineurin plays a critical role in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Circ.* 1999; 100(24):2449-2454
- Sikela J.M., Auffray C. Finding new genes faster than ever. *Nat. Genet.* 1993; 3:189-191
- Sussman MA, McCulloch A, Borg TK. Dance band on the Titanic, Biomechanical Signaling in Cardiac Hypertrophy. *Circ. Res.* 2002; 91:888-898
- Sussman Ma, Lim HW, Gude N, et al. Prevention of cardiac hypertrophy in mice by Calcineurin inhibition. *Science* 1998; 281:1690-1693
- Tsao L, Neville C, et al. Revisiting calcineurin and human heart failure. *Nat. Med.* 2000; 6(1):2-3

Wang KK, Roufogalis BD, Villalobo A. Characterization of the fragmented forms of Calcineurin produced by calpain I. *Biochem. Cell. Biol.* 1989; 67:703-711

Wilkins BJ, Molkenin JD. Calcineurin and cardiac hypertrophy: Where have we been? Where are we going? *J. Physiol.* 2002; 541:1-8

Williams RS. Calcineurin signaling in human cardiac hypertrophy. *Circ.* 2002; 105:2242-2243

Yang SA, Klee CB. Low affinity Ca²⁺-binding sites of calcineurin B mediate conformational changes in calcineurin A. *Biochem.* 2000; 39:16147-16154

Zhang W, Kowal RC, Rusnak F, et al. Failure of calcineurin inhibitors to prevent pressure-overload left ventricular hypertrophy in rats. *Circ. Res.* 1999; 84:722-728

Zou Y., MD, PhD, Hiroi Y, MD, PhD, Uozumi H., MD et al. Calcineurin plays a critical role in the development of pressure overload- induced cardiac hypertrophy. *Circ.* 2001; 104:97-101

8. Anhang

Tabelle 1) Zusammenfassung der bisherigen Untersuchungen zu Calcineurin

Autor, Journal	Tierspezies	Calcineurin-Aktivität im hypertrophierten Herzen	Medikament	Dosis (mg/kg/Tag)	Dauer der Behandlung in Wochen	Myokardhypertrophie
Präventionsstudien:						
Mervaala, Hypertension	Ratte/ SHR	nicht gemessen	CsA	5	6	nicht verhindert
Sussman, Science	Ratte/ AB	nicht gemessen	CsA	20	6	verhindert
Luo/Nat. Med.	Ratte/ AB	nicht gemessen	CsA	20 und 40	14	nicht verhindert
Muller, Science	Ratte/ AB	nicht gemessen	FK506	2	14	nicht verhindert
Zhang, Circ. Res.	Maus/ AB	nicht gemessen	CsA	50	3	nicht verhindert
	Ratte/ AB	unverändert	CsA	10 und 20	2/4	nicht verhindert
	Ratte/ AB	nicht gemessen	FK506	0.3	4	nicht verhindert
	Ratte/ SHR	nicht gemessen	CsA	5	6	nicht verhindert
Ding, Circ. Res.	Maus/ AB	erniedrigt	CsA	50	4	nicht verhindert
Meguro, Circ. Res.	Maus/ AB	unverändert	CsA	25	3	reduziert
Mervaala, Blood Pressure	Ratte/ SHR	nicht gemessen	CsA	5	6	nicht verhindert
Shimoyama, Circulation	Ratte/ AB	erhöht	FK506	1	3	verhindert
Eto, Circulation	Ratte/ AB	nach 1 Woche gestiegen	-	-	-	-
	Ratte/AB	Unverändert	CsA	40	4	Reduziert

Autor, Journal	Tierspezies	Calcineurin-Aktivität im hypertrophierten Herzen	Medikament	Dosis (mg/kg/Tag)	Dauer der Behandlung in Wochen	Myokardhypertrophie
Präventionsstudien:						
Lim, Circulation	Ratte/ AB	erhöht	CsA	8 und 20	2	reduziert/ verhindert
Hill, Circulation	Maus/ AB	nicht gemessen	CsA	50	1/2/3/4/5	reduziert
Hayashida, BBRC	Ratte/ DS	anfänglich erhöht	CsA	10	4/6	nicht verhindert
Lassila/ Br. J. Pharmacol.	Ratte/ SHR	nicht gemessen	CsA	5	6	nicht verhindert
Shimoyama, Circulation	Ratte/ DS	erhöht	FK506	0.02 und 0.2	6 (6-12)	verhindert
Sakata, Circulation	Ratte/ DS	erhöht	FK506	1	12 (8-20)	reduziert
Regressionsstudien:						
Lim, Circulation	Ratte/ AB	nicht gemessen	CsA	20	2	teilweise rückläufig
Shimoyama, Circulation	Ratte /DS	erhöht	FK506	0.02 und 0.2	4 (12-16)	teilweise rückläufig
Sakata, Circulation	Ratte/ DS	Nicht gemessen	FK506	1	3 (17-20)	nicht rückläufig

Diese Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der bis 2001 erschienenen Arbeiten über die Calcineurin-Aktivität im Ratten- oder Mausmodell. Es wurden verschiedene Versuchsreihen durchgeführt. Grundlage war immer eine durch arterielle Hypertonie verursachte Myokardhypertrophie, die durch variierende Mechanismen induziert wurde. Verschiedene Medikamente, wie z.B. Cyclosporin A (CsA) oder FK 506 wurden in unterschiedlichen Dosierungen eingesetzt, um eine Prävention oder einen Rückgang der Hypertrophie zu zeigen.

SHR: spontan hypertensive Ratten, AB: aortic banding, DS: Dahl-Salz sensitive Ratten

9. Abkürzungsverzeichnis

AB	: aortic banding
AS	: Aortenstenose
AP 1	: Adapter Primer 1
β -MHC	: β -myosin heavy chain
Ca ²⁺	: Kalzium
CaM	: Calmodulin
Cn	: Calcineurin
CnA	: Calcineurin A
CsA	: Cyclosporin A
cDNA	: complementary Desoxyribonukleinsäure
DNTP	: Deoxyribonucleotid Triphosphat
DS	: Dahl-Salz sensitiv
DTT	: Dithiothreitol
ECL-Membran	: enhanced chemical Luminescence- Membran
EDTA	: Ethylendiamintetraessigsäure
EF	: Ejektionsfraktion
EGTA	: Ethylen Glycol –bis (β -Aminoethylether) Tetraessigsäure
GAPDH	: Glyceraldehyd 3-Phosphatase Dehydrogenase
G3PDH	: Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GSP	: Gene specific Primer
hMCIP 1	: human muscle enriched Calcineurin inhibitory protein
HOCM	: hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie
IPTG	: Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside
IVS	: intraventrikuläres Septum
LB-Medium	: Luria Bertani Medium
LVEDP	: linksventrikulärer enddiastolischer Druck
MAPK	: Mitogen-aktivierte Proteinkaskade
mRNA	: messenger Ribonukleinsäure
NF-ATc	: Nuclear factor of activated T-cells
NH	: Normalherz
OA	: Okadainsäure
PBS/T	: Phosphate buffered Saline/ Twain

PCR	: Polymerasekettenreaktion
PKC	: Proteinkinase C
PP1	: Proteinphosphatase 1
PP2A	: Proteinphosphatase 2A
PP2B	: Proteinphosphatase 2B= Calcineurin
pT-Adv-Vektor	: Eigennamen
RNase H	: Ribonuklease H
T4 DNA-Polymerase	: DNA-Polymerase des Bakteriophagen T4
Taq-Polymerase	: DNA-Polymerase des Bakteriums Thermophilus aquaticus
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
SHR	: spontan hypertensive Ratten
X-Gal	: 5-brom-4-chloro-3-indolyl-beta-D-Galactopyranoside

Danksagung

Herzlichen Dank meinen Eltern, deren Liebe und Fürsorge mir diesen Weg ermöglicht haben.

Meinen Brüdern, die diesen Weg bunter gemacht haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. med. J. Bauersachs und Herrn Priv. Doz. Dr. med. O. Ritter für die hilfsbereite, engmaschige Betreuung der Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. med. L. Neyses danke ich für die Überlassung des Themas.

Herrn Prof. Dr. med. W. Voelker möchte ich für die Übernahme des Korreferats danken.

Frau Prof. Dr. rer. nat. K. Ulrichs danke ich für die Übernahme des Rigorosums.

Im Weiteren danke ich allen Mitarbeitern des Labors für molekulare Kardiologie für ihre vielfache Unterstützung.

Lebenslauf

1976	am 9. Mai in Merzig geboren
1982-1983	Grundschule Bechtholdsheimerhof, Würzburg
1983-1986	Eichendorff-Grundschule in Veitshöchheim
1986-1996	St. Ursula-Gymnasium, Würzburg
1991-1994	Engagement in der Gruppenleitung der Ministranten Veitshöchheim
1996	Abitur
1996	Pflegerische Tätigkeit im AWO-Altenpflegeheim in Würzburg, Heidingsfeld im Rahmen eines freiwillig sozialen Jahres
1996-1998	Studium der Humanmedizin an der Ludwig- Maximilians- Universität München
1998	Ärztliche Vorprüfung
1998-2002	Klinische Semester an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
1999	Erstes Staatsexamen
2000	Beginn der Ausbildung zur Zusatzbezeichnung Sportmedizin
2001-2002	Pflegerische Tätigkeit im Rahmen von Sitzwachen in der medizinischen Universitätsklinik, Würzburg
2002	Zweites Staatsexamen
2002	Veröffentlichung in Circulation: Calcineurin in Human Heart Hypertrophy (Ritter O. et al., Circ. 2002, 105:2265-2269)
2002-2003	Praktisches Jahr in der Universitätskinderklinik Würzburg, der viszeralchirurgischen Abteilung des Sanitätsbetriebs Bozen in Italien und der medizinischen Abteilung des Sykehus Odda in Norwegen
seit 2003	ärztliche Tätigkeit in der internistischen zentralen Patientenaufnahme und Intensivstation des Asklepios Westklinikums Rissen in Hamburg

Veröffentlichung

In „Circulation“ 2002:

Ritter O, Hack S, Schuh K et al. Calcineurin in human heart hypertrophy. *Circulation* 2002; 105:2265-2269