

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I

der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. G. Ertl

Veränderungen der Expression kontraktiler Proteine bei der humanen Herzhypertrophie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Nicolai Bottez

aus Münster

Würzburg, Dezember 2007

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. O. Ritter

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. K. Schuh

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Mai 2008

Der Promovend ist Arzt.

Gewidmet meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	-1-
1.1.	Die hypertrophisch-obstruktive Kardiomyopathie (HOCM)	-2-
1.1.1.	Definition, klinisches Erscheinungsbild und Allgemeines	-2-
1.1.2.	Epidemiologische Fakten zur hypertrophen Kardiomyopathie	-3-
1.1.3.	Genetische Ursachen der hypertrophen Kardiomyopathie	-4-
1.1.4.	Diagnostik der hypertrophen Kardiomyopathie	-5-
1.1.5.	Therapie der hypertrophen Kardiomyopathie	-6-
1.2.	Die valvuläre Aortenstenose (AS)	-7-
1.2.1.	Definition, klinisches Erscheinungsbild und Allgemeines	-7-
1.2.2.	Epidemiologische Fakten zur valvulären Aortenstenose	-8-
1.2.3.	Diagnostik der valvulären Aortenstenose	-9-
1.2.4.	Therapie der valvulären Aortenstenose	-10-
1.3.	Das Myosinmolekül	-11-
1.4.	Die Muskelkontraktion	-13-
1.4.1.	Der Querbrückenzyklus	-13-
1.4.2.	Die Rolle des Troponinkomplexes bei der Kontraktion	-14-
1.4.3.	Die Rolle der Phosphorylierung des kardialen Troponin I (cTnI) bei der Kontraktion	-15-
1.5.	Die leichten Myosinketten (MLC)	-16-
1.5.1.	Die essentiellen leichten Myosinketten (ELC, MLC-1)	-16-
1.5.2.	Die regulatorischen leichten Myosinketten (RLC, MLC-2)	-18-
1.6.	Die schweren Myosinketten (MHC)	-19-
2.	Fragestellung	-20-
3.	Methoden	-20-
3.1.	Patientenpopulation	-20-
3.2.	Prinzip der 2-dimensionalen Polyacrylamidgel-Elektrophorese (2D-PAGE)	-21-
3.2.1.	1. Dimension: isoelektrische Fokussierung (IEF)	-21-
3.2.2.	2. Dimension: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	-22-
3.3.	Bestimmung des Phosphorylierungsgrad des kardialen Troponin I (cTnI) mittels 2-dimensionaler Polyacrylamidgel-Elektrophorese (2D-PAGE)	-24-

3.3.1.	Aufbereitung der Proben	-24-
3.3.2.	1. Dimension: isoelektrische Fokussierung (IEF)	-24-
3.3.3.	2. Dimension Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	-26-
3.4.	Bestimmung der Expression der atrialen leichten Kette vom Typ-1 (ALC-1) mittels 2-dimensionaler Polyacrylamidgel-Elektrophorese (2D-PAGE)	-28-
3.4.1.	Aufbereitung der Proben	-28-
3.4.2.	1. Dimension: isoelektrische Fokussierung (IEF)	-29-
3.4.3.	2. Dimension: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	-29-
3.5.	Bestimmung der Isoformen der schweren Myosinketten (MHC) mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	-30-
3.5.1.	Aufbereitung der Proben	-30-
3.5.2.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung der schweren Myosinketten (MHC)	-30-
3.6.	Densitometrische Auswertung der Gele	-31-
3.7.	Statistische Auswertung	-31-
4.	Ergebnisse	-32-
4.1.	Klinische Daten	-32-
4.2.	Analyse der leichten Myosinketten (MLC)	-32-
4.3.	Beziehung zwischen ALC-1-Expression und klinischen Daten	-35-
4.4.	Analyse der schweren Myosinketten (MHC)	-36-
4.5.	Phosphorylierungsgrad des kardialen Troponin I (cTnI)	-37-
5.	Diskussion	-38-
5.1.	Bedeutung des Phosphorylierungsgrad des kardialen Troponin I (cTnI) bei der humanen Herzhypertrophie	-38-
5.2.	Bedeutung der Expression der atrialen leichten Myosinkette vom Typ 1 (ALC-1) bei der humanen Herzhypertrophie	-42-
5.3.	Bedeutung der schweren Myosinketten (MHC) bei der humanen Herzhypertrophie	-44-
6.	Zusammenfassung	-45-
7.	Literaturverzeichnis	-48-

1 Einleitung

Die Herzhypertrophie stellt einen Anpassungsvorgang des Herzens an erhöhte hämodynamische Anforderungen dar. Über die Zunahme der Muskelmasse kann das Herz seine Kontraktilität steigern, um beispielsweise die durch eine Aortenklappenstenose erhöhte Nachlast zu kompensieren. Dieser physiologische Mechanismus mündet jedoch in vielen Fällen in einer Schädigung des Myokards und letztendlich in einer Herzinsuffizienz. Nach Überschreiten des kritischen Herzgewichtes kommt es zur Minderperfusion und zur strukturellen Umwandlung des Myokards, die als Gefügedilatation bezeichnet wird. In der Folge nimmt die kardiale Pumpleistung wieder ab und es kommt zur Ausbildung des klinischen Bildes der Herzinsuffizienz.

Der anfangs physiologische Anpassungsprozess wandelt sich zu einem eigenständigen Risikofaktor für kardiale Ereignisse wie dem Myokardinfarkt und der Herzinsuffizienz. Bei der Myokardhypertrophie kommt es sowohl zu qualitativen, wie auch zu quantitativen Veränderungen in der Expression der Sarkomerproteine.

Die bislang erarbeiteten Ergebnisse weisen darauf hin, dass bei diesem Vorgang insbesondere dem Wechsel von der β - auf die β -Isoform der schweren Myosinketten (myosin heavy chain; MHC) [1], der Expression der atrialen Isoform der leichten Myosinkette vom Typ 1 (atrial light chain 1,; ALC-1) [2], sowie der verstärkten Phosphorylierung des kardialen Troponin I (cTnI) [3] zukommen könnte. Es wurden daher insgesamt 38 Proben auf die oben genannten Veränderungen untersucht. 6 der Proben stammten von Normalherzen (NH), 19 von Patienten mit einer hypertrophisch-obstruktiven Kardiomyopathie (HOCM) und 13 von Patienten mit einer Aortenstenose (AS).

1.1 Die hypertrophisch-obstruktive Kardiomyopathie (HOCM)

1.1.1 Definition, klinisches Erscheinungsbild und Allgemeines

Die HOCM stellt eine Unterform der hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) dar. Bei der hypertrophen Kardiomyopathie kommt es zu einer Hypertrophie des Myokards, die zu einer Verkleinerung des linken Ventrikels und zu einer Verschlechterung der diastolischen Füllung führt. Bei der HOCM als Sonderform ist besonders das septale Myokard verdickt, das Verhältnis von Septumdicke zur Dicke der freien Ventrikelwand wird hier grösser als 1,3. Folge dieser asymmetrischen septalen Hypertrophie ist eine Obstruktion der linksventrikulären Ausflussbahn, die für die eingeschränkte Belastungstoleranz der Patienten und das Auftreten synkopaler Zustände unter Belastung verantwortlich gemacht wird. Die Obstruktion ist nicht zwangsläufig unter Ruhebedingungen nachweisbar, sondern hängt von den aktuellen hämodynamischen Gegebenheiten ab. Steigerungen der Kontraktilität und die Abnahme von Vor- oder Nachlast können die Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstraktes aggravieren. Durch die erhöhten Füllungsdrücke kann es zu einer Dilatation der Vorhöfe kommen, die sich klinisch häufig in Form einer Dyspnoe manifestiert. Die starke Zunahme der Muskelmasse bewirkt zudem eine Verschlechterung der Myokardperfusion. HOCM-Patienten klagen daher häufig über Angina-pectoris-artige Beschwerden, ohne dass sich angiographisch Stenosen der Koronargefässe nachweisen lassen.

HOCM-Patienten sind gehäuft vom plötzlichen Herztod bedroht, der in vielen Fällen durch tachykarde ventrikuläre Rhythmusstörungen hervorgerufen wird. Auch supraventrikuläre Tachykardien treten bei diesen Patienten gehäuft auf und können zu

einer abrupt einsetzenden drastischen Verschlechterung der diastolischen Füllung führen [4].

Im angelsächsischen Sprachraum wird die hypertrophisch-obstruktive Kardiomyopathie (HOCM) nicht als eigenständiges Krankheitsbild betrachtet, sondern als Unterform der hypertrophen Kardiomyopathie (HCM). Der hier weiter dargestellte Kenntnisstand bezieht sich somit nicht ausschließlich auf die HOCM sondern auf die größere Gruppe der HCM.

1.1.2 Epidemiologische Fakten zur hypertrophen Kardiomyopathie

Die Prävalenz der hypertrophen Kardiomyopathie in der erwachsenen Bevölkerung liegt bei etwa bei etwa 0,2 %. Damit ist die hypertrophe Kardiomyopathie die häufigste genetisch-bedingte kardiovaskuläre Erkrankung. Zudem ist davon auszugehen, dass ein großer Teil der Patienten, welche für die hypertrophe Kardiomyopathie verantwortliche Genmutationen tragen, klinisch niemals diagnostiziert wird. Eine Obstruktion der linksventrikulären Ausflussbahn tritt nur bei ca. 25 % der Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie auf.

Man geht davon aus, dass bei etwa der Hälfte aller HCM-Patienten eine familiäre Form der Erkrankung vorliegt (FHCM). Die FHCM wird autosomal-dominant mit inkompletter Penetranz vererbt. Charakteristisch für die HCM ist ein morphologisch und klinisch extrem variables Erscheinungsbild, eine eindeutige Zuordnung von Phänotyp zu einer zugrunde liegenden Mutation, bzw. Mutationen ist nicht möglich [5].

1.1.3 **Genetische Ursachen der hypertrophen Kardiomyopathie**

Über 200 verschiedene Mutationen von 10 verschiedenen Genen, die allesamt Sarkomerproteine codieren, werden für die Erkrankung verantwortlich gemacht. Am häufigsten finden sich Mutationen in den Genen, welche die β -MHC, das Myosin-bindende Protein-C und das cTnI codieren. Weitere Mutationen betreffen das α -Tropomyosin, das Troponin T, die essentiellen und regulatorischen leichten Ketten des Myosins, das kardiale α -Aktin, das Titin und die α -MHC [5]. Trotz dieser Vielfalt an zugrundeliegenden genetischen Veränderungen kann von einer einzigen Krankheitsentität gesprochen werden, da alle diese Mutationen das Sarkomer betreffen und dementsprechend eine ähnliche klinische Symptomatik hervorrufen. Der Effekt, den die verschiedenen Mutationen auf das betroffene Individuum haben, kann sehr unterschiedlich sein. Selbst innerhalb einer Familie mit einer bestimmten Mutation kann es zu stark unterschiedlichen Ausprägungen der Krankheit kommen. Dies legt den Schluss nahe, dass bei der Ausprägung des eigentlichen klinischen Bildes der hypertrophen Kardiomyopathie noch andere Faktoren zum Tragen kommen. Die Mutationen könnten zu einer verminderten Kontraktilität des Myokards führen und in der Folge zu einer kompensatorischen Hypertrophie [6]. Die zugrunde liegenden Mutationen sind bekannt, nicht jedoch die Zwischenschritte, welche letztlich zur Ausbildung des Krankheitsbildes führen. Die großen Unterschiede im klinischen Erscheinungsbild deuten daraufhin, dass weitere Faktoren Einfluss auf die Ausprägung der Erkrankung haben, z.B. genetische Kofaktoren, körperliche Aktivität und Ernährung [4]. Am Beispiel der β -Isoform der schweren Myosinketten (MHC) lässt sich dies gut illustrieren. So ist das Vorliegen von Missense-Mutationen von Phe513Cys, Gly716Arg und Arg719Trp bei der familiären Form der hypertrophen Kardiomyopathie (FHC) beschrieben worden. Die klinischen Auswirkungen dieser Mutationen unterscheiden sich sehr stark voneinander.

1.1.4 **Diagnostik der hypertrophen Kardiomyopathie**

Zum jetzigen Zeitpunkt ist kein genetisches Screeningverfahren in der klinischen Praxis verfügbar, so dass weiterhin der höchste Stellenwert der klinischen Untersuchung, einschließlich Elektrokardiographie und Echokardiographie, der Patienten aus betroffenen Familien zukommt.

Typische echokardiographische Befunde sind die asymmetrische Septumhypertrophie, die systolische anteriore Bewegung des Mitralklappenapparates, die verminderte systolische Septumbewegung, die vorzeitige systolische Schlussbewegung der Aortenklappe und die verminderte Geschwindigkeit der diastolischen Rückschlagbewegung des vorderen Mitralsegels (EF-Slope). Mittels farbkodierter Doppleruntersuchung lassen sich die Druckgradienten quantifizieren und eine invasive intrakardiale Druckmessung meist vermeiden. Differentialdiagnostisch kommen vor allem eine Muskelhypertrophie bei erhöhter Druckbelastung des linken Ventrikels sowie eine Amyloidose in Frage. Eine Myokardbiopsie kann eine definitive Diagnose ermöglichen [7].

1.1.5 **Therapie der hypertrophen Kardiomyopathie**

Eine kurative Behandlung der hypertrophen Kardiomyopathie ist bislang nicht verfügbar. Das hohe Risiko des Auftretens des plötzlichen Herztodes, gerade auch bei jungen Patienten zu vermindern stellt, neben der Verbesserung der Lebensqualität, ein wesentliches Ziel der bisher verfügbaren Behandlungsverfahren dar. Prinzipiell lassen sich die therapeutischen Interventionen in pharmakologische und nicht-pharmakologische Verfahren einteilen .

Bei der Behandlung der HCM steht anfangs die medikamentöse Therapie im Vordergrund. Ziel der hochdosierten Gabe von Betablockern oder Kalziumantagonisten ist die Verbesserung der diastolischen Relaxation und der

sys-tolischen Kon-trak-tion. Als Antiarrhythmika werden vor allem Amiodaron und Disopyramid eingesetzt. Bei lebensbedrohlichen ventrikulären Arrhythmien muss die Im-plan-tation eines im-plan-tierbaren Kar-dio-ver-ter-Defibrillators (ICD) erwogen werden [8]. Zu-dem werden Zwei-kam-mer- Schrittmacher - Systeme unter Pro-gram-mie-rung einer verkürzten Vorhof- Kam-mer-Über-lei-tungszeit mit dem Ziel eingesetzt, den Gra-dien-ten des Aus-flus-straktes zu ver-ringern und gleich-zeitig eine ver-besserte Fül-lung des linken Ven-tri-kels zu er-reichen.

Beim Vorliegen einer hypertrophisch-obstruktiven Kardiomyopathie stehen zudem verschiedene spezifische Verfahren zur Verfügung, deren Ziel die Reduktion der Obstruktion der linksventrikulären Ausflussbahn ist. Als gängige Verfahren sind hier die septale Myektomie und die neuere septale Alkoholablation zu nennen. Bei der septalen Myektomie wird in einem offenen chirurgischen Eingriff eine kleine Menge Muskelgewebe aus dem interventrikulären Septum entfernt. Dieses Verfahren macht eine Sternotomie unter Vollnarkose notwendig und bringt die dementsprechenden Operationsrisiken mit sich. Prinzipiell besteht bei diesem chirurgischen Zugangsweg auch die Möglichkeit zu weiteren operativen Maßnahmen, z.B. der Rekonstruktion der Mitralklappe, in der gleichen Sitzung. Aus der verfügbaren Literatur lassen sich sehr gute Resultate für die Myektomie ableiten: die perioperative Mortalität bei der isolierten septalen Myektomie wird bei ca. 1 % angegeben, bei ca. 90 % der Patienten tritt eine klinische Verbesserung um mindestens eine NYHA-Klasse auf. Dieser Effekt scheint zudem persistierend zu sein, wie follow-up-Studien zeigten. Die Langzeitüberlebensrate der myektomierten HOCM-Patienten ist deutlich höher als die der nicht chirurgisch-behandelten und auch die Wahrscheinlichkeit des plötzlichen Herztodes wird deutlich gemindert [9-16]. Die Alkoholablation ist prinzipiell weniger invasiv, hier wird ein Katheter bis in den ersten Septalast des hypertrophen Septums eingeführt und mittels Injektion von hochprozentigem Alkohol ein kleiner Myokardinfarkt bewirkt. Durch die Nekrose des septalen Myokards kommt es im weiteren Verlauf zu einer Abnahme des Gradienten des Ausflusstraktes

und zu einer Verminderung der septalen Hypertrophie. [17-20]. Alam, Dokainish und Lakkish haben zur Frage der Resultate hierzu 42 bisher veröffentlichte Studien mit insgesamt 2959 Patienten ausgewertet: Der Druckgradient des linksventrikulären Ausflusstraktes war 12 Monate postinterventionell deutlich vermindert (zwischen 65.3 und 15.8 mmHG unter Ruhebedingungen und 125.4 bis 31.5 mmHG unter Belastung). Der Durchmesser des basalen Septums reduzierte sich um 13,9 bis 20,9 mm. Klinisch ergab sich eine Besserung um 1,2 bis 2,9 NYHA-Stufen. Die Frühmortalität (innerhalb der ersten 30 Tage nach Eingriff) lag bei 1,5 %, die Spätmortalität bei 1,5 % [19]. Die bisherige Studienlage lässt keine eindeutige Empfehlung bezüglich der Wahl des Verfahrens zu, beide Verfahren zeigen sehr gute Resultate, wobei die septale Myoektomie eine gewisse Überlegenheit in der Besserung der hämodynamischen Parameter zu besitzen scheint [21-24].

1.2 Die valvuläre Aortenstenose

1.2.1 Definition, klinisches Erscheinungsbild und Allgemeines

Bei der valvulären Aortenstenose liegt eine zu enge Öffnung der Aortenklappe während der Systole vor. Ursächlich können hierfür eine kongenitale Abnormität des Klappenapparates, eine fortschreitende „Verkalkung“ oder Vernarbung des Klappenapparates oder Schäden infolge von entzündlichen Prozessen, z.B. eines rheumatischen Fiebers, sein. Die heutzutage häufigste Ursache der Aortenstenose ist die altersabhängige „Verkalkung“ der Klappensegel., die auch als senile degenerative Stenose bezeichnet. Viele Patienten mit einer Aortenstenose sind symptomfrei, der Verdacht ergibt sich häufig während einer Routineuntersuchung aufgrund eines auffälligen Herzgeräusches. Bei einer höhergradigen Aortenstenose kann es zu folgenden Symptomen kommen: Angina-pectoris, Dyspnoe und Schwindel bis hin zu

synkopalen Ereignissen, besonders bei körperlicher Belastung. Es kommt aufgrund der Obstruktion der linksventrikulären Ausflussbahn zu einem systolischen linksventrikulären Druckanstieg und in der Folge zu einer konzentrischen Hypertrophie des linken Ventrikels. In der weiteren Folge kommt es zu einer verminderten Compliance des linken Ventrikels und damit zu einer Erhöhung des enddiastolischen linkeventrikulären Füllungsdrucks. Die diastolische Koronarperfusion ist vermindert, bei eigentlich erhöhtem Bedarf, so dass es zu subendokardialen Myokardinfarkten und in der Folge zu ischämiebedingten Rhythmusstörungen bis hin zum Kammerflimmern kommen kann. Zudem kann es zu Episoden zerebraler Minderperfusion kommen, die sich in Form von Schwindel oder Synkopen äußern können. Kommt es im Verlauf aufgrund der Zunahme der Hypertrophie zu einer Dekompensation äußert sich diese in einer pulmonalen Stauung bis hin zum biventrikulären Herzversagen [25].

1.2.2 **Epidemiologische Fakten zur valvulären Aortenstenose**

Erkrankungen der Aortenklappe stellen die häufigsten Herzklappenerkrankungen dar. Sklerotische Veränderungen der Aortenklappe ohne hämodynamische Konsequenzen finden sich bei ca. einem Viertel der über 65-jährigen Bevölkerung, eine hämodynamisch relevante valvuläre Aortenstenose bei ca. 2-9 % der über-65-Jährigen. Die Prävalenz nimmt mit höherem Lebensalter deutlich zu. Das ätiologische Spektrum der Erkrankung scheint sich verschoben zu haben. Dies lässt sich anhand einer Studie von Passik et al. zeigen. Die Untersuchungsergebnisse von 646 Patienten, die sich in den Jahren 1981 bis 1985 an der Mayo-Klinik in den USA einer Klappenersatzoperation unterzogen hatten, gingen in die Studie ein. Die relative Häufigkeit der postentzündlichen Aortenstenose ging innerhalb von fünf Jahren von 30 auf 18 Prozent zurück, die der bikuspidalen Anlage der Aortenklappe von 37 auf 33 Prozent. Im gleichen Zeitraum stieg die relative Häufigkeit der degenerativ-

kalzifizierenden Aortenstenose von 30 auf 46 Prozent an. Bei Patienten über 70 Jahren war diese Entwicklung noch wesentlich deutlicher zu Gunsten der degenerativ-kalzifizierenden Aortenstenose nachvollziehbar [26, 27].

Die erworbene Aortenstenose ist eine fortschreitende Erkrankung, bezüglich der Geschwindigkeit der Krankheitsverlaufes und der damit einhergehenden Prognose ist es schwierig, genaue Aussagen zu treffen. In der verfügbaren Literatur werden schnell progrediente ebenso wie langsam progrediente Krankheitsverläufe geschildert, ohne dass diese verschiedenen Verläufe eindeutig zu erklären wären oder es eindeutige Kriterien zur Vorhersage der Progressionsgeschwindigkeit und damit der Prognose gäbe. Das Auftreten von Symptomen geht im Allgemeinen mit einer schlechten Prognose einher. Die Risikofaktoren für das Auftreten der degenerativ-kalzifizierenden Aortenstenose scheinen identisch zu sein mit denen für das Auftreten von arteriosklerotisch bedingte Erkrankungen [28].

1.2.3 **Diagnostik der valvulären Aortenstenose**

Symptome treten im Allgemeinen erst bei einer höhergradigen Aortenstenose auf. In der klinischen Untersuchung können auftreten: ein spindelförmiges Systolikum mit Punctum maximum über 2. Interkostalraum rechts parasternal und Fortleitung in die Karotiden. Je stärker die Stenose ausgeprägt ist umso mehr verlagert sich das Geräuschmaximum in die Spätsystole. Eventuell tritt ein frühsystolisches „Klick“-Geräusch auf, welches jedoch bei höhergradiger Stenose wieder verschwindet. Zu einer Abschwächung des Aortenanteils des zweiten Herztons kommt es bei einer hochgradigen Stenose, der zweite Herzton kann zudem atemabhängig gespalten sein, bei hochgradiger Stenose kann er auch paradox gespalten sein. Beim Vorliegen einer hochgradigen Stenose besteht typischerweise ein Pulsus parvus et tardus, der systolische Druck und die Blutdruckamplitude sind vermindert. Das Elektrokardiogramm kann bei einer mittelgradigen Aortenstenose Zeichen der

Linksherzhypertrophie aufweisen, ein Linkstyp besteht nur bei ca. einem Viertel der Patienten, in der Regel liegt ein Norm- bis Steiltyp vor. Repolarisationsstörungen, z.B. in Form von ST-Streckenveränderungen oder negativen T-Wellen können Ausdruck einer myokardialen Ischämie im Rahmen der Aortenstenose sein. Bei einer hochgradigen Aortenstenose kann es zum Vorhofflimmern kommen. Die oben genannten EKG-Veränderungen besitzen bezüglich der Diagnostik der Aortenstenose eine hohe Sensitivität aber nur sehr geringe Spezifität. Im Röntgenthorax kann eine aortale Herzkonfiguration imponieren.

Das zurzeit in der klinischen Routine am häufigsten eingesetzte diagnostische Verfahren ist die Echokardiographie. Die hiermit ermittelten Daten lassen auch eine näherungsweise Quantifizierung des Stenosegrades zu. Als Beispiel sei hier die Berechnung der Aortenklappenöffnungsfläche mittels Kontinuitätsgleichung angeführt. Alternativ kommt auch die Magnetresonanztomographie zum Einsatz. Dieses Verfahren ermöglicht ebenfalls die Quantifizierung des Stenosegrads. Als Goldstandard gilt weiterhin die Herzkatheteruntersuchung. Der Einsatz dieses Verfahrens ist aufgrund seiner Invasivität limitiert. Vor allem bei unklaren Befunden und bei der Planung eines operativen Klappenersatzes kommt ihm ein hoher Stellenwert zu [29, 30].

1.2.4 **Therapie der valvulären Aortenstenose**

Für asymptomatische Patienten werden engmaschige Kontrollen empfohlen um eine Progression der Erkrankung frühzeitig erkennen zu können. Die Durchführung einer adäquaten antibiotischen Endokarditisprophylaxe wird für alle Aortenstenosepatienten empfohlen, eine begleitende arterielle Hypertonie sollte konsequent behandelt werden. Solange keine klinischen Symptome bestehen, wird keine spezifische Therapie empfohlen. Da für die degenerativ-kalzifizierende Aortenstenose die gleichen Risikofaktoren wie für arteriosklerotisch bedingte

Erkrankungen angeschuldigt werden, wird der Nutzen einer lipidsenkenden Behandlung mit Statinen diskutiert. Ein Beleg für diese therapeutische Strategie steht noch aus. Für symptomatische Patienten mit einer schweren Aortenstenose wird die Klappenersatzoperation empfohlen. Liegt eine Aortenstenose ohne Symptome vor, kann unter bestimmten Bedingungen auch bereits die Klappenersatzoperation indiziert sein, beziehungsweise empfohlen werden, zum Beispiel wenn ohnehin ein chirurgischer Eingriff am Herzen durchgeführt werden muss und eine rasche Progredienz der Aortenstenose anzunehmen ist. Wird dieser Eingriff früh nach dem Einsetzen von Symptomen durchgeführt, führt er zu einer signifikanten Verbesserung der Überlebensrate. Die perioperative Mortalität bei der isolierten Aortenklappenersatzoperation liegt bei ca. 3-4%. Als alternatives Verfahren kommt die aortale Ballon-Valvotomie in Betracht, stellt aber bei älteren Erwachsenen nur sehr selten das Verfahren der Wahl dar. Die Rate an schweren Komplikationen ist mit ca. 10% recht hoch, selten wird eine wesentliche Besserung der Stenose erreicht und häufig kommt es auch dann schnell wieder zu einer weiteren Progredienz der Erkrankung. Bei jüngeren Patienten hat dieses Verfahren einen höheren Stellenwert [31].

1.3 Das Myosinmolekül

Das Myosinmolekül der Vertebraten ist ein 520 kDa schweres Hexamer, bestehend aus zwei schweren Myosinketten (MHC; Myosin Heavy Chain) von jeweils ca. 220 kDa und zwei Paaren von leichten Ketten (MLC; Myosin Light Chain) von jeweils ca. 20kDa. Jede MHC Untereinheit besteht aus zwei verschiedenen Domänen: am N-Terminus sitzt die globuläre Kopf-Domäne, am C-Terminus bilden die beiden umeinander gewundenen α -Helix-Domänen der korrespondierenden MHC-Untereinheiten den Stabteil des Moleküls in Form einer „coiled coil“. Die N-terminale Kopf-Domäne besteht aus einer Motor-Einheit, welche sowohl die

nukleotidbindende Tasche, als auch die aktinbindende Tasche enthält und einer regulatorischen Einheit in Form einer α -Helix, welche die leichten Ketten nicht-kovalent bindet und die Verbindung zum Stabteil herstellt [32, 33]. Durch proteolytische Andauung kann man das Myosinmolekül in die beiden Domänen aufspalten, wobei das proteolytische Fragment, welches die Kopf-Domäne enthält, die Bezeichnung Subfragment-1 (S1) erhält.

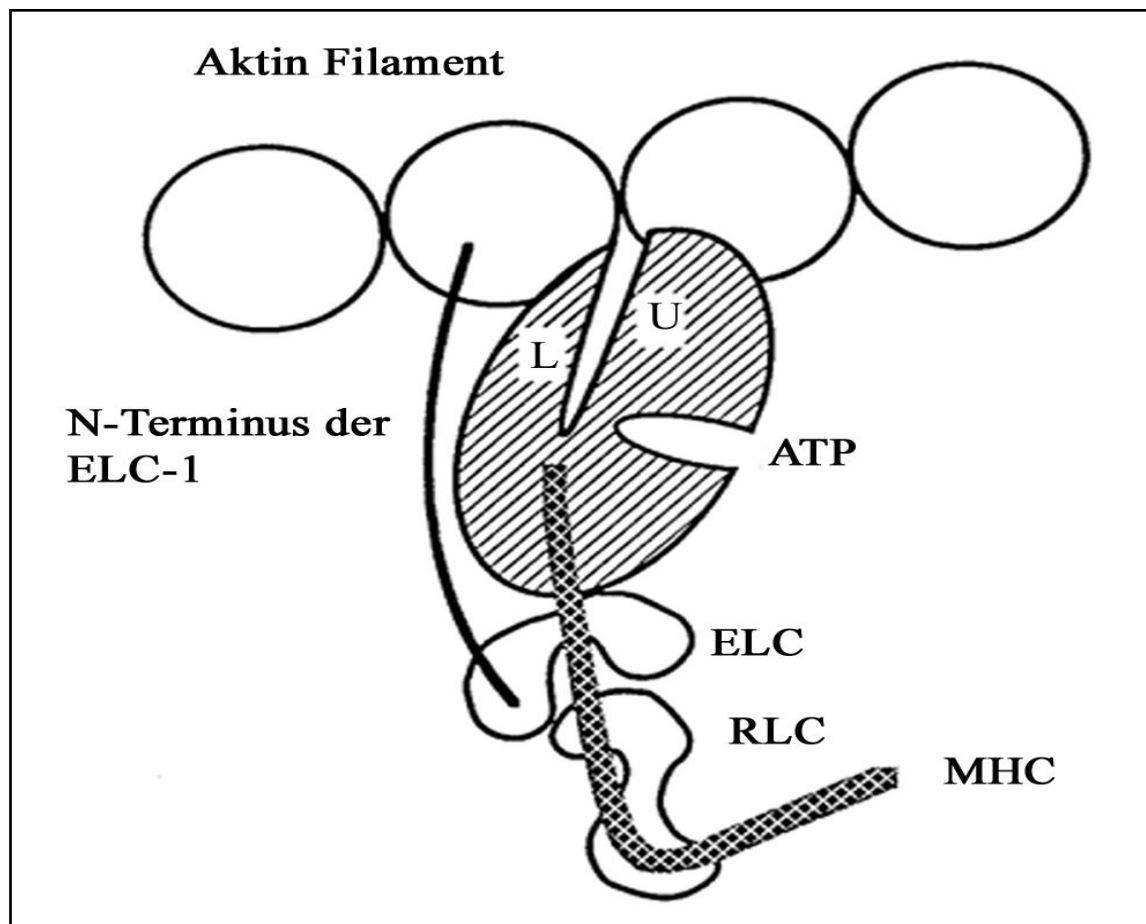


Abbildung 1: Struktur des Myosinmoleküls nach M.C. Schaub et al. ELC- 1 essentielle leichte Myosinkette vom Typ 1; ELC essentielle leichte Myosinkette; RLC regulatorische leichte Myosinkette; MHC schwere Myosinkette, ATP Adenosinriphosphat; L unterer Anteil; U oberer Anteil

1.4 Die Muskelkontraktion

1.4.1 Der Querbrückenzyklus

Unter Querbrückenzyklus versteht man die zyklische Interaktion der Kopfdomänen des Myosinfilaments mit dem Aktinfilament. Hierbei kommt es zur Kraftentwicklung und zur Verkürzung des Sarkomers. Während der Kontraktion bindet die Kopfdomäne des Myosins an das Aktin, während die eigentliche Bewegung im Bereich der C-terminalen Bindungsstelle für die leichten Ketten stattfindet [34-36]. ATP dissoziiert den Aktomyosinkomplex (in 45°-Konformation) zu Aktin + Myosin-ATP, was zur Rückstellung in die 90°-Konformation führt. Die Dissoziation des Aktomyosinkomplexes durch ATP ist reversibel. Der Myosin-ATP-Komplex, wie auch der Myosin-ADP-Pi-Komplex, stehen im Gleichgewicht mit den Aktomyosin-Komplexen. Zur Hydrolyse von ATP kommt es nicht nur im dissoziierten Myosin-ATP Zustand, sondern auch im an das Aktin gebundenen Myosin-ATP-Komplex [37, 38]. Daher geht man heute von der Existenz zweier Gruppen von Querbrückenzyklen aus. Die Gruppe mit hoher Aktinaffinität stellt die krafterzeugende, die mit niedriger Aktinaffinität die nichtkrafterzeugende Gruppe dar. Die Freisetzung von Pi und die Konformationsänderung der Querbrücke in die 45° Stellung stellt den Übergang vom nichtkrafterzeugenden zum krafterzeugenden Zustand dar [39]. Durch unterschiedliche Varianten der Zusammensetzung des Myosinmoleküls kommt es zu Veränderungen beim Querbrückenzyklus, die sich in veränderten physiologischen Parametern der Muskelkontraktion niederschlagen können.

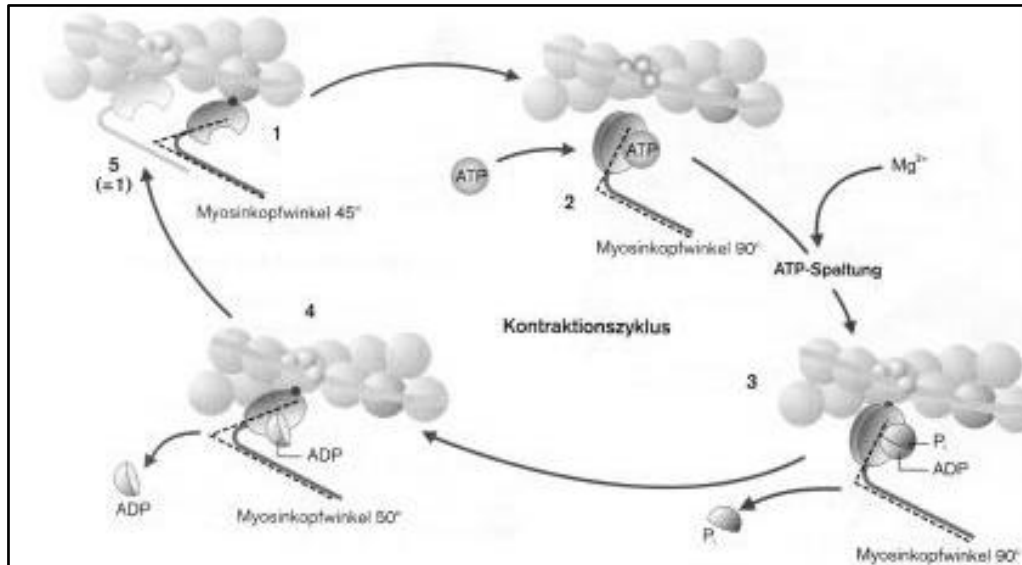


Abbildung 2: Querbrückenzyklus nach Schmidt, R.F. und Thews, G. ATP Adenosintri-phosphat; ADP Adenosindiphosphat; P_i Phosphat

1.4.2 Die Rolle des Troponinkomplexes bei der Kontraktion

Ca^{2+} -Ionen bewirken über ein besonderes Kalziumrezeptorprotein, der Kalzium-bindenden Untereinheit des Troponin (TnC), die Aktivierung der Aktomyosin-ATPase. Der kardiale Troponin-Komplex besteht aus einer Tropomyosin-bindenden Einheit (cTnT), einer Kalzium-bindenden Einheit (cTnC) und einer inhibitorischen Einheit (cTnI). Während der Diastole ist das TnI mit zwei Domänen, von denen eine inhibitorisch wirkt, fest an den Aktin-Tropomyosin Komplex gebunden, was die Ausbildung von kraftgenerierenden Querbrückenzyklen verhindert [3]. Nach dem Steric-Bloc Modell wird diese Hemmung noch verstärkt durch das Tropomyosin, welches die Anheftung der Myosinquerbrücken an das Aktin verhindern soll [40]. Dieses Modell erfuhr im Laufe der Zeit einige Modifikationen. Chalovich et al. zeigten 1981, dass der Tropomyosin-Troponin Komplex keinen Einfluss auf die Bindung des Myosin-S1-ATP Komplexes an das dünne Filament hat [41]. Während der Systole bindet Ca^{2+} an die regulatorische Einheit des cTnC und induziert eine Affinitätserhöhung zwischen dem COOH-Terminus des cTnI und dem NH₂-

Terminus. Das cTnI bewegt sich nun auf dem dünnen Filament zu einer neuen Position und gibt seine Interaktion mit dem Aktin auf. Die Interaktion zwischen dem COOH-Terminus des cTnT und dem Tm ist nun schwächer, das Tm bewegt sich nun ebenso wie die Subdomänen des Aktins zum dünnen Filament. Die Proteine der dünnen Filamente gehen nun vom blockierten Zustand in den für den Querbrückenzyklus bereiten Zustand über.

1.4.3 **Die Rolle der Phosphorylierung der inhibitorischen Einheit des kardialen Troponin I (cTnI) bei der Kontraktion**

Das cTnI besitzt zwei Orte, an denen es durch die Phosphorylasekinase (PKA) phosphoryliert werden kann. Sie liegen beim Ser-22 und Ser-23 in der N-terminalen Verlängerung, die nur die kardiale Variante besitzt. Es gibt deutliche Hinweise, dass die Phosphorylierung des cTnI eine wichtige Rolle bei der Anpassung des Herzens an verschiedene hämodynamische Anforderungen spielen könnte. Robertson et al. konnten 1982 in-vitro zeigen, dass die Kalziumempfindlichkeit der Myofilamente deutlich reduziert war, wenn das TnI durch die PKA phosphoryliert worden war [42].

Solaro und van Eyk gehen davon aus, dass die Phosphorylierung des cTnI verantwortlich für den relaxierenden Effekt β -adrenerger Stimulation am Herzen sei [43]. Diese Annahme wird unterstützt von Versuchsergebnissen, welche zeigen, dass es bei zunehmender Phosphorylierung des cTnI zu einer erhöhten Dissoziationsrate des Ca^{2+} von der regulatorischen Einheit des cTnC kommt [42]. Hierdurch kommt es als hauptsächlicher Effekt zu einer deutlichen Verkürzung der Zeit bis zum Erreichen der Halb-Relaxation des Sarkomers (von 135,8 ms auf 97,6 ms im Rinderherzen), was die erhöhte Relaxationsrate bei zunehmender TnI-Phosphorylierung erklären könnte.

Hieraus resultiert eine erhöhte Rate von Querbrückenzyklen und somit ein inotroper Effekt. Die Zunahme des Schlagvolumens des Herzens unter β -adrenerger Stimulation lässt sich über diesen Mechanismus erklären. In-vitro Studien mit gehäuteten Fasern von Nagerherzen zeigten, dass ein PKA-induziertes Phosphorylierungsniveau der cTnI und cTnT zu einer Erhöhung der Maximalkraft und der Leistung der Fasern führte [44]. Im Ventrikelmyokard von Herzen im Stadium des Pumpversagens hatte man einen geringeren Phosphorylierungsgrad des cTnI als in der normalen Vergleichsgruppe gefunden [45]. Bislang gibt es keine Studie zum Phosphorylierungsgrad des cTnI in hypertrophierten Herzen ohne Pumpversagen.

1.5 Die leichten Myosinketten (MLC)

Es existieren zwei Unterfamilien der leichten Myosinketten: die regulatorischen leichten Ketten (RLC; Regulatory Light Chain), auch als leichte Myosinketten vom Typ 2 bezeichnet (MLC-2; Myosin Light Chain 2), und die essentiellen leichten Ketten (ELC; Essential Light Chain;), auch als leichte Myosinketten vom Typ 1 bezeichnet (MLC-1). Von jedem dieser Typen gibt es jeweils eine für den Vorhof (Atrial Light Chain 1 und 2; ALC-1 und 2) und eine für die Ventrikel charakteristische Variante (Ventricular Light Chain 1 und 2; VLC-1 und 2).

1.5.1 Die essentiellen leichten Myosinketten (ELC, MLC-1)

Die Bezeichnung essentiell kam durch die ursprüngliche Annahme zustande, die leichten Myosinketten vom Typ 1 (ELC oder MLC-1) seien essentiell für die hydrolytische Aktivität des Myosins. Diese Annahme erwies sich als irrig [46, 47]. Alternativ werden sie auch als alkali-leichte Myosinketten bezeichnet, da sie durch Schaffung eines alkalischen Milieus vom Myosin abgelöst werden können. Die atriale Isoform der essentiellen leichten Myosinkette (atrial light chain 1; ALC-1) ist

identisch mit der embryonalen ELC1emb, die in fetaler Skelettmuskulatur und in fetalem ventrikulärem Herzmuskelgewebe exprimiert wird [48].

Man geht davon aus, dass alle essentiellen leichten Ketten mit Aktin in ähnlicher Weise interagieren. Miligan konnte 1996 zeigen, dass die N-terminalen Aminosäurereste der essentiellen leichten Myosinketten das Myosinköpfchen überbrücken und mit dem nächsten Aktinmonomer interagieren können [49]. Die ELC besitzt am N-Terminus ca. 30 Aminosäurereste mehr als die RLC, von denen einige positiv oder negativ geladen sind. Hier besteht ein sehr wichtiger Unterschied zwischen der atrialen (ALC-1) und der ventrikulären (VLC-1) Isoform der essentiellen leichten Kette. Die humane ALC-1 besitzt in diesem Bereich aufgrund einer leicht veränderten Aminosäurerestesequenz zwei Ladungen weniger als die VLC-1 [50]. Morano und Haase zeigten 1997 in einem in-vitro Essay, dass ein Dekapeptid, bestehend aus den Aminosäureresten 4 bis 13 der humanen ALC-1 mit der Hälfte der Affinität seines korrespondierenden ventrikulären Pendants (VLC-1) an das Aktin bindet [51]. Dies passt zu der Beobachtung, dass ventrikuläre Herzmuskelfasern, die die ALC-1 enthalten, eine schnellere Kinetik der Querbrückenzyklen aufweisen als die, welche die VLC-1 enthalten.

Die atriale Isoform der essentiellen leichten Myosinkette (ALC-1) findet man in menschlichen Embryos in großer Menge in der Skelettmuskulatur und im gesamten Herzen. Man geht davon aus, dass sie im Ventrikelmyokard des gesunden Erwachsenen nicht vorkommt.

In mehreren Studien wurden Abweichungen von diesem Muster gefunden. Morano et al. untersuchten Ventrikelmyokard von Herzen im Stadium des Pumpversagens (NYHA IV) aufgrund einer ischämischen oder dilatativen Kardiomyopathie und fanden in 72 % der Fälle die ALC-1 (zwischen 2,4 und 10,3% der Gesamt-MLC-1) im Ventrikelmyokard vor [52]. Sie konnten außerdem eine signifikante positive Korrelation zwischen der ALC-1-Expression und der Kalziumsensitivität der

Herzmuskelfasern nachweisen. In Myokardfasern des rechten Ventrikels von Patienten mit Fallot'scher Tetralogie, double-outlet-right-ventricle und infundibularer Pulmonalisstenose wurde eine positive Korrelation zwischen der ALC-1-Expression und der maximalen Verkürzungsgeschwindigkeit der Muskelfasern gefunden [53].

Bei Patienten mit Aortenklappenfehler fiel der ALC-1-Anteil in Myokard des überlasteten linken Ventrikels nach dem Aortenklappenersatz und der Normalisierung der hämodynamischen Parameter deutlich ab [54].

1.5.2 **Die regulatorischen leichten Myosinketten (RLC, MLC-2)**

Die regulatorischen leichten Myosinketten (RLC, regulatory light chains), auch als MLC-2 bezeichnet, können im Gegensatz zu den essentiellen leichten Ketten reversibel phosphoryliert werden. Sie werden daher auch als phosphorylierbare leichte Ketten bezeichnet (PLC; phosphorylable light chain) [55]. Ihre Phosphorylierung bewirkt im glatten Muskel eine Triggerung der kontraktilen Aktivität, im Herzmuskelpräparat [56] und im Skelettmuskel [57] erhöht ihre Phosphorylierung die Kraftentwicklung. Die MLC-2 des Herzmuskels wird durch ein spezifisches Enzymsystem, genannt MLCK (Myosin Light Chain Kinase), welches aus einer MLC-Phosphatase und einer Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Kinase besteht, reversibel phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung kommt es zu einer Veränderungen im Querbrückenzyklus: Im gestreiften Muskel steigt die Anheftungsrate (f_{app}) [2] der Querbrücken und es kommt zu einem Kalzium-sensitivierenden Effekt auf die isometrische Spannungs-Erzeugung [56, 58]. Davis et al. zeigten, dass die für die Auswurfleistung des Herzens sehr wichtige Torsionsbewegung durch einen räumlichen Gradienten in der Phosphorylierung der regulatorischen leichten Myosinketten ermöglicht wird [59].

Im Ventrikelmyokard des Schweines führt eine erhöhter Phosphorylierungsgrad der MLC-2 in-vitro zu einer reversiblen Erhöhung der maximalen Kraftentwicklung bei submaximaler Ca^{2+} -Konzentration, bei maximaler Ca^{2+} -Konzentration jedoch zu keiner Änderung [56]. Im der Skelettmuskulatur des Hasens kommt es bei submaximaler Ca^{2+} -Konzentration zu einer Erhöhung der isometrischen Kraftentwicklung der Fasern [57].

1.6 Die schweren Myosinketten (MHC)

Zwei Formen der schweren Myosinketten (Myosin Heavy Chain; MHC), genannt α - und β -MHC kommen im menschlichen Herzen vor. Unter normalen Bedingungen kommt im menschlichen Herzen die α -MHC nur im Vorhof vor, die β -MHC ist fast ausschliesslich auf die Ventrikel begrenzt.

Untersuchungen an Rattenherzen, deren schwere Myosinketten ebenfalls in der α - oder β -Isoform vorkommen, weisen auf eine mögliche Rolle bei der Genese der myokardialen Hypertrophie hin. Aus α -MHC bestehendes Myosin des Rattenherzens zeigt eine höhere ATPase-Aktivität als β -MHC enthaltendes Myosin, was zu einer höheren Kontraktionsgeschwindigkeit α -MHC exprimierender Rattenherzen führt [60]. Das Verhältnis von α -MHC zu β -MHC-Expression ist abhängig von der Spezies und verändert sich sehr stark unter pathologischen Bedingungen wie arterieller Hypertension [61], Hypothyreoidismus [62] und nicht zuletzt Herzversagen [63, 64]. Im Rattenventrikel führen solche Bedingungen zu einer verminderten Expression der α -MHC mit konkordant vermehrter Expression der β -MHC [61, 62], wohingegen Training zu einer Erhöhung des Anteils der α -MHC führt, der normalerweise im Rattenherz über 90% beträgt [65]. Am menschlichen Herzen wurden ähnliche Veränderungen gefunden. Myokardproben des linken Ventrikels von zur Transplantation angemeldeten Patienten mit Herzinsuffizienz im Endstadium

zeigten nur noch eine relative Expression der α -MHC mRNA von $\approx 2\%$ im Vergleich zu $\approx 30\%$ bei Herzen ohne Pumpversagen [66, 67].

2 Fragestellung

Um weitere Hinweise auf die Rolle der obengenannten Veränderungen bei der Myokardhypertrophie zu erhalten, wurden die folgenden Fragestellungen erarbeitet: Welche der oben genannten Veränderungen lassen sich an einem großen, gut evaluierten Patientenkollektiv finden? Sind diese Veränderungen abhängig von der Ursache der Hypertrophie, d.h. gibt es signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen zu Herzhypertrophie führenden Grunderkrankungen? Wie verhalten sich diese Veränderungen zu den klinischen Daten der Patienten? Gibt es Korrelationen ?

3 Methoden

3.1 Patientenpopulation

Das untersuchte Myokardgewebe stammt von drei verschiedenen Gruppen (insgesamt 38 Proben). 19 Gewebeproben stammen aus dem linksventrikulären Ausflusstrakt von Patienten, dies sich aufgrund einer hypertrophisch-obstruktiven Kardiomyopathie (HOCM) mit einer schweren Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstraktes einer transaortalen subvalvulären Myektomie unterzogen hatten. 13 Gewebeproben stammten aus dem linksventrikulären Ausflusstrakt von Patienten, die sich aufgrund einer Aortenstenose (AS) einer Aortenklappenersatzoperation unterzogen hatten. Die klinischen Daten der Patienten wurden mittels körperlicher Untersuchung, Elektrokardiographie (EKG), Echokardiographie und Herzkatheteruntersuchungen erhoben. Alle Patienten hatte eine normale

Ejektionsfraktion. 6 der Proben stammten aus dem interventrikulären Septum von gesunden Spenderherzen, die aufgrund von technischen Problemen nicht transplantiert werden konnten. Sämtliche Proben sind unmittelbar nach ihrer Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren worden.

3.2 **Prinzip der 2-dimensionalen Polyacrylamidgel-Elektrophorese (2D-PAGE)**

3.2.1 **1. Dimension: isoelektrische Fokussierung (IEF)**

Mit der Methode der 2-dimensionalen Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (2-D-PAGE) wurde beim menschlichen Herzmuskel zum einen der Phosphorylierungsgrad des kardialen Troponin I (cTnI) wie auch die Expression der beiden Isoformen (atriale und ventrikuläre, ALC-1 und VLC-1) der alkalischen leichten Myosinketten vom Typ 1 (MLC-1) untersucht. Die Methode besteht aus der isoelektrischer Fokussierung (IEF) als erster Dimension und der anschließenden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) als zweiter Dimension. In der ersten Dimension findet die Auftrennung der Proteine abhängig von ihrem isoelektrischen Punkt in einem Gelzylinder statt, in dem ein definierter pH-Gradient herrscht. Die verwendeten Trägerampholyte bilden nach Anlegen von Spannung zeitlich begrenzt einen pH-Gradienten in dem Gelzylinder aus. Die aufzutrennenden Proteine durchwandern die verschiedenen Bereiche des pH-Gradienten. In dem pH-Bereich des Gels, der ihrem isoelektrischen Punkt entspricht, sind dann keine auf das Protein wirksamen Ladungen vorhanden, das Protein verbleibt folglich an dieser Stelle. Nun kann als Zwischenschritt, wenn gewünscht, die sogenannte Equilibrierung erfolgen. Hierbei werden mittels Mercaptoethanol oder Dithiotreitol Disulfidbrücken in den Proteinen beseitigt und die Proteine draufhin mit Natriumdodecylsulfat beladen. Dieses negativ-geladene Detergenz führt zur völligen

Entfaltung des Proteins, da es sich an die Proteine anheften und die, an die anderen Proteeinmoleküle angehefteten, anderen SDS-Moleküle abstoßen kann. Durch die negative Ladung der SDS-Moleküle spielt zudem die Eigenladung nun keine Rolle mehr. Der Vorteil der Equilibrierung liegt in der Verhinderung des Nachziehens von Proteinen, jedoch kommt durch diesen Vorgang von schätzungsweise 5-25% der Proteinmenge [68]. Insbesondere die Proteine, welche während der ersten Dimension noch nicht adäquat im Gelzylinder gewandert sind gehen verloren. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten 2-dimensionalen Gelelektrophoresen wurde auf den Equilibrierungsschritt verzichtet.

3.2.2 **2. Dimension: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Der in der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung (IEF), erstellte Gelzylinder muss nun vorsichtig und ohne Luftblasen auf die Oberkante des Natriumdodecylsulfatgels übertragen werden. Im elektrischen Feld wandern die von negativ geladenen Natriumdodecylsulfatmolekülen umgebenen Proteine in Richtung der Anode. Abhängig von ihrer Molekülgröße durchwandern sie das Gel mehr oder weniger schnell. Sobald die ersten Moleküle den Unterrand des Gels (erkennbar an dem blauen Farbstreifen) erreicht haben, wird der Lauf gestoppt. Auf dem Gel stellen sich nun verschiedene, deutlich voneinander abgrenzbare Spots dar, die für jeweils ein bestimmtes Protein stellen. Die Position auf der horizontalen Achse des Gels hängt vom isoelektrischen Punkt des Proteins ab, die auf der senkrechten Achse von der Molekülgröße. Eine eindeutige Einordnung ist aufgrund dieser beiden Größen möglich.

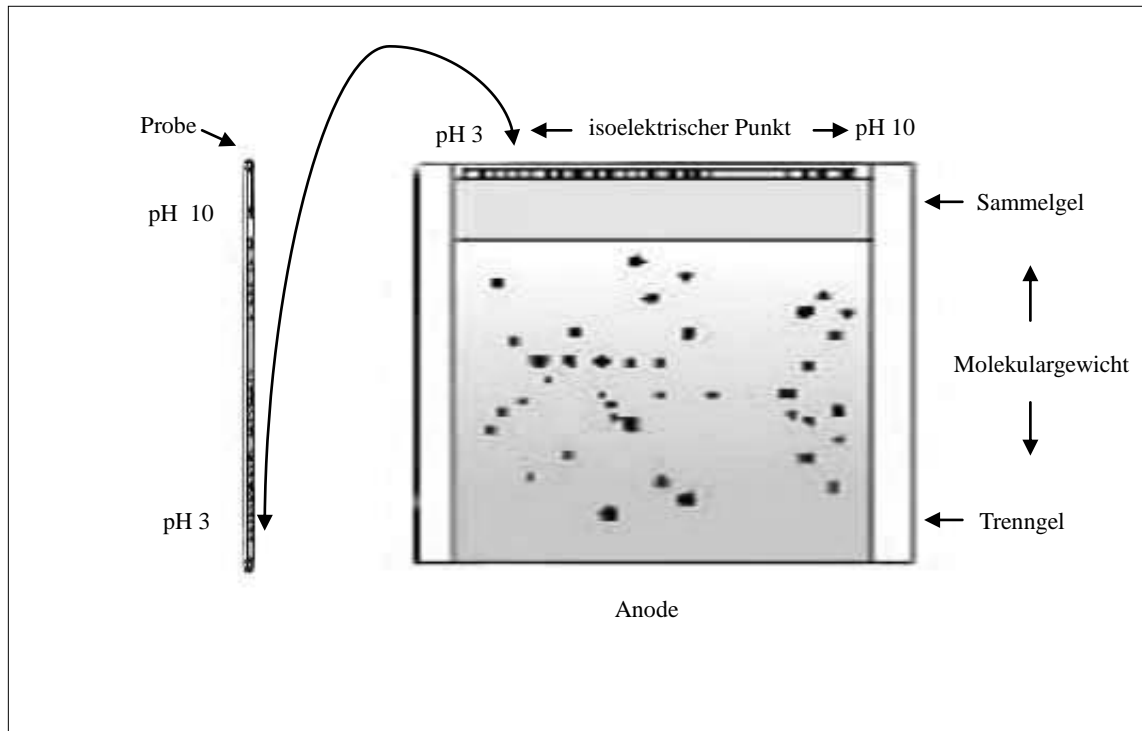


Abbildung 3: Schematische Darstellung der 2-dimensionalen-Sodiumdodecylphosphat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese modifiziert nach C. Kasper [69] und J. Klose [70]. In der 1. Dimension der isoelektrischen Fokussierung findet die Auftrennung der Proteine abhängig vom isoelektrischen Punkt statt, im Gelzylinder herrscht ein pH-Gradient von circa 3 bis 10. Nach dem Lauf wird dieser Gelzylinder auf die Oberkante des Polyacrylamidgels transferiert. Nun findet als 2. Dimension die weitere Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht statt. Die y-Achse des fertigen Ges zeigt somit das Molekulargewicht des abgebildeten Proteins an, die x-Achse seinen isoelektrischen Punkt.

3.3 Bestimmung des Phosphorylierungsgrades des kardialen Troponin I (cTnI) mittels 2-dimensionaler Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE)

3.3.1 Aufbereitung der Proben

Sämtliche hierbei benutzten Werkzeuge wurden mittels flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Von den gefrorenen Gewebeproben wurden mit dem Skalpell kleine Mengen entnommen und zusammen mit flüssigem Stickstoff im Mörser mechanisch zerkleinert. Zu dem zerstoßenen Gewebe wurde 1 ml eiskalter 15%-iger Trichloressigsäure hinzugegeben und das Gemisch für ca. 15 Minuten auf Eis stehengelassen. Der Überstand wurde für 10 Minuten bei 10000 rpm abzentrifugiert und verworfen. Das Pellet wurde durch fünf Waschungen mit einem Äther/ Äthanol - Gemisch (80/20) neutralisiert und danach in der Vakuumpumpe getrocknet. Direkt vor dem Lauf wurde das getrocknete Gewebepulver in einem DTT und Ampholine (Pharmalyte 4 - 6,5)-haltigen Probenpuffer homogenisiert (6µl Puffer auf 1µg Gewebe). Für 1 Gelkapillare wurden ca. 60 µl der Probenlösung benötigt.

3.3.2 1. Dimension: isoelektrische Fokussierung (IEF)

Mittels der IEF werden Proteine ihrem isoelektrischen Punkt entsprechend aufgetrennt. Die im Gel enthaltenen Ampholine (Pharmalyte) bilden beim Anlegen von Spannung einen pH-Gradienten aus, so dass die aufgetragenen Proteine im Gel nur so weit laufen, bis sie ihren isoelektrischen Punkt erreicht haben und damit ungeladen sind. Als Gelröhrchen wurden 12,5 cm lange Mikrokapillaren mit einem Innendurchmesser von 1 mm verwendet. Die Zusammensetzung der Gellösung ist in der Tabelle beschrieben. Der Harnstoff wurde durch Schütteln bei Handwärme gelöst.

Nach Zugabe von APS und Temed zur Polymerisation wurden die Kapillaren mittels eines speziellen Gelloaders und einer Spritze auf eine Höhe von 7,5 cm beladen. Nach ca. 1 Stunde waren sie polymerisiert. Jede Kapillare wurde mit einer Hamiltonpipette mit ca. 60 µl der Probenlösung befüllt. Der Lauf fand für ca. 3 Stunden bei 400 Volt Spannung statt.

Acrylamid/bis-Acrylamid (28,38%/1,62%)	0,665 ml
Aqua dest.	1,5 ml
Pharmalyte 3-10	0,25 ml
10% Triton	0,5 ml
Urea	2,75 g
APS 10%	40 µl
Temed	3,5µl

Tabelle 1: Zusammensetzung der Gellösung für die isoelektrische Fokussierung (IEF) zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrades des kardialen Troponin I (cTnI)

Urea	5,5 g
1 M Tris, pH 7,5	100 µl
Bromphenolblau 0,2%	200 µl
Aqua dest.	auf 10 ml auffüllen

Tabelle 2: Zusammensetzung des Probenpuffers (10ml) für die isoelektrische Fokussierung (IEF) zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrades des kardialen Troponin I (cTnI)

Kurz vor Gebrauch wurden zu 1 ml hinzugegeben:

10 mM DTT 1,54 mg

Pharmalyte 4,5-5,4 16 µl

Pharmalyte 3-10 4 µl

3.3.3 2. Dimension: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zwei 14,5cm x 15cm große Glasplatten im Abstand von 2mm wurden zu drei Vierteln mit dem Trenngel befüllt und mit destilliertem Wasser überschichtet. Nach der Polymerisation (nach etwa 30 Minuten) wurde der verbleibende Raum mit dem Trenngel aufgefüllt und wieder bis zur Polymerisation gewartet. Mit Hilfe eines geeigneten Stempels (z.B. lange, abgestumpfte Kanüle mit großem Durchmesser) wurde der zylinderförmige Gelstreifen aus der Kapillare auf das Sammelgel gedrückt und ein ca. 0,5 cm langes Stück des Markergelzylinders hinzugefügt. Beides wurde mit Agaroselösung fixiert, durch welche das Wegschwimmen der Gelzylinder verhindert wurde. Die Agaroselösung wurde kurz vor Verwendung aufgeköcht. Der Vorlauf fand für 20 Minuten bei 20 mA pro Minigel-Kammer bei konstanter Spannung statt, der Hauptlauf für 1 Stunde und 30 Minuten bei 30 mA und konstanter Spannung.

Daraufhin wurden die Gele über Nacht unter kontinuierlichem Schütteln in 0,1 %-iger Coomassie-Lösung entfärbt. Die Coomassie-Lösung bestand aus 10% Essigsäure, 30% Methanol und 0,1% Serva Blau R250. Am nächsten Tag wurde das Gel in einer Entfärbelösung, die 5 % Methanol und 15% Essigsäure enthielt entfärbt. Die Entfärbelösung wurde mehrfach gewechselt.

Tris	24,2 g	⇒ 25 mM
Glycin	115,2 g	⇒ 192 mM
SDS	8 g	⇒ 0,1%
Aqua dest.	ad 1 Liter	
Vor Gebrauch 1: 8 mit dest. Wasser verdünnen		

Tabelle 3: Zusammensetzung des Laufpuffers (8-fach konzentriert) zur Durchführung der 2. Dimension (SDS-PAGE) zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrades des kardialen Troponin I (cTnI)

	Trenngel	Sammelgel
Acylamid/ bis-Acrylamid (30%/0,8%)	6,15 ml	0,5 ml
Glycerol + Aqua dest. 1:1	0,75 ml	---
1,5 M Tris (pH 8,8)	3,75 ml	---
0,5 M Tris (pH 6,7)	---	0,625 ml
Aqua dest.	4,2 ml	3,77 ml
TEMED	7,5 ml	5 µl
APS	75 µl	50 µl

Tabelle 4: Gelzusammensetzung (für 2 Gele) zur Durchführung der 2. Dimension (SDS-PAGE) zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrades des kardialen Troponin I (cTnI)

Acylamid/ bis-Acrylamid (28,38%/1,62%)	133 µl
Aqua dest.	300 µl
Pharmalyte 3-10	50 µl
Triton 10%	100 µl
Urea	500 mg
TEMED	0,7 µl
APS 10%	8 µl

Tabelle 5: Zusammensetzung der Markerlösung zur Durchführung der 2. Dimension (SDS-PAGE) zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrades des kardialen Troponin I (cTnI) Die Markerlösung wurde mit Hilfe einer 5 ml Spritze auf mehrere Glaskapillaren aufgezogen. Nach der Polymerisation wurden die Gelzylinder mit einem geeigneten Stempel ausgedrückt und daraufhin mit dem Skalpell in ca. 0,5 cm große Teile zerschnitten, die bei -80°C eingefroren wurden.

Agarose	35 mg
DTT	7,5 mg
Bromphenolblau	Spatelspitze
0,5 M Tris/SDS (pH 6,8)	5 ml

Tabelle 6: Zusammensetzung der 0,7%-igen Agaroselösung um das Abschwimmen der Gelzylinder während der Durchführung der 2. Dimension (SDS-PAGE) zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrades des kardialen Troponin I (cTnI) zu verhindern

3.4 **Bestimmung der Expression der atrialen leichten Kette vom Typ 1 (ALC-1) mittels 2-dimensionaler Polyacrylamidgel-Elektrophorese (2D-PAGE)**

3.4.1 **Aufbereitung der Proben**

Die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefrorenen Gewebebröckchen wurden unter Zugabe von flüssigem Stickstoff im Mörser mechanisch zerkleinert und das hierbei entstandene Gewebepulver mit dem Probenpuffer verdünnt und homogenisiert (ca. $6\text{ }\mu\text{l}$ Probenpuffer auf $1\text{ }\mu\text{g}$ Gewebe) und danach der Überstand abzentrifugiert. Für die Beladung einer Gelkapillare wurden $60\text{ }\mu\text{l}$ des Probenlösung benötigt.

3.4.2 **1. Dimension: isoelektrische Fokussierung (IEF)**

Die Erstellung erfolgt wie unter 3.3.4 beschrieben, nur die Zusammensetzung des Gels und der Puffer ist eine andere. Die Kapillaren wurden mit ca. $60\text{ }\mu\text{l}$ der Probenlösung beladen. Die Auftrennung fand entweder über Nacht bei konstanten 600 Volt Spannung statt.

Acrylamid/bis-Acrylamid (28,38%/1,62%)	0,665 ml
Aqua dest.	1,5 ml
Pharmalyte 3-10	0,25 ml
10% Triton	0,5 ml
Urea	2,75 g
APS 10%	40 µl
TEMED	3,5 µl

Tabelle 7: Zusammensetzung der Gellösung für die isoelektrische Fokussierung (IEF) zur Bestimmung der Expression der atrialen leichten Kette vom Typ 1 (ALC-1)

Urea	5,5 g
1 M Tris, pH 7,5	100 µl
Bromphenolblau 0,2%	200 µl
Aqua dest.	auf 10 ml

Tabelle 8: Zusammensetzung des Probenpuffers (10ml) zur Durchführung der isoelektrischen Fokussierung (IEF) zur Bestimmung der Expression der atrialen leichten Kette vom Typ 1 (ALC-1)

Kurz vor Gebrauch wurden zu 1ml hinzugegeben:

10 mM DTT 1,54 mg

Pharmalyte 4,5-5,4 20 µl

3.4.3 **2. Dimension: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Die 2. Dimension und die anschließende Coomassie-Färbung wurde wie unter 3.3.3. beschrieben durchgeführt.

3.5 Bestimmung der Isoformen der schweren Myosinketten (MHC) mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

3.5.1 Aufbereitung der Proben

Die Gewebeproben wurden in der unten genannten Pufferlösung homogenisiert und dann bei 900g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Dann wurde zu jeder Probe Lämmli-Puffer hinzugegeben. Der Proteingehalt wurde photometrisch bestimmt und lag bei 0,25-1µg Protein pro Probe.

3.5.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung der schweren Myosinketten (MHC)

Die nach der unten genannten Rezeptur erstellten Gele enthielten jeweils 15 Kammern, die mit jeweils 3µl der Probenlösung (enthielt 0,25 – 1µgProtein) beladen wurden.

Die Auftrennung fand bei konstanten 200 Volt Spannung über eine Laufzeit von ca. 30 Stunden statt. Daraufhin wurden die Gele silbergefärbt.

	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid/ bis-Acrylamid (30%/0,8%)	15 ml	4 ml
1 M Tris (pH 8,8)	22,5 ml	---
0,5 M Tris (pH 6,8)	---	7,5 ml
Aqua dest.	29,3 ml	10,76 ml
Glycerin	22,5 ml	7,5ml
TEMED	63 µl	21 µl
APS 10%	0,63 ml	0,21 ml

Tabelle 9: Zusammensetzung der Gele Bestimmung der Isoformen der schweren Myosinketten (MHC) mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

KCL	20 mmol/L
KH ₂ PO ₄	2 mmol/L
EGTA	1 mmol/L
Phenylmethylsulphonylchloride	1 mmol/L
N,N-dimethylformamid	100 µl

Tabelle 10: Zusammensetzung des Probenpuffers zur Auftrennung der schweren Myosinketten

3.6 Densitometrische Auswertung der Gele

Für die densitometrische Auswertung der Gele wurde das computerassistierte Scanner-Densitometrie-System ScanPack von Biometra verwendet. Mittels dieses Systems wurde die Fläche und die optische Dichte der einzelnen Proteinspots berechnet und dadurch eine Quantifizierung ermöglicht.

3.7 Statistische Auswertung

Bei der statistischen Auswertung kamen kommerzielle Statistikprogramme (Enzfitter von Epistat und Excel von Microsoft) zur Anwendung. Die Werte wurden in Mittelwerten ± Standardfehler angegeben. Die Signifikanzanalyse wurde mittels des

Studentschen T-Tests für ungepaarte Werte durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde als hoch bezeichnet, wenn $p < 0,01$ und als hochsignifikant, wenn $p < 0,001$. Für die Regressionsanalyse wurde die Methode der kleinsten Quadrate verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Daten

Sowohl bei den hämodynamischen Werten, wie auch bei der Dicke des interventrikulären Septums fanden sich in keine signifikanten Unterschiede zwischen der HOCM- und der Aortenstenosegruppe. Der Mittelwert der Ejektionsfraktion in beiden Gruppen lag bei $73 \pm 7\%$ (bei Werten von 62% bis 88%), der Mittelwert des linksventrikulären enddiastolischen Druckes (LVEDP) bei 13 mmHg (bei Werten von 1- 24 mmHg), die mittlere Dicke des interventrikulären Septums (IVS) bei 21 mm (bei Werten von 17 bis 33 mm). 20 der 32 Patienten mit linksventrikulärer Herzzytrophie waren weiblichen Geschlechts, das Alter der Patienten bewegte sich zwischen 34 und 80 Jahren, der Mittelwert lag bei 55 Jahren. Bei der Kontrollgruppe (n=6) sind bislang keine kardialen Vorerkrankungen bekannt gewesen. Die gesunden Herzen waren zur Transplantation freigegeben worden, konnten aus technischen Gründen aber nicht transplantiert werden.

4.2 Analyse der leichten Myosinketten (MLC)

Es wurden mittels 2-dimensionaler SDS-PAGE insgesamt 38 Proben untersucht, die von den oben erwähnten drei Patientenkollektiven stammten .

Die Myokardproben wurden in der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung, nach ihrem isoelektrischen Punkt und in der zweiten Dimension (SDS-PAGE) weiter nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die ALC-1 hat ein höheres

Molekulargewicht und ist aufgrund ihrer anderen Aminosäureestersequenz im Bereich des N-Terminus saurer als die VLC-1. Auf den mittels 2D-PAGE erstellten Gelen von Gewebeproben aus dem menschlichen linken Ventrikel kann man somit (bei Vorhandensein der ALC-1) fünf verschiedene Spots deutlich voneinander abgrenzen. Alle Gewebeproben enthielten die VLC-1 und die 2 ventrikulären Isoformen der regulatorischen leichten Ketten, genannt VLC-2 und VLC-2*. Die Gewebeproben der Normalherzen zeigten keinerlei ALC-1-Expression, wohingegen die kranken Herzen allesamt ALC-1 exprimierten. Der Mittelwert der ALC-1-Expression in der Gesamtgruppe der kranken Herzen (n=32) lag bei $10,8 \pm 1,5$ % bei einer Verteilung der Werte zwischen 3,6 % und 32% und unterscheidet sich hochsignifikant von dem der Normalgruppe, in der sich überhaupt keine ALC-1 nachweisen ließ. Der Unterschied zwischen den Mittelwerten der HOCM-Gruppe ($11,8 \pm 2$ %; n=19) und der AS-Gruppe ($9,3 \pm 2,3$ %, n=13) ist statistisch nicht signifikant.

Ebenfalls densitometrisch wurde das Verhältnis zwischen den essentiellen leichten Ketten (MLC-1) und den regulatorischen leichten Ketten (MLC-2) bestimmt. In den Normalherzproben lag dieses MLC-1/MLC-2 Verhältnis bei $1.1 \pm 0,02$. Bei den kranken Herzen fand sich ein Verhältnis von $1,26 \pm 0,78$. Dieser Unterschied in den Mittelwerten war statistisch nicht signifikant.

In keiner der untersuchten Proben konnte die ALC-2 nachgewiesen werden.

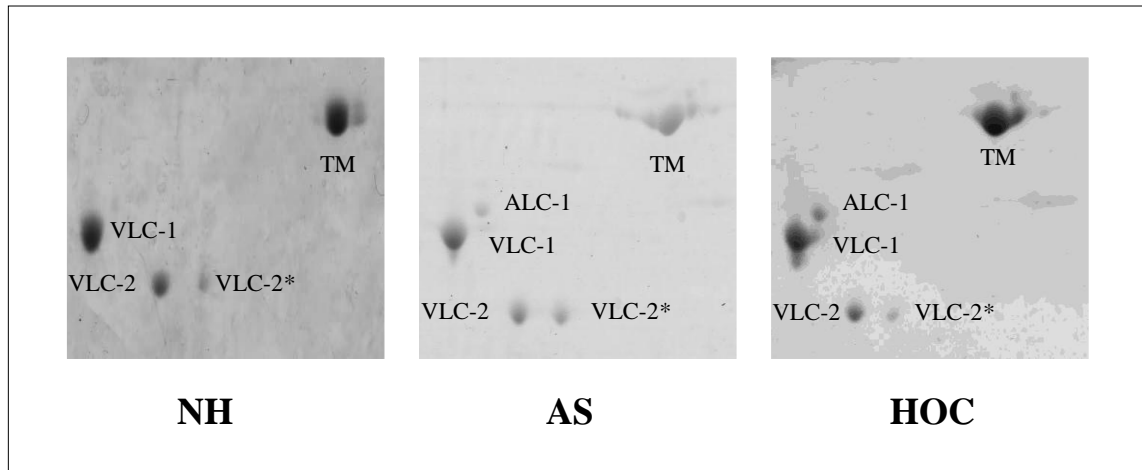


Abbildung 4: Originalphotographien von leichten Myosinketten (MLC) im Myokard von Normalherzen (NH) und von Patienten mit hypertrophisch-obstruktiver Kardiomyopathie (HOCM) und Aortenstenose (AS). Auf allen drei 2-D-Gelen kann man die VLC-1, VLC-2 und VLC-2 sehen, bei den hypertrophierten Herzen (HOCM und AS) zusätzlich auch die ALC-1, welche beim Normalherzen (NH) völlig fehlt. ALC-1 atriale essentielle leichte Myosinkette; TM Tropomyosin; VLC-1 ventrikuläre essentielle leichte Myosinkette; VLC-2 und VLC-2* Isoformen der ventrikulären regulatorischen leichten Myosinketten.*

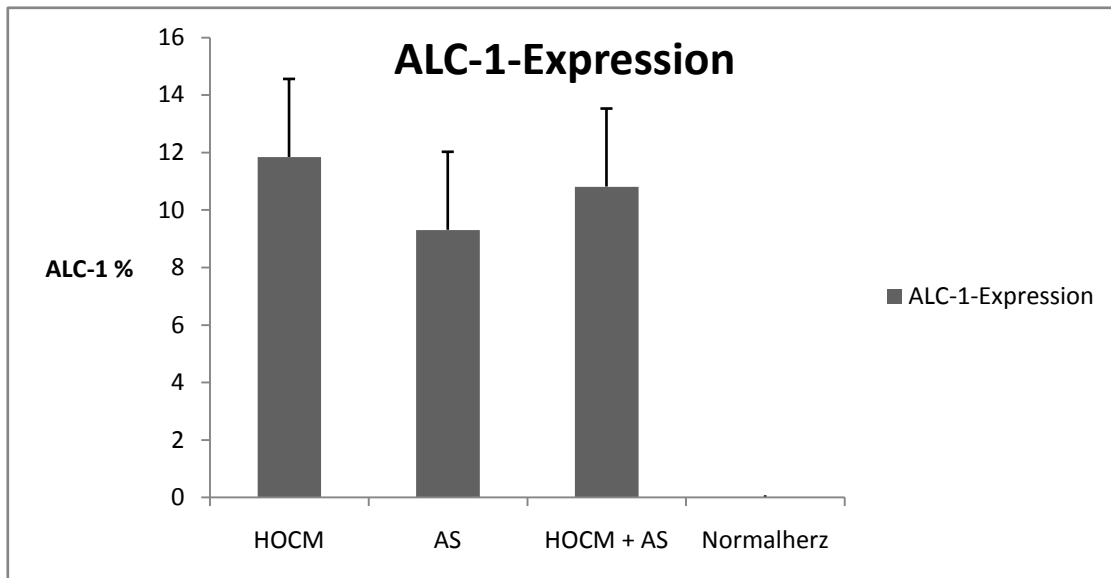


Tabelle 11: Mittelwerte der ALC-1-Expression in den verschiedenen Probengruppen. Der ALC-1-Gehalt ist als prozentualer Anteil an der Gesamtmenge der leichten Myosinketten vom Typ 1 (ALC-1 + VLC-1) angegeben. HOCM hypertrophisch-obstruktive Kardiomyopathie; AS Aortenstenose

4.3 **Beziehung zwischen ALC-1-Expression und klinischen Daten**

Der Mittelwert der Ejektionsfraktion in der Hypertrophiegruppe (n=32) lag bei $75,3 \pm 1,2$ %. Ein signifikanter Unterschied zwischen der HOCM- und der AS-Gruppe bezüglich der Ejektionsfraktion bestand nicht. Zwischen der Ejektionsfraktion und dem ALC-1 Gehalt bestand mit einem Koeffizienten von 0,56 (nach Pearson) eine hochsignifikante positive Korrelation.

Der Mittelwert des linksventrikulären enddiastolischen Druckes (LVEDP) lag in der Hypertrophiegruppe (n=32) bei 13 ± 1 mmHG. Signifikante Unterschiede zwischen der HOCM- und der AS-Gruppe gab es auch hier nicht. Eine signifikante Korrelation zwischen dem linksventrikulären enddiastolischen Druck und der ALC-1 Expression ist auf dem Boden der hier erhobenen Daten nicht abzuleiten.

Der Mittelwert der Dicke des interventrikulären Septums (IVS) lag in der Hypertrophiegruppe (n=32) bei $21,1 \pm 1,3$ mm. Signifikante Unterschiede zwischen der HOCM- und der AS-Gruppe gab es auch hier nicht. Eine signifikante Korrelation zwischen ALC-1 Expression und der Dicke des interventrikulären Septums ließ sich nicht ableiten.

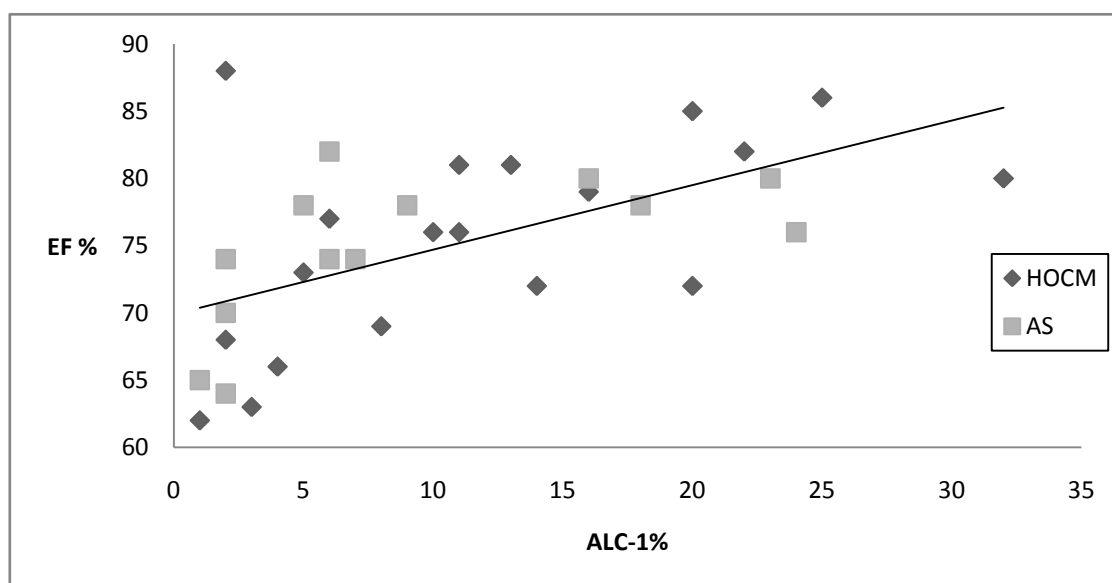


Tabelle 12: Beziehung zwischen der Expression der atrialen Isoform (ALC-1%) der leichten Myosinketten und der Ejektionsfraktion (EF%). Jedes Quadrat, bzw. jede Raute stellt einen Patienten dar. Der ALC-1-Gehalt ist dargestellt als prozentualer Anteil an der Gesamtmenge der leichten Myosinketten vom Typ 1 (ALC-1 + VLC-1). AS Aortenstenose; HOCM hypertrophisch-obstruktive Kardiomyopathie.

4.4 Analyse der schweren Myosinketten (MHC)

Sowohl in den Normalherzproben (n=6) wie auch in den Proben der hypertrophierten Herzen (n=32) ließ sich nur die β -MHC nachweisen, die α -MHC war in keiner der Proben nachweisbar. Zur Kontrolle lief bei jedem der Gele eine Kontrollprobe aus dem menschlichen Vorhof mit, in der sich beide Isoformen nachweisen ließen.

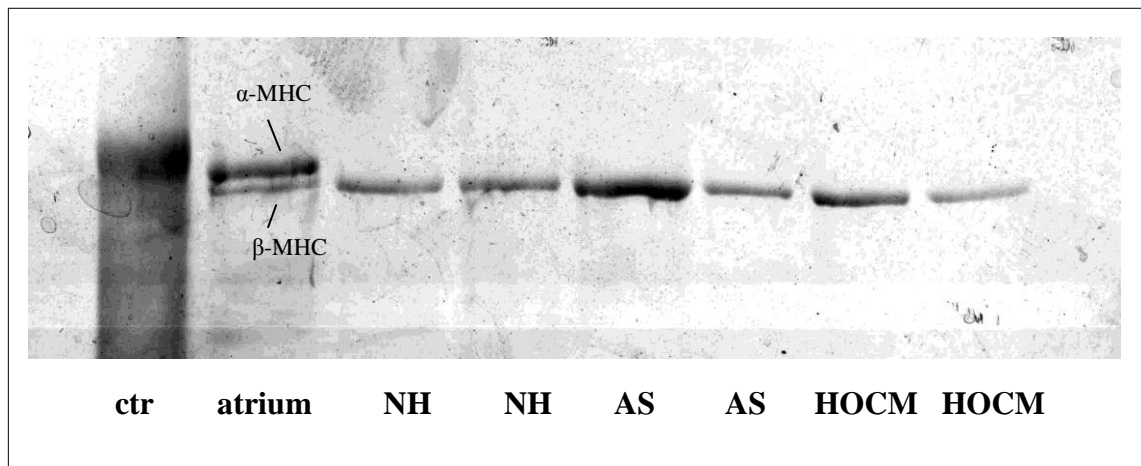


Abbildung 5: Originalphotographie von schweren Myosinketten (MHC) im Myokard von Normalherzen (NH) und von Patienten mit Aortenstenose (AS) oder hypertrophisch-obstruktiver Kardiomyopathie (HOcm). Alle diese Proben enthalten ausschließlich β -MHC. Die α -MHC ist auf dieser Abbildung nur in den Kontrollproben vom Skelettmuskel eines Hasen (ctr) und vom humanen atrialen Myokard (atrium) enthalten.

4.5 Phosphorylierungsgrad des kardialen Troponin I (cTnI)

Der Phosphorylierungsgrad der inhibitorischen Einheit des kardialen Troponin (cTnI) wurde ebenfalls in allen drei Probengruppen mittels 2-dimensionaler Polyacrylamidgel-Elektrophorese bestimmt. Der Anteil des phosphorylierten Troponin I (TnIp) an der Gesamtmenge des Troponin I (TnI + TnIp) wurde densitometrisch bestimmt und in Prozent angegeben.

In den Normalherzproben (n=6) fand sich ein Mittelwert von $12 \pm 3\%$ phosphoryliertem Troponin I, in der Aortenstenosegruppe (n=13) von $10 \pm 4\%$ und in der HOcm-Gruppe (n=19) von $13 \pm 4\%$. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren statistisch nicht signifikant.

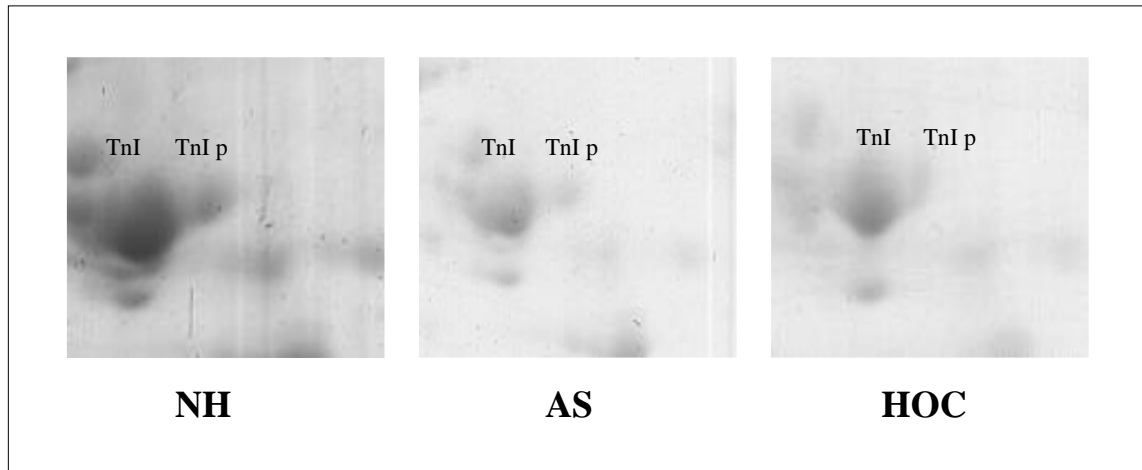


Abbildung 6: Originalphotographien von Troponin I (TnI) im Myokard von Normalherzen (NH) und im Myokard von Patienten mit Aortenstenose (AS) und hypertrophisch-obstruktiver Kardiomyopathie (HOCM). Zwischen diesen 3 Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied bezüglich der Troponin I-Phosphorylierung. TnI Troponin I; TnI p phosphoryliertes Troponin I

5 Diskussion

5.1 Bedeutung des Phosphorylierungsgrades des kardialen Troponin I (cTnI) bei der humanen Herzhypertrophie

Die bisherigen Untersuchungen zum Einfluss des Phosphorylierungsgrades des kardialen Troponin I (cTnI) auf die Kontraktilität des Myokards zeigten, dass es sich auch hierbei um einen Anpassungsmechanismus der Herzens an erhöhte hämodynamische Anforderungen handeln könnte. Die Erhöhung des Phosphorylierungsgrades des kardialen Troponin I durch die Phosphorylasekinase A scheint über die Erhöhung der Querbrückenzyklusfrequenz einen inotropen Effekt auf das Myokard auszuwirken. Herron, Korte und McDonald zeigten 2001 in einer Untersuchung an Herzmuskelzellen von Ratten, dass Phosphorylasekinase A-

induzierte erhöhte Phosphorylierungslevel des kardialen Troponin I signifikant sowohl die maximale Kraftentwicklung, wie auch die maximale Leistung während maximaler Kalziumaktivierung erhöhten. Herron, Korte und McDonald schlossen daraus, dass sich möglicherweise auch das erhöhte Schlagvolumen des Herzens unter β -adrenerger Stimulation über diesen Mechanismus erklären lassen könnte [44].

Stelzer et al. zogen im Jahr 2007 aufgrund ihrer Untersuchungsergebnisse den Schluss, dass es durch die Phosphorylasekinase A (PKA)-induzierte Phosphorylierung des kardialen Troponin I zu einer verminderten Kalziumsensitivität des Troponins käme und letztlich zu einem früheren Einsetzen der Relaxationsphase. Sie verwendeten für ihre Untersuchungen unter anderem speziell gezüchtete Mäuse, die ein verändertes kardiales Troponin I besaßen, welches durch die Phosphorylasekinase A nicht phosphorylierbar war: der Ser23/24-Rest war durch einen nicht phosphorylierbaren Ala23/24- Rest ersetzt worden. Bei diesen transgenen Mäusen kam es im Gegensatz zu den Wildtypen nicht zu einer Absenkung der Kalziumsensitivität unter Phosphorylasekinase A-Einwirkung. Echokardiographisch waren diese Mäuse nicht vom Wildtyp zu unterscheiden, erst beim Einbringen einer zusätzlichen Mutation des kardialen myosinbindenden Protein C (cMyBP-C), welche damit nicht mehr phosphorylierbar war, in das transgene Modell zeigten die Mäuse echokardiographische Zeichen einer Herzhypertrophie [71].

Die Untersuchungen von McConnell, Moravec und Bond aus 1998 zeigten, dass das Myokard von Rattenherzen im Stadium der kompensierten Hypertrophie (aufgrund eines arteriellen Hypertonus) unter β -adrenerger Stimulation erhöhte Phosphorylierungslevel des kardialen Troponin I im Vergleich zum gesundem Myokard aufwies. Im Rahmen der kardialen Dekompensation stieg der Phosphorylierungslevel dann jedoch nicht mehr wesentlich an.

Das Myokard im Stadium der kompensierten Hypertrophie zeigte unter β -adrenerger Stimulation eine geringere Inotropiezunahme als das gesunde Myokard, die im

Rahmen der Dekompensation noch weiter abnahm. Der Grundlevel des Phosphorylierungsgrades des kardialen Troponin I war bei den dekompensierten Herzen im Vergleich zu den gesunden Herzen und auch zu denen im Stadium der kompensierten Hypertrophie deutlich erniedrigt, einhergehend mit einer erhöhten Kalziumempfindlichkeit. Unter β -adrenerger Stimulation kam es beim dekompensierten Myokard im Vergleich zum Gesunden zu einem deutlich stärkeren Anstieg der Troponin I-Phosphorylierung einhergehend mit einem mehr als zweimal größeren Abfall der Kalziumempfindlichkeit. Aus der Sicht von McConnel, Moravec und Bond könnte dieser Mechanismus die abgeschwächte inotrope Antwort des dekompensierten Myokards erklären [71].

Bilchick et al. veröffentlichten 2007 eine Studie, für die sie ein transgenes Mausmodell verwendet hatten. Zum einen hatten sie die Ser22-Ala-Reste und die Ser23-Asp-Reste, welche die Phosphorylierungsstellen der Phosphorylasekinase A am kardialen Troponin I darstellen, mutiert um eine partielle Dephosphorylierung zu simulieren, zum anderen hatten sie die Ser42-Reste und die Ser44-Asp-Reste, welche die Phosphorylierungsstelle für die Phosphorylasekinase C am kardialen Troponin I darstellen, ebenfalls mutiert um eine bestehende Phosphorylierung zu imitieren. Die Herzen der transgenen Mäuse brauchten fast doppelt so lange zum Erreichen der isovolumetrischen Relaxation und hatten eine signifikante erhöhte Nachlast im Vergleich zu den Wildtypherzen. Dieser Effekt ließ sich auch durch Isoproterenolinfusionen zur Stimulierung der Phosphorylasekinase A nicht beseitigen. Die Steigerung der Kontraktilität unter Herzfrequenzsteigerung von 400 auf 700 Schläge pro Minute fiel bei den transgenen Mäusen nur halb so hoch aus wie bei den Wildtypen. Echokardiographisch zeigte sich bei den transgenen Mäusen bereits eine Dilatation der Herzkammern [72].

Diese, wie viele weitere Studien auch verdeutlichen die Komplexität der Frage nach dem Einfluss des Phosphorylierungsgrades des kardialen Troponin I bei der

Herzhypertrophie. Es ließen sich bereits viele weitere Faktoren identifizieren, die bei dieser Fragestellung zum Teil noch ungeklärte Rolle spielen, z.B. das myosinbindende Protein C (MyBP-C), die Phosphorylasekinase-C, das cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP) sowie die Aktomyosin-Adenosintriphosphatase (ATPas), um nur einige zu nennen.

In den hier untersuchten Proben fand sich zwischen der Hypertrophie-Gruppe (n=32) und der normalen Kontrollgruppe (n=6) kein signifikanter Unterschied bezüglich des Phosphorylierungsgrades des kardialen Troponin I (cTnI), was den Schluss nahelegt, dass dieser Faktor bei dem für diese Arbeit untersuchten Proben zumindest zum Untersuchungszeitpunkt keine wesentliche Rolle spielte. Interessant wäre es, diese Fragestellung in Bezug auf die β -adrenerge Aktivierung analog zur Studie von McConnell, Moravec und Bond zu untersuchen, was sich jedoch aus ethischen Gründen verbietet [73]. Erschwerend kommt hinzu, dass die Phosphorylierung des kardialen Troponin I ein flüchtiger Vorgang ist und dass zum Erhalt von Probenmaterial invasive Verfahren notwendig sind. Rein theoretisch wäre es sinnvoll, von den in dieser Arbeit untersuchten Herzen im Stadium der Dekompensation, welches die betroffenen Patienten hoffentlich nie erreichen werden, erneut Probenmaterial zu gewinnen und eine erneuten Abgleich mit den klinischen Parametern vorzunehmen. Ein weiterer Punkt ist die Frage nach der Übertragbarkeit von an Versuchstieren gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen. Zu der o.g. genannten Fragestellung kann man recht viele auf Tiermodellen oder in-vitro-Modellen beruhende Untersuchungen finden, die Relevanz für den Menschen bleibt weiter unklar. Auch die klinische Auswirkung von diversen in-vitro ermittelten Parametern der Myokardkontraktilität ist bei weitem nicht immer klar, vor allem die Interpretation dieser Ergebnisse scheint häufig schwierig.

5.2 Bedeutung der Expression der atrialen leichten Myosinkette vom Typ 1 (ALC-1) bei der humanen Herzhypertrophie

Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen fand sich nur ein signifikanter Unterschied zwischen der Normalherz (n=6)- und der Hypertrophiegruppe (n=32). In allen Proben der Hypertrophiegruppe konnte die ALC-1 nachgewiesen werden. Die hier untersuchten Proben stammten von einer klinisch homogenen Patientenpopulation, die entweder an einer hypertrophisch-obstruktiven Kardiomyopathie oder an einer Aortenstenose litten. Bei keinem dieser Patienten lag eine systolische Dysfunktion vor, die Ejektionsfraktion lag bei allen Patienten im Normbereich. Alle Proben dieser Patientenpopulation exprimierten die ALC-1. Ein signifikanter Unterschied in der ALC-1-Expression bestand zwischen der Aortenstenosegruppe und der HOCM-Gruppe nicht. Im Gegensatz hierzu konnte die ALC-1 in keiner der Normalherzproben nachgewiesen werden.

Zudem besteht zwischen der ALC-1-Expression und der Ejektionsfraktion eine signifikante positive Korrelation. Eine signifikante Korrelation zwischen der ALC-1-Expression und den weiteren erhobenen klinischen Daten, nämlich des Durchmessers des interventrikulären Septums (IVS) und des linksventrikulären enddiastolischen Druckes (LVEDP,) konnte nicht nachgewiesen werden. Die signifikante positive Korrelation zwischen der ALC-1-Expression und der Ejektionsfraktion der hypertrophierten Herzen wirft die Frage auf, ob es durch die Reexpression der ALC-1 im kranken Ventrikel zu einer Verbesserung der Pumpfunktion kommen könnte.

Mehrere vorangegangene Studien lassen dies ebenfalls vermuten. 1986 untersuchten Auckland et al. die Zusammensetzung der schweren und leichten Ketten in Herzen von gesunden Patienten und von Patienten, die an Fallot'scher Tetralogie litten. Bei den leichten Ketten kam es zu einer Veränderung der Zusammensetzung: in den gesunden Herzen war die ALC-1 nur bis zum 1. Jahre nach Geburt nachweisbar, in

den kranken Herzen fiel die ALC-1 Expression nach der Geburt etwas ab und stieg dann im Adoleszentenalter wieder an [74]. Bei den schweren Myosinketten trat keine signifikante Änderung in der Zusammensetzung auf.

Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass es im linken Ventrikel von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie zu einer Reexpression der ALC-1 kommt [75].

Bei Patienten mit Aortenklappenfehler fiel der ALC-1-Anteil in Myokard des überlasteten linken Ventrikels nach dem Aortenklappenersatz und der Normalisierung der hämodynamischen Parameter deutlich ab [54].

Die in den hier durchgeführten Untersuchungen erarbeiteten Ergebnisse, wie auch die Resultate der o.g. Publikationen, legen den Schluss nahe, dass der ALC-1-Expression ein wichtiger Stellenwert in der Anpassung des humanen Myokards an unterschiedliche hämodynamische Anforderungen zukommt.

Eine Rolle bei der Pathogenese der Herzhypertrophie scheint die ALC-1 Expression nach der mir bekannten Datenlage nicht zu besitzen, bisher gibt es keinen Hinweis darauf, dass es durch die Expression der ALC-1 Expression zu einer Beeinträchtigung des Myokards kommen könnte. Die bisher veröffentlichten Untersuchungsergebnisse legen den Schluss nahe, dass es sich bei der Expression der ALC-1 um eine wichtige adaptive Antwort des humanen Myokards auf erhöhte hämodynamische Anforderungen handelt, die einen positiven Effekt auf das Myokard hat und weitestgehend unabhängig von der Ursache dieser erhöhten Anforderungen stattfindet. Die hier erarbeitete signifikante positive Korrelation zwischen der Ejektionsfraktion und der ALC-1 Expression unterstützt dies, ebenso wie die Tatsache, dass die hier erarbeiteten Resultate unabhängig von der Ursache der Herzhypertrophie waren, d.h. sowohl in der Gruppe der Aortenstenosen wie auch in der hypertrophisch-obstruktiven Kardiomyopathie auftraten.

5.3 Bedeutung der schweren Myosinketten (MHC) bei der humanen Herzhypertrophie

Ein großer Teil der bisher erhobenen Ergebnisse stammt von Untersuchungen an Nagerherzen. Beim Nagerherzen scheint dem Wechsel zwischen den MHC-Isoformen eine besondere Bedeutung zuzukommen [1]. Im Laufe der Reifung der Ratte kommt es zu einem Wechsel von der β - zur α -MHC-Isoform. Bei erhöhter hämodynamischer Belastung kommt es umgekehrt wieder zu einer erhöhten Expression der β -MHC [62, 76, 77]. Dieser Wechsel in der Myosinstruktur bringt weitreichende Veränderungen in den kontraktilen Eigenschaften des Nagerherzens mit sich. Mit erhöhtem Anteil der α -MHC Isoform steigt im Rattenherzen die maximale Verkürzungsgeschwindigkeit, die isometrische Kraftentwicklung geschieht ökonomischer [78].

Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob dieser Mechanismus im menschlichen Herzen eine Rolle spielt.

Bisherige Untersuchungsergebnisse zeigten, dass im normalen Herzen im Vorhof vor allem die α -MHC Isoform vorkommt, im Ventrikel vor allem die β -MHC-Isoform [79, 80].

Die Untersuchungen am menschlichem Myokard sind noch nicht so umfangreich wie die an Nagerherzen. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass im gesunden linken Ventrikel ein hoher Anteil von α -MHC mRNA vorkommt und dieser Anteil sich bei kranken Herzen im Stadium des Pumpversagens deutlich verringert [67]. Eine weitere Studie kommt zu durchaus ähnlichen Ergebnissen [66].

Diese Studien warfen die Frage auf, ob sich diese Veränderungen auch auf der Proteinebene finden und ob sie auch bei hypertrophierten Herzen ohne Pumpversagen auftreten.

In dem hier untersuchten Probenkollektiv wurde im interventrikulären Septum ausschließlich die β -MHC-Isoform gefunden, die α -MHC-Isoform war weder in der gesunden noch in der kranken Gruppe nachweisbar. In der als Kontrolle mitlaufenden menschlichen Atriumprobe waren wie erwartet beide Isoformen deutlich voneinander abzugrenzen.

Die auf der mRNA-Ebene gefundenen Veränderungen lassen sich somit auf Basis der hier erhobenen Daten auf der Proteinebene nicht nachvollziehen und können damit auch nicht unmittelbar die kontraktilen Eigenschaften des Myokards der hier untersuchten Proben beeinflussen. Das hier untersuchte Kollektiv bestand allerdings nur aus Proben von Herzen mit normaler Ejektionsfraktion, die bisher gefundenen Veränderungen auf der mRNA-Ebene stammten jedoch von Herzen im Stadium des Pumpversagens. Somit kann nicht sicher gesagt werden, ob sich bei Herzen im Stadium der dekompensierten Hypertrophie nicht auch Veränderungen auf der Proteinebene finden lassen könnten.

6 Zusammenfassung und Aussichten

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Gruppen von humanen Myokardproben aus dem interventrikulären Septum mittels elektrophoretischer Verfahren auf Veränderungen in der Zusammensetzung der kontraktilen Proteine untersucht. 6 der insgesamt 38 Proben stammten von gesunden Herzen, die aus technischen Gründen nicht transplantiert werden konnten. 19 der Proben stammten von Patienten, die an einer hypertrophischen-obstruktiven Kardiomyopathie (HOCM) litten und die restlichen 19 Proben von Patienten mit einer valvulären Aortenstenose (AS). Die 32 kranken Herzen befanden sich allesamt im Stadium der kompensierten Hypertrophie, an klinischen Daten waren von diesen Patienten die Ejektionsfraktion (EF), der Durchmesser des interventrikulären Septums (IVS) sowie die linksventrikuläre enddiastolische Füllungsdruck (LVEDP). Die Ejektionsfraktion lag bei allen diesen

Patienten mit Werten zwischen 62% und 88% (Mittelwert $73 \pm 7\%$) im Normbereich, zwischen der HOCM- und der Aortenstenosegruppe bestand kein signifikanter Unterschied.

Die insgesamt 44 Gewebeproben wurden mittels 3 verschiedener elektrophoretischer Verfahren auf das Vorliegen von 3 verschiedener Veränderungen in der Proteinzusammensetzung untersucht:

1. Mittels 2-dimensionaler Polyacrylamidgel-Elektrophorese (2D-PAGE) wurde der Phosphorylierungsgrad des kardialen Troponin I (cTnI) bestimmt.
2. Mittels 2-dimensionaler Polyacrylamidgel-Elektrophorese (2D-PAGE) wurde eine Analyse der leichten Myosinketten (MLC) durchgeführt, vor allem im Hinblick auf die Frage, ob und inwieweit es zu einer Expression der atrialen leichten Kette vom Typ I (ALC-1) kommt .
3. Mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) wurde eine Bestimmung der schweren Myosinketten (MHC) vorgenommen, vor allem im Hinblick auf die Frage, ob es im hypertrophierten Myokard zu einer Expression der α -Isoform der schweren Myosinkette (α -MHC) kommt.

Für alle dieser drei oben genannten Veränderungen finden sich Hinweise in der Literatur, dass sie möglicherweise eine Rolle bei der Myokardhypertrophie spielen könnten ohne dass bislang eine abschließende Klärung möglich war. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal ein derartig großes, klinisch gut evaluiertes Probenkollektiv von menschlichen Herzen im Stadium der kompensierten Hypertrophie auf das Vorliegen der o.g. Veränderungen untersucht. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist das Vorliegen von zwei verschiedenen Ursachen (Aortenstenose und hypertrophisch-obstruktive Kardiomyopathie) für die Herzhypertrophie im Probenkollektiv dieser Arbeit.

In der Zusammensetzung der schweren Myosinketten (MHC) sowie im Phosphorylierungsgrad des kardialen Troponin I (cTnI) konnten in dieser Arbeit

keine signifikanten Unterschiede zwischen dem hypertrophiertem und dem gesunden Myokard gefunden werden. Im Bereich der leichten Myosinketten (MLC) konnte jedoch nachgewiesen werden, dass es in den hypertrophierten Herzen zu einer deutlichen, signifikanten Expression der atrialen leichten Myosinkette (ALC-1) in der Größenordnung von $10,8 \pm 1,5$ % an der Gesamtmenge der leichten Myosinketten vom Typ 1 (MLC-1) gekommen war. Im Gegensatz hierzu konnte die atriale leichte Kette vom Typ 1 (ALC-1) in keinem der gesunden Herzen nachgewiesen werden. Zudem konnte eine statistische hochsignifikante positive Korrelation (Koeffizient 0,56 nach Pearson) zwischen der Höhe der Ejektionsfraktion und dem Anteil der ALC-1 an der Gesamtmenge der leichten Myosinketten ermittelt werden.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass der Expression der ALC-1 ein hoher Stellenwert bei der Anpassung an erhöhte hämodynamische Anforderungen zukommt. Die positive Korrelation zwischen der Höhe der ALC-1-Expression und der Ejektionsfraktion weisen daraufhin, dass der ALC-1-Expression zumindest im Rahmen der kompensierten Hypertrophie ein positiver Effekt auf das Myokard zukommt. Dieser Effekt lässt sich anhand von früheren Veröffentlichungen erklären, die z.B. zeigten, dass die ALC-1 über eine Erhöhung der Ablösungsgeschwindigkeit zu einer Beschleunigung des Querbrückenzyklus und zu einer Erhöhung der Verkürzungsgeschwindigkeit und der isometrischen Kraftentwicklung führt [53].

7 Literaturverzeichnis

1. Nadal-Ginard, B. and V. Mahdavi, *Molecular basis of cardiac performance. Plasticity of the myocardium generated through protein isoform switches.* J Clin Invest, 1989. **84**(6): p. 1693-700.
2. Morano, I., *Tuning the human heart molecular motors by myosin light chains.* J Mol Med, 1999. **77**(7): p. 544-55.
3. Solaro, R.J. and H.M. Rarick, *Troponin and tropomyosin: proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments.* Circ Res, 1998. **83**(5): p. 471-80.
4. Bashyam, M.D., et al., *Molecular genetics of familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC).* J Hum Genet, 2003. **48**(2): p. 55-64.
5. Lombardi, R. and S. Betocchi, *Aetiology and pathogenesis of hypertrophic cardiomyopathy.* Acta Paediatr Suppl, 2002. **91**(439): p. 10-4.
6. Murphy, R.T. and R.C. Starling, *Genetics and cardiomyopathy: where are we now?* Cleve Clin J Med, 2005. **72**(6): p. 465-6, 469-70, 472-3 passim.
7. Morner, S., et al., *Amyloid heart disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy.* Journal of Internal Medicine, 2005. **258**(3): p. 225-230.
8. Almquist, A.K., et al., *Cardioverter-defibrillator implantation in high-risk patients with hypertrophic cardiomyopathy.* Heart Rhythm, 2005. **2**(8): p. 814-9.
9. Balaram, S.K. and D.G. Swistel, *Long-term prognosis of hypertrophic cardiomyopathy after surgery.* Anadolu Kardiyol Derg, 2006. **6 Suppl 2**: p. 37-9.
10. Dearani, J.A. and G.K. Danielson, *Septal myectomy for obstructive hypertrophic cardiomyopathy.* Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu, 2005: p. 86-91.
11. Dearani, J.A., et al., *Surgery insight: Septal myectomy for obstructive hypertrophic cardiomyopathy--the Mayo Clinic experience.* Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2007. **4**(9): p. 503-12.
12. Efthimiadis, G.K., et al., *Can septal myectomy prevent sudden cardiac death in hypertrophic obstructive cardiomyopathy?* Eur Heart J, 2007.
13. McLeod, C.J., et al., *Surgical septal myectomy decreases the risk for appropriate implantable cardioverter defibrillator discharge in obstructive hypertrophic cardiomyopathy.* Eur Heart J, 2007.
14. McRae, M.E., *Myectomy for hypertrophic obstructive cardiomyopathy.* Can J Cardiovasc Nurs, 2007. **17**(2): p. 22-30.

15. Schulte, H.D., W. Bircks, and B. Losse, *Techniques and complications of transaortic subvalvular myectomy in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy (HOCM)*. *Z Kardiol*, 1987. **76 Suppl 3**: p. 145-51.
16. Schulte, H.D., 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**(4): p. 709-17.
17. Kuhn, H., et al., *Transcoronary ablation of septal hypertrophy (TASH): a new treatment option for hypertrophic obstructive cardiomyopathy*. *Z Kardiol*, 2000. **89 Suppl 4**: p. IV41-54.
18. Holmes, D.R., Jr., U.S. Valeti, and R.A. Nishimura, *Alcohol septal ablation for hypertrophic cardiomyopathy: Indications and technique*. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2005.
19. Alam, M., H. Dokainish, and N. Lakkis, *Alcohol septal ablation for hypertrophic obstructive cardiomyopathy: a systematic review of published studies*. *J Interv Cardiol*, 2006. **19**(4): p. 319-27.
20. Faber, L., *Percutaneous septal ablation in hypertrophic obstructive cardiomyopathy*. *Eur J Med Res*, 2006. **11**(10): p. 423-31.
21. Heldman, A.W., et al., *Myectomy or alcohol septal ablation surgery and percutaneous intervention go another round*. *J Am Coll Cardiol*, 2007. **49**(3): p. 358-60.
22. Maron, B.J., *Controversies in cardiovascular medicine. Surgical myectomy remains the primary treatment option for severely symptomatic patients with obstructive hypertrophic cardiomyopathy*. *Circulation*, 2007. **116**(2): p. 196-206; discussion 206.
23. Ralph-Edwards, A., et al., *Hypertrophic obstructive cardiomyopathy: comparison of outcomes after myectomy or alcohol ablation adjusted by propensity score*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2005. **129**(2): p. 351-8.
24. Zeng, Z., et al., *Comparison of percutaneous transluminal septal myocardial ablation versus septal myectomy for the treatment of patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy--a meta analysis*. *Int J Cardiol*, 2006. **112**(1): p. 80-4.
25. Nishimura, R.A., *Cardiology patient pages. Aortic valve disease*. *Circulation*, 2002. **106**(7): p. 770-2.
26. Faggiano, P., et al., *Epidemiology and cardiovascular risk factors of aortic stenosis*. *Cardiovasc Ultrasound*, 2006. **4**: p. 27.
27. Passik, C.S., et al., *Temporal changes in the causes of aortic stenosis: a surgical pathologic study of 646 cases*. *Mayo Clin Proc*, 1987. **62**(2): p. 119-23.
28. Lester, S.J., et al., *The natural history and rate of progression of aortic stenosis*. *Chest*, 1998. **113**(4): p. 1109-14.

29. Reant, P., et al., *Absolute assessment of aortic valve stenosis by planimetry using cardiovascular magnetic resonance imaging: comparison with transesophageal echocardiography, transthoracic echocardiography, and cardiac catheterisation*. Eur J Radiol, 2006. **59**(2): p. 276-83.
30. Haghi, D., et al., *A hybrid approach for quantification of aortic valve stenosis using cardiac magnetic resonance imaging and echocardiography: comparison to right heart catheterization and standard echocardiography*. Clin Res Cardiol, 2006. **95**(3): p. 162-7.
31. Bonow, R.O., et al., *ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (writing committee to revise the 1998 Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease): developed in collaboration with the Society of Cardiovascular Anesthesiologists: endorsed by the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions and the Society of Thoracic Surgeons*. Circulation, 2006. **114**(5): p. e84-231.
32. Rayment, I., et al., *Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor*. Science, 1993. **261**(5117): p. 50-8.
33. Schaub, M.C., et al., *Modulation of contractility in human cardiac hypertrophy by myosin essential light chain isoforms*. Cardiovasc Res, 1998. **37**: p. 381-404.
34. Holmes, K.C., *The swinging lever-arm hypothesis of muscle contraction*. Curr Biol, 1997. **7**(2): p. R112-8.
35. Irving, M., et al., *Tilting of the light-chain region of myosin during step length changes and active force generation in skeletal muscle*. Nature, 1995. **375**(6533): p. 688-91.
36. Cooke, R., *The mechanism of muscle contraction*. CRC Crit Rev Biochem, 1986. **21**(1): p. 53-118.
37. Lymn, R.W. and E.W. Taylor, *Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin*. Biochemistry, 1971. **10**(25): p. 4617-24.
38. Stein, L.A., et al., *Mechanism of actomyosin adenosine triphosphatase. Evidence that adenosine 5'-triphosphate hydrolysis can occur without dissociation of the actomyosin complex*. Biochemistry, 1979. **18**(18): p. 3895-909.
39. Eisenberg, E. and T.L. Hill, *Muscle contraction and free energy transduction in biological systems*. Science, 1985. **227**(4690): p. 999-1006.
40. Haselgrove, J.C. and H.E. Huxley, *X-ray evidence for radial cross-bridge movement and for the sliding filament model in actively contracting skeletal muscle*. J Mol Biol, 1973. **77**(4): p. 549-68.

41. Chalovich, J.M., P.B. Chock, and E. Eisenberg, *Mechanism of action of troponin . tropomyosin. Inhibition of actomyosin ATPase activity without inhibition of myosin binding to actin.* J Biol Chem, 1981. **256**(2): p. 575-8.
42. Robertson, S.P., et al., *The effect of troponin I phosphorylation on the Ca²⁺-binding properties of the Ca²⁺-regulatory site of bovine cardiac troponin.* J Biol Chem, 1982. **257**(1): p. 260-3.
43. Solaro, R.J. and J. Van Eyk, *Altered interactions among thin filament proteins modulate cardiac function.* J Mol Cell Cardiol, 1996. **28**(2): p. 217-30.
44. Herron, T.J., F.S. Korte, and K.S. McDonald, *Power output is increased after phosphorylation of myofibrillar proteins in rat skinned cardiac myocytes.* Circ Res, 2001. **89**(12): p. 1184-90.
45. Bodor, G.S., et al., *Troponin I phosphorylation in the normal and failing adult human heart.* Circulation, 1997. **96**(5): p. 1495-500.
46. Wagner, P.D. and E. Giniger, *Hydrolysis of ATP and reversible binding to F-actin by myosin heavy chains free of all light chains.* Nature, 1981. **292**(5823): p. 560-2.
47. Sivaramakrishnan, M. and M. Burke, *The free heavy chain of vertebrate skeletal myosin subfragment 1 shows full enzymatic activity.* J Biol Chem, 1982. **257**(2): p. 1102-5.
48. Barton, P.J., et al., *Structure and sequence of the myosin alkali light chain gene expressed in adult cardiac atria and fetal striated muscle.* J Biol Chem, 1988. **263**(25): p. 12669-76.
49. Milligan, R.A., *Protein-protein interactions in the rigor actomyosin complex.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(1): p. 21-6.
50. Kawasaki, H. and R.H. Kretsinger, *Calcium-binding proteins. 1: EF-hands.* Protein Profile, 1994. **1**(4): p. 343-517.
51. Morano, I. and H. Haase, *Different actin affinities of human cardiac essential myosin light chain isoforms.* FEBS Lett, 1997. **408**(1): p. 71-4.
52. Morano, I., et al., *Changes in essential myosin light chain isoform expression provide a molecular basis for isometric force regulation in the failing human heart.* J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(4): p. 1177-87.
53. Morano, M., et al., *Regulation of human heart contractility by essential myosin light chain isoforms.* J Clin Invest, 1996. **98**(2): p. 467-73.
54. Sutsch, G., et al., *Hemodynamic performance and myosin light chain-1 expression of the hypertrophied left ventricle in aortic valve disease before and after valve replacement.* Circ Res, 1992. **70**(5): p. 1035-43.
55. Adelstein, R.S. and E. Eisenberg, *Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction.* Annu Rev Biochem, 1980. **49**: p. 921-56.

56. Morano, I., et al., *The influence of P-light chain phosphorylation by myosin light chain kinase on the calcium sensitivity of chemically skinned heart fibres.* FEBS Lett, 1985. **189**(2): p. 221-4.
57. Persechini, A., J.T. Stull, and R. Cooke, *The effect of myosin phosphorylation on the contractile properties of skinned rabbit skeletal muscle fibers.* J Biol Chem, 1985. **260**(13): p. 7951-4.
58. Morano, I., et al., *Increased calcium sensitivity of chemically skinned human atria by myosin light chain kinase.* Basic Res Cardiol, 1988. **83**(4): p. 350-9.
59. Davis, J.S., et al., *The overall pattern of cardiac contraction depends on a gradient of MLC-2 phosphorylation.* Cell, 2001. **107**: p. 631-41.
60. Pope, B., J.F. Hoh, and A. Weeds, *The ATPase activities of rat cardiac myosin isoenzymes.* FEBS Lett, 1980. **118**(2): p. 205-8.
61. Litten, R.Z., 3rd, et al., *Altered myosin isozyme patterns from pressure-overloaded and thyrotoxic hypertrophied rabbit hearts.* Circ Res, 1982. **50**(6): p. 856-64.
62. Lompre, A.M., B. Nadal-Ginard, and V. Mahdavi, *Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated.* J Biol Chem, 1984. **259**(10): p. 6437-46.
63. Miyata, S., et al., *Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart.* Circ Res, 2000. **86**(4): p. 386-90.
64. Reiser, P.J., et al., *Human cardiac myosin heavy chain isoforms in fetal and failing adult atria and ventricles.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(4): p. H1814-20.
65. Swynghedauw, B., *Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles.* Physiol Rev, 1986. **66**(3): p. 710-71.
66. Lowes, B.D., et al., *Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium.* J Clin Invest, 1997. **100**(9): p. 2315-24.
67. Nakao, K., et al., *Myosin heavy chain gene expression in human heart failure.* J Clin Invest, 1997. **100**(9): p. 2362-70.
68. O'Farrell, P.H., *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.* J Biol Chem, 1975. **250**(10): p. 4007-21.
69. Casper, C., *Methoden der Proteomforschung 2 D Gelektrophorese.* 2003.
70. Klose, J., *Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals.* Humangenetik, 1975. **26**(3): p. 231-43.
71. Stelzer, J.E., et al., *Differential roles of cardiac myosin-binding protein C and cardiac troponin I in the myofibrillar force responses to protein kinase a phosphorylation.* Circ Res, 2007. **101**(5): p. 503-11.

72. Bilchick, K.C., et al., *Heart failure-associated alterations in troponin I phosphorylation impair ventricular relaxation-afterload and force-frequency responses and systolic function*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(1): p. H318-25.
73. McConnell, B.K., C.S. Moravec, and M. Bond, *Troponin I phosphorylation and myofilament calcium sensitivity during decompensated cardiac hypertrophy*. Am J Physiol, 1998. **274**(2 Pt 2): p. H385-96.
74. Auckland, L.M., S.J. Lambert, and P. Cummins, *Cardiac myosin light and heavy chain isotypes in tetralogy of Fallot*. Cardiovasc Res, 1986. **20**(11): p. 828-36.
75. Trahair, T., et al., *Myosin light chain gene expression associated with disease states of the human heart*. J Mol Cell Cardiol, 1993. **25**(5): p. 577-85.
76. Izumo, S., et al., *Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals*. J Clin Invest, 1987. **79**(3): p. 970-7.
77. Mercadier, J.J., et al., *Myosin isoenzyme changes in several models of rat cardiac hypertrophy*. Circ Res, 1981. **49**(2): p. 525-32.
78. Alpert, N.R. and L.A. Mulieri, *Increased myothermal economy of isometric force generation in compensated cardiac hypertrophy induced by pulmonary artery constriction in the rabbit. A characterization of heat liberation in normal and hypertrophied right ventricular papillary muscles*. Circ Res, 1982. **50**(4): p. 491-500.
79. Bouvagnet, P., et al., *Distribution pattern of alpha and beta myosin in normal and diseased human ventricular myocardium*. Basic Res Cardiol, 1989. **84**(1): p. 91-102.
80. Gorza, L., et al., *Myosin types in the human heart. An immunofluorescence study of normal and hypertrophied atrial and ventricular myocardium*. Circ Res, 1984. **54**(6): p. 694-702.

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. O. Ritter für die äußerst gute und nette Betreuung während der Arbeit. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. K. Schuh möchte ich herzlich dafür danken, dass er sich als Koreferent zur Verfügung gestellt hat.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. L. Neyses, von dem ich alle Unterstützung erfahren hatte, die zur Durchführung der Versuche notwendig war.

In sehr guter Erinnerung werde ich alle Mitarbeiter im Labor behalten, die mich alle unterstützt haben und für ein sehr gutes Arbeitsklima gesorgt haben. Ich werde sie hier nicht einzeln aufzählen, da ich sie wirklich alle meine.

Das sehr gute Arbeitsklima und die sehr guten Arbeitsbedingungen im Labor werde ich nicht vergessen. Ich denke, dass Herr Prof. Dr. med. G. Ertl daran nicht ganz unschuldig gewesen ist und möchte mich hiermit ganz herzlich bei ihm dafür bedanken.

Ohne Herrn Prof. Dr. med. H.D. Schulte und seine Gewebeproben wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank!

Vielen Dank an meine lieben Eltern dafür, dass sie mich immer unterstützt haben und mir so vieles ermöglicht haben.

Nicht zuletzt danke ich auch meiner Freundin Ines für ihre Geduld und Unterstützung und noch für einiges mehr.