

Aus dem Pathophysiologischen Institut der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. J. Holtz)



**Expression von Determinanten der elektromechanischen Kopplung in
Kardiomyozyten bei Überlast-Hypertrophie des menschlichen
Herzens**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)
vorgelegt der medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Eyk Schellenberger
geboren am 29. Januar 1969 in Halle/S.

Gutachter:

1. Prof. Dr. Holtz
2. Prof. Dr. Werdan
3. PD Dr. Schulz (Essen)

04.05.1999

Kurzreferat

Einleitung: Die Überlast-Hypertrophie des Herzen ist mit zahlreichen Veränderungen des zellulären Phänotypes verbunden, die insgesamt zu einer erhöhten Anfälligkeit für tödliche Arrhythmien führen. Experimentelle Analysen an Ratten mit kardialer Überlasthypertrophie sprechen für eine belastungsabhängige Induktion des „Transienten Auswärtsstroms“, der unter anderem durch den Kv1.4-Kaliumkanal kodiert wird und in der Repolarisationsphase I das Aktionspotential stark beeinflusst. Der „Zytoplasmatische Fibrose Transmembranregulator“ (CFTR) leitet einen PKA-aktivierten auswärts rektifizierenden Chloridstrom, der während des Aktionspotential ebenfalls repolarisierend wirkt und dieses bei Aktivierung durch die PKA verkürzen kann.

Methodik: mRNA-Expressions-Analyse durch standardkalibrierte kompetitive Umkehr-Polymerasekettenreaktion. Untersucht wurde Myokard des rechten Herzhohrs (Teil des Atrium), das beim Anschluß der Herzlungenmaschine bei elektiven Herzoperationen anfällt und linksventrikuläres Myokard aus explantierten Herzen und nicht-implantierbaren Spenderherzen.

Ergebnisse: Die linksventrikuläre CFTR-mRNA-Expression in nichtinsuffizienten Spenderherzen war 52 ± 10 amol/mg Gesamt-RNA (n=7). Terminal herzinsuffiziente Ventrikel ohne vorausgegangene ACE-Hemmer-Therapie hatten eine signifikant verminderte mRNA-Expression von 24 ± 9 amol/mg Gesamt-RNA (n=5, $p < 0,05$). Dagegen war die mRNA in herzinsuffizienten Ventrikeln unter ACE-Hemmern mit 56 ± 8 amol/mg Gesamt-RNA (n=9, $p < 0,05$) im Bereich der Spenderherzen. Die rechtsatriale CFTR-mRNA-Expression bei Herzinsuffizienz unter Therapie mit Ca^{2+} -Antagonisten war 33 ± 14 amol/mg RNA (n=8). Ohne Vasodilatator-Therapie betrug sie 38 ± 5 amol/mg RNA (n=27). Bei Therapie mit ACE-Hemmern war die CFTR-Expression auf 59 ± 9 amol/mg RNA (n=16, $p < 0,05$) erhöht. Die linksventrikuläre Kv1.4-mRNA-Expression in nicht-insuffizienten Spenderherzen betrug 22 ± 4 amol/ μg Gesamt-RNA (n=6). In herzinsuffizienten Ventrikeln ohne ACE-Hemmer-Therapie war diese auf 51 ± 9 amol/ μg Gesamt-RNA (n=5, $p < 0,01$) erhöht. Bei Herzinsuffizienten Ventrikeln mit ACE-Hemmern lag die Kv1.4-mRNA mit 30 ± 6 amol/ μg Gesamt-RNA (n=7, $p = 0,08$) im Bereich der Spender.

Schlußfolgerung: Bei Herzinsuffizienz ist die linksventrikuläre mRNA-Expression des CFTR-Chloridkanals herabreguliert und die des Kv1.4-Kaliumkanals hochreguliert. Bei Herzinsuffizienz wirkt eine Therapie mit ACE-Hemmern normalisierend auf die mRNA-Expression beider Kanäle. Die Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung der Regulation beider Kanäle am präventiven Potential der ACE-Hemmer-Therapie bei Herzinsuffizienz. Im menschlichen Herzen dominiert die Exon 5-positive CFTR-mRNA.

Bibliographische Beschreibung:

Schellenberger, Eyk: Expression von Determinanten der elektromechanischen Kopplung in Kardiomyozyten bei Überlast-Hypertrophie des menschlichen Herzens. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 1999

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Medizinischer Hintergrund	1
1.2	Die elektrische Herzaktion	2
1.3	Der Zystische Fibrose Transmembranregulator (CFTR) in Kardiomyozyten	5
1.4	Der spannungsabhängige Kaliumkanal Kv1.4 in Kardiomyozyten	9
1.5	Ziel der Arbeit	11
2	Materialien	12
2.1	Chemikalien	12
2.2	Enzyme	13
2.3	Lösungen	14
2.4	Kits	15
3	Methoden	16
3.1	Aufbereitung der RNA-Proben	16
3.1.1	Das Probenmaterial	16
3.1.2	RNA-Präparation	16
3.2	Aufbau der kompetitiven RT-PCR für den CFTR und HK1	18
3.2.1	Prinzip der reversen Transkription (RT)	18
3.2.2	Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	19
3.2.3	Auswahl der Primer	21
3.2.4	Kompetitive RT-PCR	22
3.2.5	Auswertung der kompetitiven RT-PCR	22
3.2.6	Synthese der Standards für die kompetitive PCR	23

3.2.7	Reaktionsbedingungen der reversen Transkription	25
3.2.8	Reaktionsbedingungen und Primer für die Polymeraseket- tenreaktion (PCR)	27
3.3	DNA-Gelelektrophorese	30
3.4	Elution von DNA- bzw. RNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
3.5	Klonierung von PCR-Fragmenten	32
3.5.1	Ligation von PCR-Fragmenten und Plasmid	32
3.5.2	Transformation von Plasmiden in <i>E.coli</i>	33
3.6	Präparation von kompetenten <i>E.coli</i>	35
3.7	Plasmid-DNA-Präparation	36
3.7.1	DNA-Mini-Präparation	36
3.7.2	DNA-Midi-Präparation	37
3.8	DNA-Restriktion	37
3.9	DNA-Sequenzierung	38
3.9.1	Sequenzierung nach Sanger	38
3.9.2	Automatische Sequenzierung („Cycle sequencing“)	40
3.10	In-vitro-Transkription	41
4	Ergebnisse	44
4.1	„Splicing“ des Zystische Fibrose Transmembranregulator (CFTR) im menschlichen Herzen	44
4.2	Quantifizierung der mRNA-Expression des CFTR im menschlichen Herzen	45
4.2.1	Rechte Atrien	45
4.2.2	Linke Ventrikel	48
4.3	Quantifizierung der mRNA-Expression des Kalium-Kanals Kv1.4 in menschlichen Herzen	50
4.3.1	Rechte Atrien	50
4.3.2	Linke Ventrikel	51
5	Diskussion	53
5.1	„Splicing“ des CFTR im Herzen	53
5.2	CFTR-Expression	54
5.3	Kv1.4-Expression	58

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i>	IV
5.4 Einordnung der Ergebnisse	59
6 Zusammenfassung	61
7 Thesen	63
A Tabellarischer Lebenslauf	77
B Selbständigkeitserklärung	79
C Erklärung über frühere Promotionsversuche	80
D Danksagung	81

Abbildungsverzeichnis

1.1	Der zeitliche Ablauf wichtiger Ein- und Auswärtsströme des Aktionspotentials	4
1.2	Modell des CFTR-Chloridkanals nach Riordan <i>et al.</i> [79]	6
1.3	Modellvorstellung von der Wirkung eines erhöhten Ca ²⁺ -Einstroms auf das Aktionspotential	8
1.4	Modell der Kaliumkanäle vom Shaker-Typ [21]	9
3.1	Prinzip der reversen Transkription	19
3.2	Prinzip der PCR	20
3.3	kompetitive RT-PCR	22
3.4	Graphische Auswertung der kompetitiven RT-PCR	23
3.5	Synthese der internen Standards	24
3.6	Prinzip der Ligation beim pCR-Script SK(+) Cloning Kit	33
4.1	Exon 5 einschließende PCR-Produkte	44
4.2	CFTR-Expression im rechten Atrium in Abhängigkeit vom Schweregrad der Herzinsuffizienz	46
4.3	CFTR-mRNA-Expression im rechten Atrium in Abhängigkeit von der Herzinsuffizienz bei Patienten ohne Vasodilatator-Therapie	47
4.4	CFTR-mRNA-Expression im rechten Atrium in Abhängigkeit von der Vasdilatator-Therapie	48
4.5	CFTR-mRNA-Expression im rechten Atrium bei schwerer Herzinsuffizienz NYHA 3 - 4 und 4	49
4.6	CFTR-Expression im linken Ventrikel	50
4.7	Kv1.4-mRNA-Expression im rechten Atrium	51
4.8	Kv1.4-Expression in linken Ventrikel	52

5.1 Regulation des CFTR 55

Abkürzungen

A_x	Absorption (Absorption bei einer Wellenlänge von x nm)
ACE	Angiotensin-Kovertierungsenzym (A. Converting E.)
annealing	Anlagerung zweier komplementärer DNA- bzw. RNA-Stränge
„blunt end“	DNA endet mit gepaarten Nukleotidbasen
bp	Basenpaar(e)
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CFTR	Zystische Fibrose Transmembranregulator (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)
Ci	Curie
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
ddNTP	2',3'-Dideoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
DTX	Dendrotoxin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ET	Endothelin
ET-A	Endothelin-Rezeptor-A
ET-B	Endothelin-Rezeptor-B

I _{to}	Transienter Auswärtskaliumstrom (transient outward)
kb	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton
Kv1.4	spannungsabhängiger Kaliumkanal 1.4
max	maximal
ME	β -Mercaptoethanol
MOPS	3-N-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
Na-EDTA	Natriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
Primer	Startermoleküle für die Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkription - oder Umkehr-Polymerasekettenreaktion
Sarcosyl	N-Laurylsarcosin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
„sticky end“	DNA endet mit ungepaarten Nukleotidbasen
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase des <i>Thermus aquaticus</i> -Bakterium
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin
TSS	Transformations- und Lagerungslösung (transformation and storing solution)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tube	meist Eppendorf-Röhrchen
U	Enzymeinheiten

Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indol- β -D-Galactopyranosid

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Medizinischer Hintergrund

Herzkreislauferkrankungen zählen in vielen Industrieländern zu den häufigsten Todesursachen. 1991 standen sie in Deutschland mit 50% aller Sterbefälle an der Spitze der Statistik. Die arterielle Hypertonie, an der ab dem fünften Lebensjahrzehnt etwa 25% der Bevölkerung leiden, stellt dabei neben Rauchen, Übergewicht, Bewegungsmangel u.a. einen wichtigen Risikofaktor dar.

Das gesunde Herz kann sich an erhöhte Arbeitsbelastungen durch eine physiologische Hypertrophie anpassen. Dagegen führt eine chronische Erhöhung von Vor- oder Nachlast bzw. kombinierter Überlast zu einer permanenten Vergrößerung der myokardialen Wandspannung, an die sich das Herz durch eine pathologische Art der myokardialen Hypertrophie anpaßt. Diese Überlasthypertrophie führt auf längere Sicht zur Herzinsuffizienz und gilt somit als Vorstufe [40]. Für diese Art der Herzinsuffizienz prägte Katz [55] den Begriff „overload cardiomyopathy“. Die Zunahme der Herzmasse setzt sich dabei aus einer Hypertrophie der Kardiomyozyten und einer Hyperplasie der übrigen Zelltypen des Myokards zusammen. Die Kardiomyozyten adulter Säuger haben nach der bisheriger Lehrmeinung ihre Teilungsfähigkeit verloren und zeigen lediglich eine Zunahme des Zellvolumens verbunden mit vermehrter Polyploidie. Kajstura *et al.* [53] wiesen jedoch nach, daß sich schon im gesunden Myokard etwa 14 von 1 Million Myokardzellen im Mitosestadium befinden. Bei Herzinsuffizienz im Endstadium erhöht sich dieser Anteil ungefähr auf das 10-fache (152 Myozyten pro Milli-

on bei ischämischer und 131 bei idiopathischer Kardiomyopathie). Bei kardialer Überlast hat man in den hypertrophierten Kardiomyozyten Veränderungen der Genexpression mit einer Annäherung an den weniger differenzierten fetalen oder neonatalen Phänotyp gefunden. Davon betroffen ist die RNA- und Proteinsynthese vieler kontraktile Proteine, Enzyme, Rezeptoren, Zelladhäsionsmoleküle sowie Kanal- und Transportmoleküle. Die Tendenz zur Annäherung an den perinatalen Phänotyp bei Überlasthypertrophie ist bei vielen Säugern zu finden. Man sieht diese Überlasthypertrophie als eine Arretierung in der vorbereitenden Hypertrophie vor der Zellteilung und bezeichnet die damit verbundene Phänotypverschiebung als Dedifferenzierung [40]. Klinische Bedeutung hat besonders die mit der Überlast-Hypertrophie verbundene instabile Ca^{2+} -Homöostase [89], die unter anderem auf eine veränderte Expression von Kanal- und Transportproteinen zurückgeführt wird [29].

Wie aus klinischen Untersuchungen hervorgeht, ist die Hypertrophie des Herzens mit Veränderungen der Erregungsleitung und -rückbildung verbunden. Diese führen zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber gefährlichen bzw. tödlichen Arrhythmien [56]. Die molekularen Ursachen sieht man hierfür in einer veränderten Ausstattung der Kardiomyozyten mit Ionenkanal- und Transportproteinen, vor allem im Sarkolemm, die unter anderem in einem verlängerten Aktionspotential resultieren. Vor allem werden eine verzögerte Inaktivierung depolarisierender Ströme, besonders des L-Typ Ca^{2+} -Stromes und eine Veränderung der Repolarisationsströme, besonders des transienten K^+ -Auswärtsstromes (I_{to}), diskutiert. Ein möglicher Kandidat für die Kodierung des I_{to} ist der spannungsabhängige Kaliumkanal Kv1.4. Einen anderen repolarisierend wirkenden Strom kodiert der Chlorid-Kanal „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (CFTR). In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der Boten-RNS (mRNA) dieser beiden Kanäle im Myokard von herzinsuffizienten Patienten untersucht.

1.2 Die elektrische Herzaktion

Voraussetzung für die mechanische Aktivität des Herzens ist eine rhythmische Kontraktionsfolge, die durch eine rhythmische elektrische Aktivität gesteuert wird. Sie entsteht durch einen sehr fein geregelten Wechsel zwischen Ruhe- und

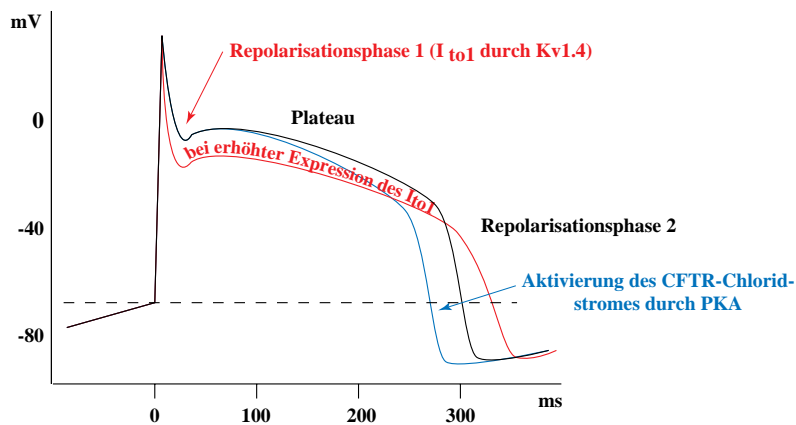
Aktionspotential. Dabei muß der Ablauf von der Schrittmacheraktivität des Sinusknotens bis zur mechanischen Antwort in den Ventrikelmyozyten über viele Jahre absolut fehlerfrei sein, um Arrhythmien – vor allem tödliche – zu vermeiden. Um eine effiziente Funktionsanpassung zu erreichen, ist es andererseits notwendig, verschiedene Parameter, wie z.B. Herzfrequenz, AV-Überleitungszeit und Kraftentwicklung, flexibel steuern zu können. Dieses feine Zusammenspiel wird durch den Besatz des Sarkolemmes mit verschiedenen Ionenpumpen und selektiven Ionenkanälen erreicht, der in Abhängigkeit von der Herzregion stark variiert.

Das relativ stabile *Ruhemembranpotential* des Arbeitsmyokards von etwa -90 bis -70 mV entsteht durch den aktiven Transport der Na^+ - K^+ -ATPase und die hohe Permeabilität der Zellmembran bei diesem Potential für K^+ -Ionen. Die Na^+ / K^+ -ATPase transportiert dabei in einem Funktionszyklus 3 Na^+ aus der Zelle und 2 K^+ in die Zelle und erzeugt dadurch sowohl chemische Gradienten für Na^+ und K^+ als auch einen positiven Netto-Ladungstransport von innen nach außen. Durch ein starkes Überwiegen der K^+ -Leitfähigkeit gegenüber der von Na^+ , Ca^{2+} oder Cl^- entsteht durch K^+ -Diffusion in den Extrazellulärraum das Ruhemembranpotential (Abb. 1.1). Die Höhe dieses K^+ -Gleichgewichtspotentials (E_m) kann man nach der *Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung* [15] (1.1) abschätzen (R - Gaskonstante, T - absolute Temperatur, F - Faraday-Konstante, z - Ladungszahl). Da beim Ruhemembranpotential die Leitfähigkeit des Sarkolemmes für Na^+ und Cl^- (g_{Na} , g_{Cl}) gegenüber der von K^+ (g_{K}) sehr klein ist, entspricht dieses mit $\frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{g_{\text{K}} \cdot c_{\text{K},ex}}{g_{\text{K}} \cdot c_{\text{K},in}}$ ungefähr -86 mV.

$$E_m = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{g_{\text{K}} \cdot c_{\text{K},ex} + g_{\text{Na}} \cdot c_{\text{Na},ex} + g_{\text{Cl}} \cdot c_{\text{Cl},ex}}{g_{\text{K}} \cdot c_{\text{K},in} + g_{\text{Na}} \cdot c_{\text{Na},in} + g_{\text{Cl}} \cdot c_{\text{Cl},in}} \quad (1.1)$$

Wird die Herzmuskelzelle durch einen Schrittmacherreiz bis zu einem Schwellenpotential depolarisiert, öffnen sich die Na^+ -Kanäle (bei gleichzeitiger Verminderung der g_{K}) und es entsteht das *Aktionspotential* (AP). Der schnelle Na^+ -Einstrom erhöht dabei das Membranpotential in Richtung des Na^+ -Gleichgewichtspotentials ($\ln \frac{g_{\text{Na}} \cdot c_{\text{Na},ex}}{g_{\text{Na}} \cdot c_{\text{Na},in}}$; entspricht etwa $+70$ mV), erreicht aber durch die spannungsabhängige Inaktivierung der Na^+ -Kanäle und transiente Erhöhung der g_{K} (spannungsabhängiger, zeitinaktivierter I_{to}) nur $+20$ mV bis $+40$ mV (Abb. 1.1). Danach wird das Membranpotential hauptsächlich durch den langsam inak-

Wichtige Einwärtsströme



Wichtige Auswärtsströme

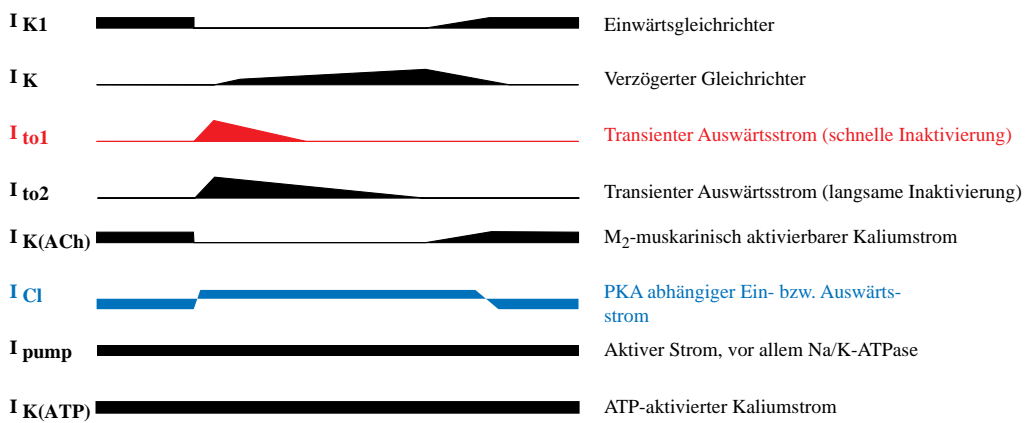


Abbildung 1.1: Der zeitliche Ablauf wichtiger Ein- und Auswärtsströme des Aktionspotentials von Kardiomyozyten (modifiziert nach: Task Force on Arrhythmias [90])

Die Linienstärke zeigt nur den zeitlichen Verlauf, nicht die Stromstärke. Einwärtsströme sind nach unten gezeichnet, Auswärtsströme nach oben.

tivierenden Ca^{++} -Einstrom (L-Typ-Kalziumkanal) und den Na/Ca-Austauscher für 200 ms bis 400 ms auf dem sogenannten Kalzium-Plateau gehalten. Die Repolarisation erfolgt durch abnehmende Einwärtsströme und die Zunahme verschiedener Auswärtströme (siehe Abbildung 1.1): I_{K1} – einwärtsgerichteter Kaliumstrom, I_K – verzögert gleichrichtender Kaliumstrom, $I_{K(ACh)}$ – M_2 -muskarinisch aktivierbarer Kaliumstrom, $I_{K(ATP)}$ – Aktivierung durch Abfall von $\frac{ATP}{ADP}$ und I_{Cl} – β -adrenerg stimulierbarer Chloridstrom.

Um eine regelmäßige Herzaktion zu ermöglichen, zeigt das Ruhemembranpotential eine Schrittmacher-Depolarisation. Diese wird durch eine ständig vorhandene Hintergrund-Einwärtsströmung und durch die abnehmenden Auswärtströme erzeugt (Abb. 1.1). Durch hormonelle Regulation der Na^+ - und K^+ -Kanäle (über G-Proteine) und des $I_{K(ACh)}$ (Aktivierung führt zur Hyperpolarisation) wird der Anstieg des Schrittmacherpotentials und damit die Frequenz und Höhe des Aktionspotentials beeinflusst. Die Zellen des Reizleitungssystems (Sinusknoten, Gebiet um den AV-Knoten, His-Bündel, Aschow-Tawara Schenkel und Purkinjezellen) zeigen alle eine potentielle Schrittmacheraktivität, allerdings mit absteigender Frequenz. Der Schrittmacher mit der höchsten Frequenz, im Normalfall der Sinusknoten, kommt jedoch den nachgeschalteten Schrittmachern zuvor und unterdrückt diese.

1.3 Der Zystische Fibrose Transmembranregulator (CFTR) in Kardiomyozyten

Die Zystische Fibrose, auch Mukoviszidose genannt, ist eine autosomal rezessive Erbkrankheit, die sich an verschiedenen Organen mit Sekretionsfunktion, vor allem Lunge, Pankreas und Speicheldrüsen, manifestiert [13]. Sie ist charakterisiert durch ungewöhnlich hohe Potentialunterschiede, die z.B. an der Epitheloberfläche des Respirationstraktes auftreten. Die apikale Oberfläche zeigt eine verminderte Leitfähigkeit für Chloridionen. Die Epithelien produzieren ein Sekret mit einer erhöhten Viskosität, das zum Sekretstau und letztendlich zu einer zystischen Umwandlung der betroffenen Organe führt. Ohne Lungentransplantation kommt es zu einer respiratorischen Insuffizienz im frühen Erwachsenenalter. Langzeitergeb-

nisse bei der Gentherapie der Mukoviszidose stehen noch aus.

Ein Modell der Proteinstruktur und Membranverankerung des CFTR-Cl⁻-Kanals ist in Abb. 1.2 dargestellt. Der CFTR wurde erstmalig durch John R. Riordan *et al.* aus Epithelzellen von Schweißdrüsen des Menschen kloniert [79]. Die zugehörige mRNA ist etwa 6500 bp lang, die davon abgeleitete Aminosäuresequenz von 1480 Aminosäuren besteht aus zwei ähnlichen Hälften, die jeweils sechs Transmembrandomänen, gefolgt von einer intrazellulären Nukleotidbindungsdomäne, aufweisen. Verbunden sind beide Teile durch eine große intrazelluläre, regulatorische Domäne. Diese besitzt mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinasen A und C [79]. Bei $\frac{2}{3}$ aller Patienten mit Mukoviszidose findet man eine Deletion eines Basentriplets, das Phenylalanin 508 kodiert [99]. Darüber hinaus hat man bis jetzt noch mehr als 300 andere krankheitsauslösende Mutationen gefunden.

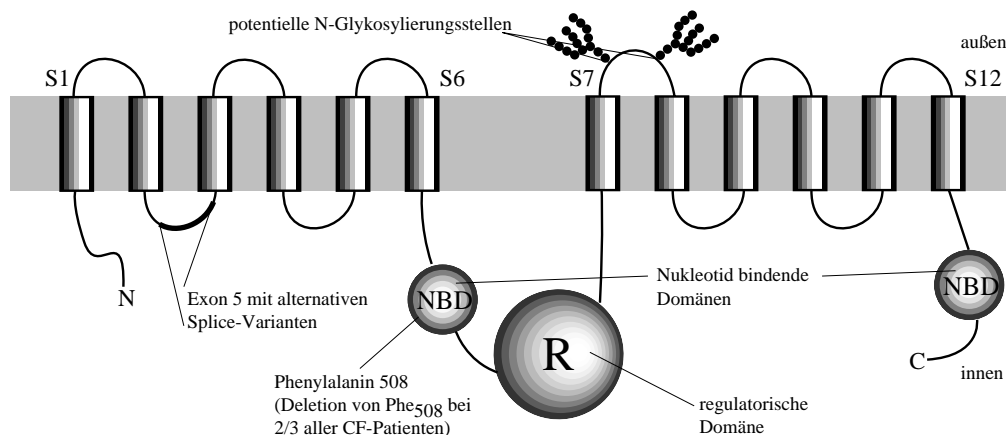


Abbildung 1.2: Modell des CFTR-Chloridkanals nach Riordan *et al.* [79]

Durch heterologe Expression in verschiedenen Nicht-Epithelzellen [2, 9, 10, 20, 25, 54, 91], die normalerweise nur minimale Mengen an CFTR-Protein produzieren und keine endogenen Proteinkinase A(PKA)-regulierten Chlorid-Kanäle besitzen, schloß man aus dem Nachweis eines PKA-regulierten Chloridstromes, daß der CFTR selbst ein PKA-regulierter Chlorid-Kanal ist. Schon vor der Klonierung des CFTR war ein PKA regulierter Chloridkanal im Ventrikelmuskel von Säugern bekannt [3, 4, 38, 65]. Dieser besitzt die gleichen Eigenschaften wie der epitheliale CFTR-Chloridkanal [26, 28, 69]. Den stärksten Hinweise darauf,

daß der CFTR selbst einen Chlorid-Kanal darstellt, gab folgendes Experiment: Ein rekombinanter CFTR wurde in Sf9-Zellen exprimiert, danach extrahiert und aufgereinigt und in synthetischen Liposomen rekonstituiert. Diese wurden in Lipidmembranen gebracht, die daraufhin eine PKA-abhängige Chlorid-Leitfähigkeit zeigten [8].

Der CFTR-Chloridkanal kann durch Phosphorylierung mittels Proteinkinase A unter Hydrolyse von ATP, GTP, ITP, UTP oder CTP in Anwesenheit von Mg^{2+} aktiviert werden [1]. Im Gegensatz zu anderen PKA-regulierten Strömen, wie denen von Ca^{2+} und K^+ , welche auch ohne PKA-Aktivierung eine relevante Ganzzell-Leitfähigkeit zeigen, ist die vom CFTR ohne PKA-Aktivierung nahezu gleich Null [26, 69]. Eine simultane Aktivierung durch die Proteinkinase C kann die Kanalaktivität durch PKA potenzieren [16, 91]. Der CFTR kann, wenn auch weniger effektiv, sogar durch alleinige Phosphorylierung durch Proteinkinase C aktiviert werden [11].

Es gibt eine Reihe von Vorstellungen über die funktionelle Rolle des CFTR-Chloridkanals im Herzen. Da der CFTR- Cl^- -Strom in relevanter Stärke nur nach Stimulation durch PKA auftritt, scheint dieser Kanal nur bei β -adrenerger Stimulation einen Einfluß auf das Membranpotential zu haben. Die wichtigsten β -Rezeptor-vermittelten Wirkungen sind die Erhöhung des L-Typ- Ca^{2+} - und des verzögerten K^+ -Gleichrichter-Stroms (Abb.1.1). Da die CFTR-Kanalöffnung weitgehend spannungsunabhängig ist und E_{Cl} bei etwa -50 bis -60 mV liegt, müßte unmittelbar nach AP-Depolarisation ein repolarisierender Cl^- -Auswärtsstrom während der gesamten Plateauphase fließen. Dieser kann den depolarisierenden Eigenschaften des erhöhten Ca^{2+} -Stroms entgegenwirken. Erstens wird dadurch verhindert, daß sich das AP-Plateau dem Ca^{2+} -Gleichgewichtspotential nähert und sich dadurch der elektrochemische Gradient für Ca^{2+} vermindert (Abb. 1.3). Dies würde dem Ziel einer β -adrenergen Stimulation, nämlich einem erhöhten Ca^{2+} -Einstrom, entgegenwirken. Zweitens kann der Cl^- -Auswärtsstrom der durch den erhöhten Ca^{2+} -Einstrom verursachten Tendenz einer verzögerten Repolarisation entgegentreten, welche bekanntermaßen zu einer gefährlichen AP-Verlängerung führen kann (verlängertes Q-T-Intervall im EKG).

Mangels direkter Blocker gibt es nur indirekte Nachweise für die angeführten Wirkungen. Der Versuch, die Funktion des CFTR an „knockout“-Mäusen zu

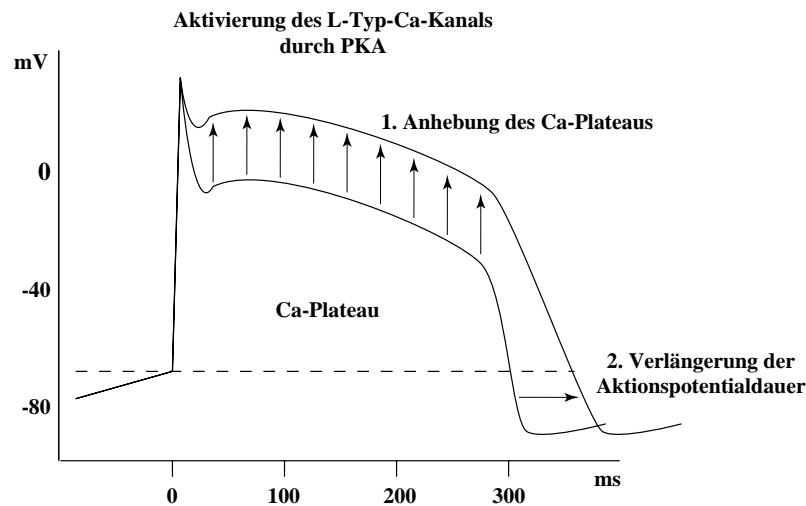


Abbildung 1.3: Modellvorstellung von der Wirkung eines erhöhten Ca^{2+} -Einstroms auf das Aktionspotential

studieren, scheiterte daran, daß die Ventrikel von Wildtyp-Mäusen keinen PKA-aktivierten Cl^- -Strom aufweisen [61]. Takano und Noma [92] konnten zeigen, daß DNDS, welches den CFTR- Cl^- -Strom indirekt vermindert, das Aktionspotential von β -adrenerg stimulierten Ventrikelzellen von Ratten verlängert. In den Vorhofzellen der Ratten, welche keinen CFTR exprimieren, hat DNDS keine Wirkung auf die Dauer des Aktionspotentials. Dementsprechend hatte die Aktivierung des CFTR in Ventrikelzellen von Meerschweinchen eine leichte Depolarisierung des Ruhepotentials und eine Verkürzung der AP-Dauer zur Folge [37, 59]. Im menschlichen Herzen wie auch in Menschenaffen ist der CFTR sowohl in den Vorhof- als auch in den Ventrikelzellen exprimiert [60, 104]. Im Gegensatz dazu kommt der CFTR im Kaninchen und im Meerschweinchen nur in den Ventrikelzellen und im Hundeherzen gar nicht vor. Die kardiale CFTR-mRNA weist im Kaninchen und im Meerschweinchen gegenüber der humanen mRNA des respiratorischen Epithels eine Deletion des Exon 5 auf [42]. Außerhalb dieser Region sind diese zu über 95% identisch. Diese kardiale Splicing-Variante steht im Verdacht, für eine ineffektive Prozessierung verantwortlich zu sein [22]. Die CFTR-mRNA des Menschen und des Makaken (eine Menschenaffenart) kommt sowohl in der Exon 5 positiven als auch in der Exon 5 negativen Variante vor [103].

1.4 Der spannungsabhängige Kaliumkanal Kv1.4 in Kardiomyozyten

Der Kv1.4, zunächst als HK1 bezeichnet, wurde von Michael M. Tamkun *et al.* aus menschlichem Ventrikelmateriale kloniert [94], kommt aber in identischer Form auch im Gehirn vor. In der großen Gruppe der spannungsabhängigen Kaliumkanäle (Kv) gehört er zur *Shaker*-Klasse (Kv1), deren erster Vertreter aus einer *Drosophila*-Mutante mit dem *Shaker*-Phänotyp (Fliegen mit abnormen Beinbewegungen) kloniert wurde [96, 97]. Die Abbildung 1.4 zeigt die postulierte Struktur eines Kaliumkanals der Shaker-Familie.

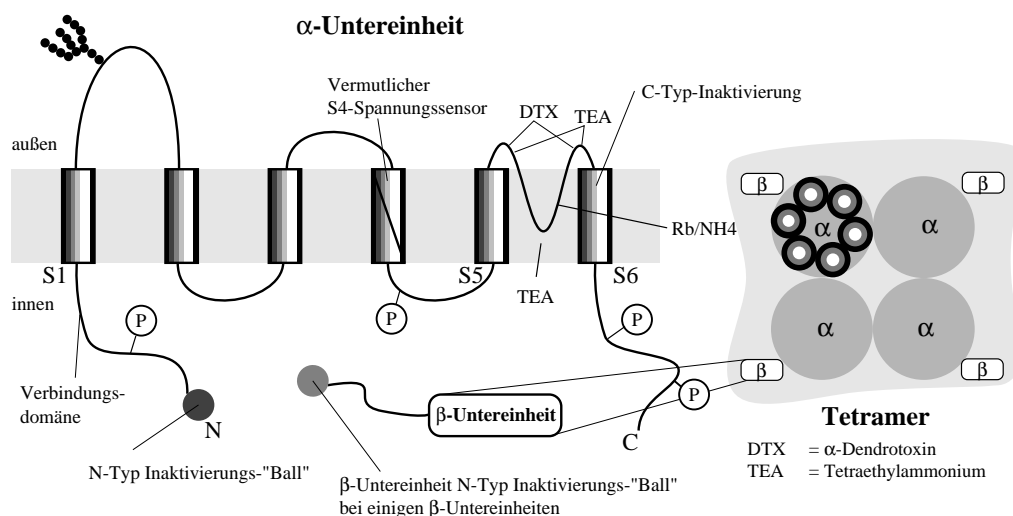


Abbildung 1.4: Modell der Kaliumkanäle vom Shaker-Typ [21]

Die dem humanen Kv1.4 entsprechende cDNA ist 3,5 kb lang und enthält ein offenes Leseraster für 653 Aminosäuren. Zum entsprechenden Kaliumkanal der Ratte (rKv1.4) ist die cDNA-Sequenz des Kv1.4 zu 98% identisch. Die sechs transmembranäre Domänen enthaltende zentrale Region ist im Vergleich mit den anderen im Herzen exprimierten spannungsabhängigen (daher Kv) *Shaker*-ähnlichen Kaliumkanälen (z.B. *Shaker*, Kv1.2, Kv1.5, Kv2.1 und Kv4.2) weitgehend identisch [21]. Sequenzunterschiede kommen hauptsächlich an den N- und C-terminalen Enden dieser Kaliumkanäle vor. Die am stärksten konservierte Region liegt zwischen den Transmembrandomänen S5 und S6 (Vgl. Abb. 1.4). Man nimmt an, daß diese hydrophobe Schleife in die Zellmembran ragt und die äußere

Öffnung des Ionenkanals bildet, da verschiedene Mutationen in diesem Bereich die Ionenselektivität verändern [21, 14, 50, 76, 52]. Für eine gemeinsame Abstammung der genannten K^+ -Kanäle spricht, daß die hochkonservierte zentrale Region für den K^+ -Transport offensichtlich essentiell ist, während die N- und C-terminalen Enden für die unterschiedlichen Eigenschaften der Isoformen verantwortlich sind.

Eine weitere Quelle der Vielfalt der K^+ -Kanäle ist die Assoziation der oben beschriebenen α -Untereinheiten mit β -Untereinheiten. Beispielsweise werden bei spannungsabhängigen Na^+ - und Ca^{2+} -Kanälen durch heterologe Expression zusammen mit β -Untereinheiten Parameter wie Inaktivierungskinetik, Stromstärkeamplituden und Spannungsabhängigkeit moduliert. Durch Proteinisolierung mittels α -Dendrotoxin (DTX) (Abb. 1.4), das an viele K^+ -Kanäle bindet [77], wurde zusammen mit dem 78-kDa-DTX-Rezeptor ein 39-kDa-Protein gereinigt [85]. Dieses bindet nicht an die monoklonalen DTX-Rezeptorantikörper und liegt mit den α -Untereinheiten in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 vor (Abb. 1.4). Rettig *et al.* [78] isolierten cDNA von zwei β -Untereinheiten, die $rKv\beta_1$ und $rKv\beta_2$ genannt wurden. Diese zeigen eine hohe Übereinstimmung am C-terminalen Ende (85%), unterscheiden sich jedoch stark am N-terminalen Ende. Die β -Untereinheiten sind vermutlich zytoplasmatische Proteine, die mit dem C-terminalen Bereich an die zytoplasmatischen Domänen der α -Untereinheiten binden und so deren Eigenschaften beeinflussen (Abb. 1.4). Beispielsweise ruft die $rKv\beta_1$ -Untereinheit beim $Kv1.1$ (verzögerter Gleichrichter) eine schnelle Inaktivierung hervor, welche wahrscheinlich durch einen N-terminalen „Inaktivierungsball“ verursacht wird [78]. Im Gegensatz dazu besitzt die $rKv\beta_2$ diese Inaktivierungsdomäne nicht, kann aber die Inaktivierungsrate und die Spannungsabhängigkeit vom $Kv1.4$ und $Kv1.5$ verändern [66, 100]. Eine weitere β -Untereinheit – $hKv\beta_3$ – wurde in menschlichen Herzvorhöfen [62] und Herzkammern [31] gefunden. Diese zeigt ebenfalls am C-terminalen Teil besonders zu $rKv\beta_1$ eine starke Homologie und unterscheidet sich stark am N-terminalen Ende.

Die funktionelle Untersuchung der Kv -Kaliumkanäle durch Expression in heterologen Systemen, wie z.B. in *Xenopus laevis* Oozyten, wird durch die Anwesenheit der endogenen β -Untereinheiten der Expressionssysteme kompliziert. Da diese die Eigenschaften der α -Untereinheiten beeinflussen, ist die Übertragung

der Ergebnisse auf die Funktion *in vivo* erheblich eingeschränkt. Beispielsweise unterscheidet sich die Aktivierungszeit des Kv1.5 bei Expression in der Zelllinie HEK 293 deutlich von der bei Expression in Maus-L-Zellen [32, 88].

In diesen Zellen zeigt der Kv1.4, wie auch der Kv4.2, sowohl eine sehr schnelle Aktivierung als auch eine sehr schnelle und nahezu vollständige Inaktivierung [88]. Auf Grund dieser Eigenschaften und der 4-Aminopyridin-Sensitivität stellen beide Kanäle Kandidaten für die Erzeugung des *Transienten Auswärtsstroms* I_{to} im Herzen dar. Allerdings wurden für den humanen Kv1.4 in *Xenopus laevis* Oozyten Refraktärzeiten von 3-8 s ermittelt, wohingegen der I_{to} in Ratten und in menschlichen Herzen *in vivo* innerhalb von 50 ms reaktiviert [74, 75]. Der Kv4.2 kommt dem nativen Kaliumstrom mit einer Refraktärzeit von unter 200 ms deutlich näher. In welchem Maße diese Eigenschaften durch Heterotetramer-Bildung bzw. Variation der β -Untereinheiten beeinflusst werden können, ist noch nicht vollständig geklärt.

1.5 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollte zunächst auf mRNA-Ebene untersucht werden, ob die Expression des spannungsabhängigen Kalium-Kanals Kv1.4 und des CFTR im menschlichen Herzen bei Herzinsuffizienz gegenüber gesunden Herzen verändert ist und somit als Ursache für eine erhöhte Arrhythmieanfälligkeit bzw. Aktionspotentialverlängerung bei Herzinsuffizienz in Frage kommt. Weiterhin sollte geklärt werden, ob die Therapie mit Hemmern des Angiotensin konvertierenden Enzyms (ACE) zu einer Normalisierung der Expression beider Kanäle führt, was einen Teil der kardioprotektiven Wirkung, insbesondere der Verminderung der Arrhythmieanfälligkeit, dieser Therapie darstellen könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten durch hieran anschließende Protein-Quantifizierung bzw. elektrophysiologische Untersuchungen untermauert werden.

Kapitel 2

Materialien

2.1 Chemikalien

α - ³⁵ S-dATP	Amersham (10 mCi/ml)
β -Mercaptoethanol (ME)	Merck
Bromphenolblau	Merck
CsCl	Cibco-BRL
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat (dNTP)	Gibco-BRL
	je Nukleotid 100mM
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure	Merck
Glucose	Merck
Glycerin	Cibco-BRL
Guanidinthiocyanat (GTC)	Cibco-BRL
Isopropyl- β -D-thio-Galactopyranosid	Sigma (100 mM)
LB-Agar	Gibco-BRL
LB-Medium	Gibco-BRL
MgCl ₂	Merck
Na-Azetat	Sigma

Na-EDTA	Merck
Na ₂ HPO ₄	Merck
NaCl	Merck
NaH ₂ PO ₄	Merck
3-N-Morpholino-propansulfonsäure (MOPS)	Roth
PCR-Primer	Gibco-BRL
Phenol	Amresco
Random Primer	Gibco-BRL
	3 µg/µl
Salzsäure (konz.)	Merck
Sarcosyl	Sigma
(N-Laurylsarcosin)	
Sodiumdodecylsulfat	Serva
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth
Triton-X-100	Sigma
X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indol- β-D-Galactopyranosid)	Promega (50 mg/ml)

2.2 Enzyme

<i>Sst</i> II (Gibco-BRL, Eggenstein)	10 U/µl
<i>Pst</i> I (Gibco-BRL, Eggenstein)	10 U/µl
Super Script TM II RT (Gibco-BRL, Eggenstein)	200 U/µl
T4 DNA-Ligase (Gibco-BRL, Eggenstein)	1 U/µl
Taq-Polymerase (AGS, Heidelberg)	4 U/µl
Cloned <i>Pfu</i> Polymerase (Stratagene, Heidelberg)	2,5 U/µl
Lysozym (Sigma)	
RNase-Inhibitor (RNasin, AGS, Heidelberg)	(50 U/µl)

2.3 Lösungen

CsCl-Kissen	5,7 M CsCl 100 mM Na-EDTA, pH 6,5 in DEPC-Wasser ansetzen und steril filtrieren vor Gebrauch 6 mM ME hinzufügen
Guanidinthiocyanat-Lösung	4 M GTC 1 % Sarcosyl 25 mM Na-Azetat, pH 6,0 1 mM Na-EDTA, pH 6,5 1 M β -Mercaptoethanol (ME) steril ansetzen ME erst vor Gebrauch zusetzen
LB-Agar	37 g/l autoklavieren
LB-Medium	25 g/l autoklavieren
Loading buffer für DNA-Gele	50% Glycerin 0,25% Bromphenolblau in 1x TBE-Puffer
SDS-Lösung	100 g SDS in 900 ml H ₂ O lösen (68°C) pH 7,2 mit HCl einstellen ad 1l H ₂ O
STET-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 50 mM Na-EDTA (pH 8,0) 8% Saccharose 5% Triton-X-100
TBE-Puffer (10x)	0,89 M Tris-Base 0,025 M Na-EDTA <i>Aqua ad 1l</i>
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM Na-EDTA

TSPE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,0 1% Sarcosyl 5% Phenol 1 mM Na-EDTA, pH 6,5 in DEPC-H ₂ O lösen steril filtrieren
TSS-Lösung	LB-Medium 10% (w/v) PEG (8000 g/mol) 5% (v/v) DMSO 20 – 50 mM Mg ²⁺ (MgSO ₄ oder MgCl ₂) lösen und pH 6,5 einstellen autoklavieren

2.4 Kits

RNA Transcription Kit (Stratagene, Heidelberg)

Midi Plasmid Kit (Qiagen, Hilden)

pCR-ScriptTM SK(+) Cloning Kit (Stratagene, Heidelberg)

T7-SequencingTM Kit Pharmacia

ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer Corporation)

Kapitel 3

Methoden

3.1 Aufbereitung der RNA-Proben

3.1.1 Das Probenmaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten Herzproben wurden freundlicherweise von der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Prof. Dr. med H.R. Zerkowski zur Verfügung gestellt.

Das Herzgewebe der rechten Vorhöfe wurden routinemäßig bei der Kanülierung des rechten Vorhofes für den Anschluß der Herz-Lungen-Maschine gewonnen. Das Material der linken Herzkammern herzinsuffizienter Patienten wurde im Rahmen der Herztransplantationen von den explantierten Herzen entnommen. Das herzgesunde linksventrikuläre Myokard stammt aus Spender-Herzen, die nicht zur Transplantation verwendet werden konnten. Das Herzgewebe wurde kurz nach Entnahme (maximal fünf Minuten) in flüssigen Stickstoff eingelagert. Die Patienten waren über die Verwendung des Gewebes für wissenschaftliche Zwecke aufgeklärt und hatten ihre Einwilligung gegeben.

3.1.2 RNA-Präparation

Aus dem Probenmaterial wird die Gesamt-RNA durch CsCl-Ultrazentrifugation nach Chirgwin *et al.* [12] präpariert.

Zuerst werden die zuvor in flüssigem Stickstoff gelagerten Proben gewogen,

danach in Aluminiumfolie verpackt und sofort wieder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Gewicht der Probe sollte dabei $\frac{1}{10}$ des Volumens an GTC-Lösung (8 ml) nicht überschreiten. Anschließend werden die Proben mit einem Hammer pulverisiert, wobei das Auftauen durch wiederholtes Kühlen im Stickstoff verhindert wird. Das entstandene Pulver wird mit einem Spatel in 50 ml-Falcon-Röhrchen, welche 8 ml GTC-Lösung enthalten, überführt und dann sofort mit einem Ultraturrax homogenisiert. Dieser wird danach mit 0,1% SDS-Lösung und H₂O gespült.

In ein Beckman-Röhrchen (Ultrazentrifugen-Röhrchen für Sorval-SW 40-Rotor) pipettiert man 2,6 ml CsCl-Lösung. Auf diese wird dann vorsichtig das Homogenat geschichtet. Später im Rotor gegenüberstehende Röhrchen werden gegeneinander mit GTC-Lösung austariert, wobei diese bis etwa 3 mm unter dem Rand gefüllt sein müssen. Die fertigen Probenröhrchen werden bei 22°C und etwa 150000x g 21 h (ca. 33000 1/min) zentrifugiert. Der Rotor soll ohne Bremsung auslaufen.

Danach wird der Überstand bis ca. 1 cm vom Boden abgenommen, der Rest wird so dekantiert, daß die Zwischenphase das entstandene RNA-Pellet nicht verunreinigt. Den unteren Teil des Beckman-Röhrchens schneidet man mit einem Skalpell ab und legt ihn auf Eis. Das RNA-Pellet wird in 200 μ l TSPE-Puffer gelöst und in ein Greiner-Röhrchen überführt. Um noch verbliebenes Material nicht zu verschenken, wiederholt man diesen Schritt, so daß sich insgesamt 400 μ l ergeben. Anschließend wird die RNA mit 0,1 Vol. 3 M Na-Azetat und 10 ml Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt.

Die Proben werden nun 30 min bei 10000 rpm und -10°C in einem Sorvall HB-6 Rotor abzentrifugiert. Danach wird der Überstand dekantiert und das Pellet etwa 5 min bei Raumtemperatur getrocknet. Dieses wird dann auf Eis in 200 μ l DEPC-H₂O gelöst und in ein Eppendorf-Tube überführt. Mit 100 μ l DEPC-H₂O spült man noch einmal nach (insges. 300 μ l). Man bestimmt die RNA-Konzentration mit einem Spektralphotometer bei A₂₆₀ nach der Gleichung (3.1). Danach wird $\frac{1}{10}$ Vol. 3 M Na-Azetat, pH 6,0 und 2,5 Vol. Ethanol hinzugefügt und erneut über Nacht bei -20°C gefällt.

In einer kühlbaren Eppendorf-Zentrifuge werden die Tubes 30 min bei 14000 rpm und -10°C zentrifugiert. Nachdem man den Überstand dekantiert hat, wäscht

man das Pellet zweimal mit 70 %-igem Ethanol, trocknet es und löst es (auf Eis) in 100 μl DEPC- H_2O .

Zum Schluß quantifiziert man die gewonnene RNA erneut bei A_{260} . Eine Qualitätskontrolle erhält man einerseits durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel (Methode nach 3.3) und durch den Quotienten der Absorption bei A_{260} und A_{280} , welcher zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte. Die RNA-Konzentration wurde nach folgender Gleichung bestimmt:

$$C = A_{260} \cdot E \cdot V \quad (3.1)$$

- C: Konzentration der RNA in $\mu\text{g}/\text{ml}$
 A_{260} : Absorption bei 260 nm
E: 40 $\text{ng}/\mu\text{l}$ Extinktionskoeffizient für RNA
V: Verdünnung des Meßansatzes

Um Degradation zu vermeiden, wird die RNA bei -80°C gelagert.

3.2 Aufbau der kompetitiven RT-PCR für den CFTR und HK1

Viele Gene sind auf mRNA-Ebene so niedrig exprimiert, daß sie mit traditionellen Methoden, wie z.B. Northern-Blot-Hybridisierung, nicht zu quantifizieren sind. In diesen Fällen kann man die höhere Sensitivität der Reversen Transkription – oder „Umkehr-Polymerasekettenreaktion“ (RT-PCR) nutzen.

Mit Hilfe der PCR kann man eine bestimmte Teilsequenz eines Gens so stark vermehren, daß man sie in einem Agarosegel durch Ethidiumbromid-Färbung darstellen kann. Da man aber durch PCR nur DNA amplifizieren kann, muß man die zu messende mRNA zuerst in sogenannte cDNA umschreiben (*RT-Reaktion*). RT- und PCR-Reaktionen werden im Thermocycler durchgeführt.

3.2.1 Prinzip der reversen Transkription (RT)

Wie in Abbildung 3.1 dargestellt, wird mit einer reversen Transkriptase, welche aus Retroviren stammt, die mRNA zu einem Hybrid aus mRNA und cDNA

ergänzt. Dazu sind Primer (Startermoleküle) notwendig, die komplementär an die

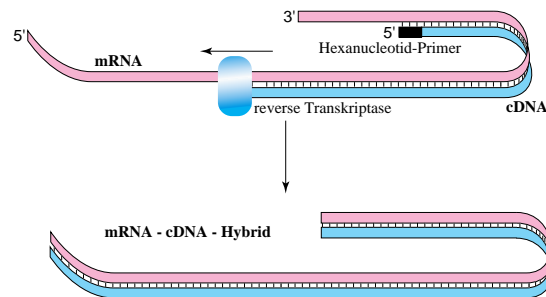


Abbildung 3.1: Prinzip der reversen Transkription

mRNA binden können. Um die gesamte mRNA umzuschreiben, verwendet man Hexanucleotid-Primer, die durch ihre Kürze zufällig an viele Stellen der mRNA hybridisieren.

3.2.2 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Eine Teilsequenz der nach 3.2.1 gewonnenen cDNA kann wie folgt amplifiziert werden. Die Abbildung 3.2 zeigt das Prinzip der PCR. Beim *1. Schritt* werden die entstandenen Doppelstränge durch Erhitzen auf 95°C getrennt. Im *2. Schritt* werden die Proben so weit abgekühlt, daß die Oligonucleotid-Primer (siehe unten) an die DNA hybridisieren können (Annealing). Beim *3. Schritt* wird auf 72°C erwärmt, da die *Taq*-DNA-Polymerase bei dieser Temperatur ihr Syntheseoptimum hat. An den Primern beginnend, ergänzt diese den DNA-Einzelstrang zu einem Doppelstrang. Dieser wird wieder bei 95°C getrennt, womit der nächste Zyklus beginnt. Theoretisch verdoppelt sich so bei jedem Zyklus die DNA-Menge. Nach 30 Zyklen würde sich die Anzahl der Zielmoleküle etwa um das 10^9 -fache erhöhen. Wegen unvollständigem Annealing, abnehmenden Konzentrationen an Desoxynucleotiden und Primern und unvollständiger Strangsynthese liegt die Vervielfachung je Zyklus *in praxi* aber etwas unter 2.

Abhängig von der Expression des Zielmoleküls, wählt man die Anzahl der PCR-Zyklen (zwischen 20 und 40). Sind über 40 Zyklen notwendig, sollten die Reaktionsbedingungen (Temperaturen, Primer, ...) geändert werden, da sich bei effektiver PCR astronomische Amplifikationen ergeben müssten.

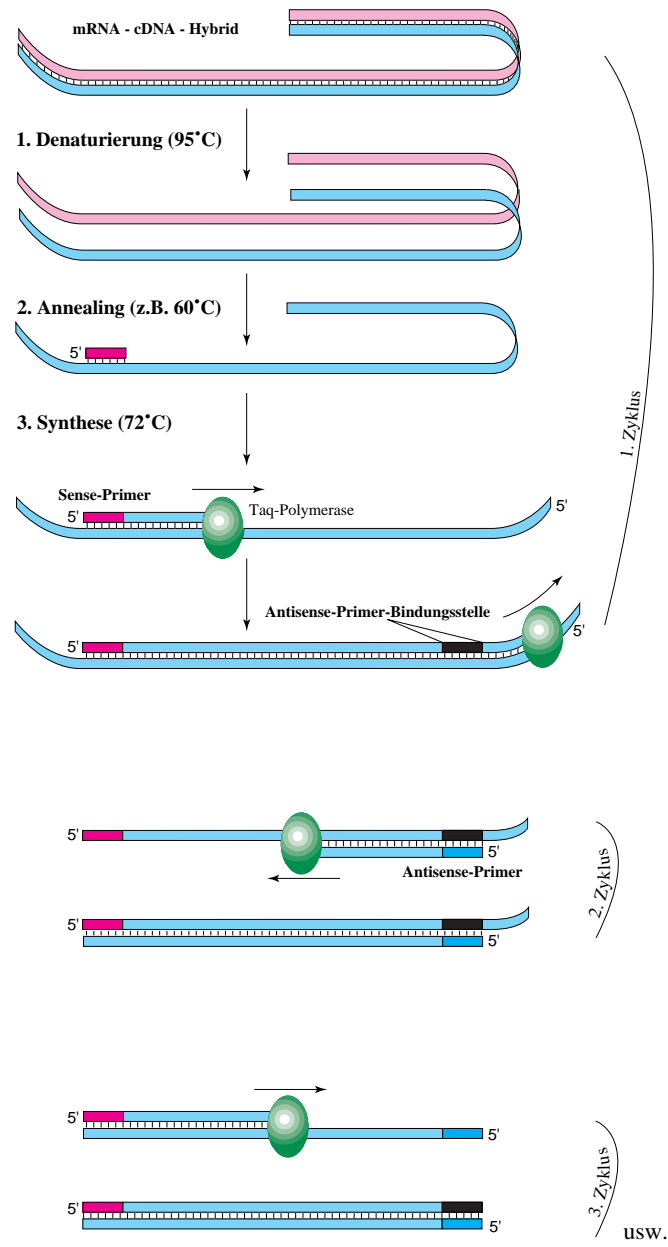


Abbildung 3.2: Prinzip der PCR – Darstellung für einen DNA-Strang

Nach Trennung über ein Agarosegel (Kapitel 3.3) kann man die DNA fotografieren und die entstandenen Negative scannen und auswerten. Weil sich die Effektivität der PCR schon durch geringe Änderungen der Reaktionsbedingungen (z.B. erhöhte Raumtemperatur) verändern kann, sind mit dieser Methode nur grobe Expressionsunterschiede zu erfassen.

3.2.3 Auswahl der Primer

Die Primer werden mittels DNA-Software (GENERUNNER) nach folgenden Kriterien ausgewählt:

- Die Primer sollten ein 300 bis 600 bp langes PCR-Produkt liefern. Diese Länge erleichtert die Auftrennung im Agarosegel und verringert die Wahrscheinlichkeit, daß die DNA-Polymerase den DNA-Strang nicht vollständig abliest. Bei der kompetitiven RT-PCR (siehe unten) würde dies möglicherweise auf Grund der Längendifferenz auch die Amplifikation von Standard und Zielsequenz unterschiedlich beeinflussen, was sehr unerwünscht ist.
- Um Verunreinigung der RNA mit genomischer DNA erkennen zu können, ist es günstig, Sense- und Antisense-Primer in zwei unterschiedliche Exone zu legen. Ein PCR-Produkt der DNA, was ja Introns enthielte, würde sich als größere Bande darstellen.
- Sense- und Antisense-Primer sollten eine gleiche, möglichst hohe Schmelztemperatur haben. Dadurch kann eine relativ hohe Annealing-Temperatur gewählt werden, wodurch Mispriming (Hybridisieren an falsche Matrize) unwahrscheinlicher wird.
- Die Primersequenzen sollten mit einer Sequenz-Datenbank verglichen werden, um eine Erzeugung unerwünschter (bekannter) PCR-Produkte auszuschließen.
- Die Primer sollten eine geringe Tendenz zur Ausbildung von Sekundärstrukturen (z.B. Haarnadelschleifen) zeigen und keine Dimere bilden.

3.2.4 Kompetitive RT-PCR

Eine sehr genaue Quantifizierung von mRNA-Transkripten ermöglicht die *Kompetitive RT-PCR*. Bei dieser werden mehreren RT-Reaktionen (z.B fünf wie in Abb. 3.3) eine konstante Menge Gesamt-RNA sowie Standardmoleküle (ebenfalls RNA) als Verdünnungsreihe zugefügt. Weil diese die gleichen Primerbindungsstel-

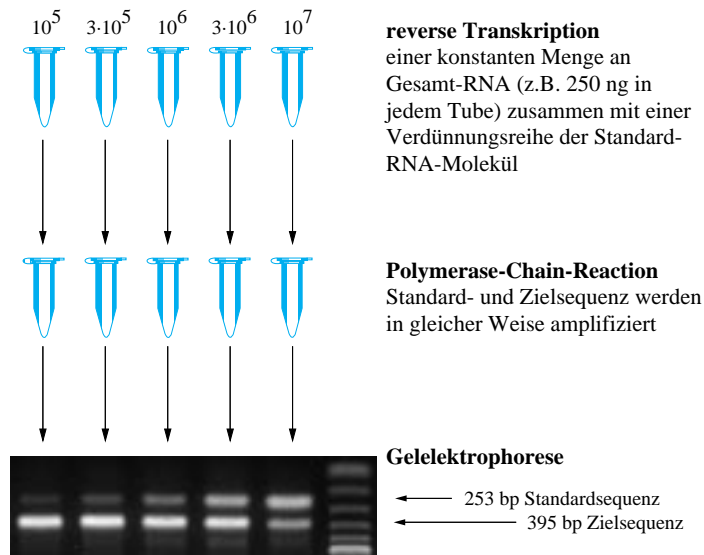


Abbildung 3.3: kompetitive RT-PCR

len wie die zu messende Zielsequenz haben, werden die Standards bei der nachfolgenden PCR-Reaktion in gleicher Weise amplifiziert. Durch einen Längenunterschied von Standard- und Zielsequenz stellen sie sich in der Gelelektrophorese als zwei unterschiedliche Banden dar. Sind die Banden gleich stark, waren auch in der RT-Reaktion ebensoviele Standard- wie Zielsequenzmoleküle vorhanden. Aus der bekannten Menge der Standards ergibt sich so die Expressionshöhe der Ziel-mRNA. Durch mathematische Verfahren lassen sich sogar absolute mRNA-Molekülzahlen ermitteln (Kapitel 3.2.5).

3.2.5 Auswertung der kompetitiven RT-PCR

Die PCR-Produkte von Standard- und Zielsequenz werden, wie in Abbildung 3.3 dargestellt, über ein Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 3.3), auf einem UV-Transilluminator fotografiert und danach mit einem Scanner (Multi-

Scan) densitometrisch quantifiziert. Die Flächenintegrale der PCR-Fragmente werden mit dem Bildanalyse-Programm *NIH Image*TM ermittelt. Die graphische Auswertung erfolgt mit dem Programm *KaleidaGraph*TM. Wegen des Längenunterschiedes von Standard- und Zielsequenz (auch Original genannt) werden die Flächenintegrale des Standards zunächst mit einem Färbefaktor korrigiert ($\frac{\text{Zielsequenz in bp}}{\text{Standardsequenz in bp}}$). Wie Abb. 3.4 zeigt, wird dann der Logarithmus des Quotienten der Flächenintegrale aus Original und Standard gegen die Anzahl der eingesetzten Standardmoleküle halblogarithmisch aufgetragen. Durch eine Kur-

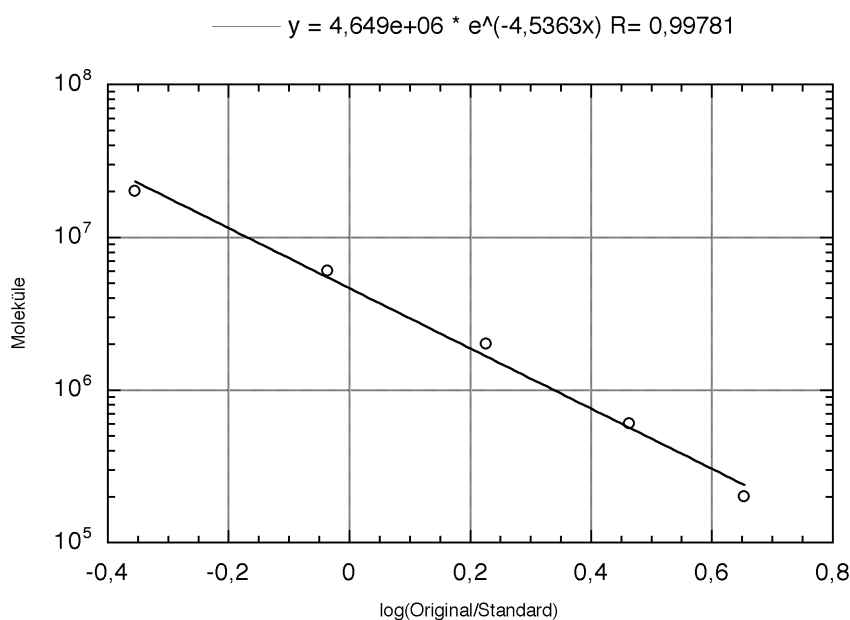


Abbildung 3.4: Graphische Auswertung der kompetitiven RT-PCR

venanpassung erhält man dann eine Formel der Form:

$$Y = a \cdot e^{b \cdot x} \quad (3.2)$$

Für $x = 0$ (Standard = Original) stellt a das gewünschte Ergebnis, nämlich die Anzahl der Original-mRNA-Moleküle in der anfangs eingesetzten Gesamt-RNA, dar.

3.2.6 Synthese der Standards für die kompetitive PCR

Für die Durchführung einer kompetitiven RT-PCR ist die Konstruktion eines internen Standards Voraussetzung. Dieser sollte folgende Eigenschaften in sich

vereinen:

- Damit der Standard genauso amplifiziert wird wie die Zielsequenz, muß er die gleichen Primer-Bindungsstellen besitzen.
- Um den Standard bei der Gelelektrophorese gut von der Zielsequenz trennen zu können, soll er sich um 100 – 150 bp von dieser unterscheiden.
- Der Standard muß als RNA vorliegen, damit er schon bei der reversen Transkription eingesetzt werden kann.

Die Konstruktion des Standards, dargestellt in Abb. 3.5, wurde mit Hilfe eines sogenannten Linker-Primer nach Förster [33] durchgeführt.

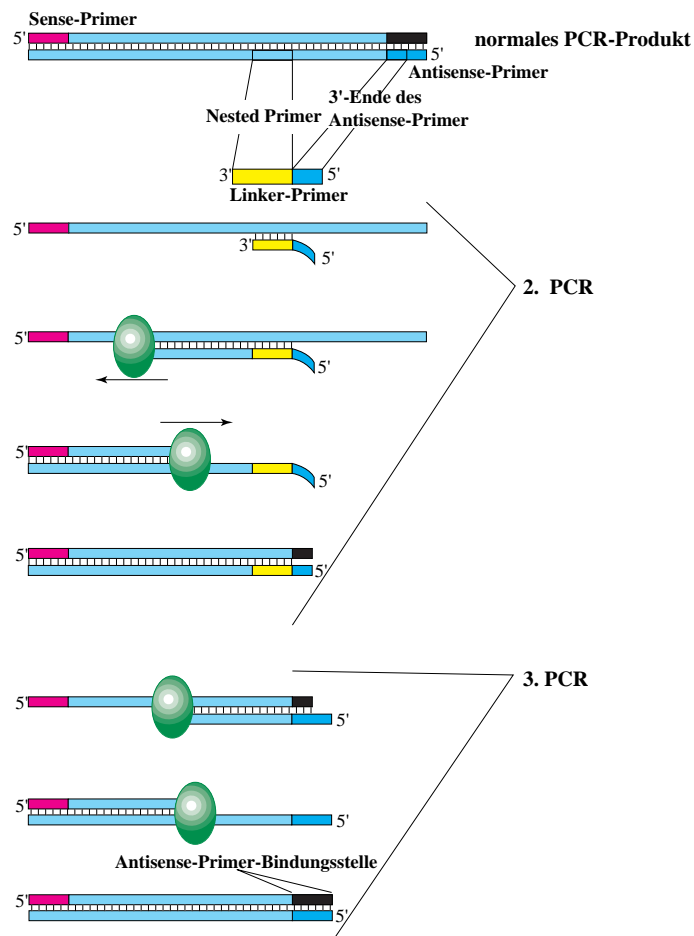


Abbildung 3.5: Synthese der internen Standards

Als erstes führt man eine normale RT-PCR mit Sense- und Antisense-Primer durch (Kapitel 3.2.7, 3.2.8). Bei der ersten Reamplifikation nimmt man 1 μl einer 1:1000 Verdünnung dieser Reaktion und statt Antisense einen *Linker-Primer*. Dieser besteht zum einen aus einer Teilsequenz innerhalb des Originals (Nested Primer), zum anderen aus einem Stück (10 bp) 3'-Ende des Antisense-Primers. Es entsteht eine verkürzte Sequenz, die am Ende ein Stück der Antisense-Primer-Bindungsstelle besitzt. Vom entstandenen Produkt setzt man wiederum 1 μl einer 1:1000 Verdünnung für eine erneute PCR ein. Diesmal werden wieder Sense- und Antisense-Primer benutzt. Die entstehende Sequenz hat nun folgende Merkmale:

1. Sie ist gegenüber dem Original um eine bestimmte Länge verkürzt.
2. Sie besitzt die gleiche Antisense-Primer-Bindungsstelle wie die Originalsequenz.

Da die PCR-Produkte der Taq-Polymerase „sticky ends“ besitzen, für die Ligation (Kapitel 3.5.1) aber „blunt ends“ notwendig sind, schließt sich noch eine PCR mit einer *Pfu*-DNA-Polymerase an. Dazu setzt man wieder 1 μl einer 1:1000 Verdünnung der vorigen Reaktion und Sense- und Antisense-Primer ein. Danach wird dieser Ansatz in einem Agarosegel aufgetrennt, das PCR-Fragment des Standards aus dem Gel eluiert (Kapitel 3.4), in ein Plasmid ligiert und in *E.coli*-Bakterien transformiert (Kapitel 3.5). Aus den transformierten Bakterien wird die Plasmid-DNA isoliert (Kapitel 3.7.1) und durch Restriktionsverdau (Kapitel 3.8) und DNA-Sequenzierung (Kapitel 3.9) charakterisiert. Von den Bakterienklonen, deren Plasmide den Standard wie erwünscht enthalten, wird die Plasmid-DNA durch Midipräparation isoliert (Kapitel 3.7.2). Diese wird anschließend durch *in-vitro*-Transkription in die Standard-RNA umgeschrieben (Kapitel 3.10). Dieser RNA-Standard kann dann in der kompetitiven RT-PCR eingesetzt werden (Kapitel 3.2.7).

3.2.7 Reaktionsbedingungen der reversen Transkription

Bei der reversen Transkription wird die Gesamt-RNA (z.B. 500 ng in 2 μl /PCR-Tube) als erstes durch 3 min Inkubation bei 70°C von Sekundärstrukturen befreit.

Danach wird diese schnell auf 1°C abgekühlt und folgende Komponenten als Mix hinzugefügt:

5x first strand buffer	5 μ l
dNTP (12,5 mM)	1 μ l
random primer (100 ng/ μ l)	4 μ l
DTT (1:10)	2,5 μ l
RNase-Inhibitor (35 U/ μ l)	0,5 μ l
Super Script TM II	0,5 μ l
DEPC-H ₂ O	auf 25 μ l auffüllen

Die Reaktion läuft nun 1 h lang bei 42°C ab und wird nachfolgend durch 5 min Inkubation bei 95°C gestoppt.

Bei der kompetitiven RT-PCR für 4 RNA-Messungen mit jeweils 5 Reaktionen (5 verschieden Standard-Konzentrationen) kann man folgendes Schema verwenden:

1. 24 PCR-Tubes werden auf Eis mit Gesamt-RNA (CFTR: 500 ng, HK1: 250 ng) bzw. Standard-RNA versehen:

St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	Gesamt-RNA
2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	10 μ l
2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	10 μ l
2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	10 μ l
2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	10 μ l

Die 5 Standard-Konzentrationen sind beim CFTR für ventrikuläre und atriale RNA $1 \cdot 10^5$, $3 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^4$, $3 \cdot 10^3$ und $1 \cdot 10^3$ Moleküle/ μ l. Für den HK1 werden beim Ventrikel-Material $1 \cdot 10^8$, $3 \cdot 10^7$, $1 \cdot 10^7$, $3 \cdot 10^6$ und $1 \cdot 10^6$ Moleküle/ μ l und beim atrialen Material $1 \cdot 10^6$, $3 \cdot 10^5$, $1 \cdot 10^5$, $3 \cdot 10^4$ und $1 \cdot 10^4$ Moleküle/ μ l eingesetzt.

2. Diese PCR-Tubes werden in einem Thermo-Cycler 3 min bei 70°C inkubiert und dann schnell auf 1°C abgekühlt.
3. Ein Master-Mix wird vorbereitet:

DEPC-H ₂ O	165 μ l
5x first strand buffer	110 μ l
dNTP (12,5 mM)	22 μ l
random primer (100 ng/ μ l)	88 μ l
DTT (1:10)	55 μ l
RNase-Inhibitor (35 U/ μ l)	11 μ l
Super Script TM II	11 μ l

Von diesem werden 110 μ l in jedes Gesamt-RNA-Tube gegeben, welche danach gut gemischt und kurz abzentrifugiert werden.

4. Von den Gesamt-RNA-Tubes werden jeweils 23 μ l in die 5 dazugehörigen Standard-Tubes überführt.
5. Die Standard-Tubes werden 1 h bei 42°C inkubiert.
6. Die RT-Reaktion wird durch Erwärmung auf 70°C für 5 min gestoppt und dann auf 1°C abgekühlt.

Die entstandenen DNA/RNA-Hybride können nun durch PCR amplifiziert werden.

3.2.8 Reaktionsbedingungen und Primer für die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Primer für die PCR wurden nach den in Kapitel 3.2.3 genannten Kriterien ausgewählt. Die errechneten Schmelztemperaturen der Primer bestimmen dabei angenähert die resultierende Annealing-Temperatur. Aus der mRNA-Expression ergibt sich die Anzahl der Zyklen bei der PCR. Die optimalen Bedingungen ermittelt man durch Austestung.

Durchführung der PCR:

Auf Eis wird in jedes PCR-Tube (0,5 μ l-Eppendorf-Tube) der entsprechende RT-Ansatz (Kapitel 3.2.7) pipettiert. Dazu kommt folgender Ansatz aus einem Master-Mix. Pro Tube:

Aqua dest.	zu 50 μ l ergänzend abzüglich RT-Ansatz
10x PCR-Puffer (mit $MgCl_2$)	5 μ l
dNTP (1 mM)	6 μ l
sense Primer (20 pmol/ μ l)	1 μ l
antisense Primer (20 pmol/ μ l)	1 μ l
Taq-Polymerase (4 U/ μ l)	0,5 μ l

Um eine Verdunstung des PCR-Ansatzes während des Programmablaufs zu vermeiden, wird jeder Ansatz mit 3 Tropfen Mineralöl überschichtet. In einem Thermo-Cycler wird folgendes Programm ausgeführt:

1. Denaturierung: 60 s bei 95°C
2. 35 (CFTR) bzw. 33 Zyklen (Kv1.4):
 - (a) Denaturierung: 30 s bei 95°C
 - (b) Annealing: 30 s bei der entsprechenden Annealing-Temperatur
 - (c) Synthese: 50 s bei 72°C (+1 s bei jedem Zyklus)
3. Endsynthese: 300 s bei 72°C
4. Kühlung: ∞ 1°C

Für den CFTR

	(5')			(3')
Primer	1	11	21	31
Sense	CAACTGGAAT	CTGAAGGCAG	GAGTCC	
Antise.	GGCTCACAGA	TCGCATCAAG	CTATCC	
Linker	CAAGCTATCC	TCTATTCTCA	TTTGGAACCA	GCGCAG

- Das resultierende PCR-Produkt reicht von Exon 16 bis Exon 18.
- Länge des PCR-Produktes: 361 bp
- Länge des Standards: 214 bp
- Annealing-Temperatur: 64°C

- 35 PCR-Zyklen
- In der PCR werden 10 μ l RT-Ansatz eingesetzt.
- *in vitro*-Transkription: Das Plasmid wird mit *Sst*II linearisiert und mit der T7-RNA-Polymerase transkribiert.
- Sequenzierung nach Sanger (Kapitel 3.9.1)

Für die Untersuchung auf Vorhandensein des Exon 5 im CFTR des humanen Herzen

	(5')		(3')
Primer	1	11	21
Sense	GGATAACAAG	GAGGAACGCT	CTATCG
Antise.	ACGCCTGTAA	CAACTCCCAG	ATTAGC

- Das resultierende PCR-Produkt reicht von Exon 4 bis Exon 6.
- Länge des PCR-Produktes mit Exon 5: 332 bp
- Länge des PCR-Produktes ohne Exon 5: 242 bp
- Annealing-Temperatur: 64°C
- 35 PCR-Zyklen
- In der PCR werden 10 μ l RT-Ansatz eingesetzt.
- Sequenzierung durch „cycle sequencing“ (Kapitel 3.9.2)

Für den HK1

	(5')		(3')
Primer	1	11	21
Sense	GGAGGCCCTG	TTGAAGTTTC	GG
Antise.	TGGGACAAGC	AAAGCAGCGA	AC
Linker	AGCAGCGAAC	GTGCCATGAC	GAGATCCCTG

- Länge des PCR-Produktes: 395 bp

- Länge des Standards: 253 bp
- Annealing-Temperatur: 62°C
- 33 PCR-Zyklen
- In der PCR werden 5 μ l RT-Ansatz eingesetzt.
- *in vitro*-Transkription: Das Plasmid wird mit *Pst*I linearisiert und mit der T3-RNA-Polymerase wird RNA transkribiert.
- Sequenzierung durch „cycle sequencing“ (Kapitel 3.9.2)

3.3 DNA-Gelelektrophorese

Molekulargewicht und Konzentration von DNA lassen sich auf einfache Weise durch Auftrennung in einem Agarosegel ermitteln. Dabei nutzt man die Tatsache, daß die Laufgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld mit zunehmender DNA-Länge abnimmt. Die optische Darstellung unter UV-Licht wird durch Färbung mit Ethidiumbromid ermöglicht. Größe und Gewicht bestimmt man durch den Vergleich mit ebenfalls aufgetragenen Molekulargewichts- und Konzentrations-Standards.

Folgende Arbeitsschritte sind notwendig:

1. In einer Mikrowelle wird Agarose in 1xTBE-Lösung (etwa 1 g Agarose auf 100 ml 1xTBE) aufgeköcht.
2. Die vollständig gelöste Agarose wird auf ungefähr 50°C abgekühlt und mit Ethidiumbromid (1,5 μ l auf 100 ml Agarose) versetzt.
3. Diese Lösung wird in eine Gelform gegossen, in die man einen Probenkamm einsetzt.
4. Das erstarrte Gel wird in eine Flachbett-Elektrophorese-Kammer gesetzt und mit wenig 1xTBE (ca. 1mm) überschichtet.
5. Die DNA wird mit Stopp-Lösung gemischt (Anteil der Stopp-Lösung etwa 15%) und in die Gel-Slots pipettiert.

6. Die Auftrennung der DNA in Richtung Anode erfolgt mit etwa 5 V/cm Elektroden- Abstand.
7. Die DNA kann auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert werden.

Diese Methode kann bei einfachen Anwendungen (Gelelektion, Qualitätskontrolle, ...) auch für RNA genutzt werden.

3.4 Elution von DNA- bzw. RNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um DNA- bzw. RNA-Fragmente nach der Elektrophorese aus einem Agarosegel zu gewinnen, gibt es verschiedene Methoden. Bei folgender benutzt man einen sogenannten Eluter:

1. Man gießt ein 1,5 ml-Eppendorf-Tube bis etwa 1 cm unter den Rand mit Agarose (3.3) aus und läßt diese erstarren (der verbleibende Raum bestimmt das Lösungsvolumen für die zu eluierenden Fragmente).
2. Damit später Strom durch das Tube fließen kann, schneidet man mit einem Skalpell in den Deckel ein Loch und entfernt mit einer Schere den Boden.
3. Das gewünschte Fragment wird aus dem Gel geschnitten und in den Eluter gesteckt. Dieser wird bis zum Rand mit TE-Puffer aufgefüllt.
4. Über die Öffnung des Eluter wird ein Stück Dialyse-Membran gelegt und danach der Deckel geschlossen.
5. Der Eluter wird in eine Elektrophorese-Kammer gelegt (Deckel zeigt in Richtung Anode) und mit 1xTBE überschichtet.
6. Man läßt die Fragmente $\frac{1}{2}$ h bei etwa 130 V aus dem Gel laufen und polt die Kammer am Schluß für 1 min um, damit die Fragmente nicht an der Dialyse-Membran hängen bleiben.
7. Unter UV-Kontrolle kann der Puffer (mit eluierten Fragmenten) entnommen und weiter verarbeitet werden.

3.5 Klonierung von PCR-Fragmenten

Um große Mengen an DNA aus PCR-Fragmenten zu erzeugen, kann man diese Fragmente durch Klonierung in bakterielle Plasmide einbringen und vermehren. Dabei muß das DNA-Fragment zuerst in einen Plasmid-Vector ligiert und dieser danach in Bakterien transformiert werden. Für die Klonierung der PCR-DNA-Fragmente (Standard-Konstrukte) wurde das pCR-ScriptTM SK(+) Cloning Kit der Firma Stratagene verwendet, welches folgende Ansprüche an die DNA-Fragmente stellt:

- Sie müssen blunt-ends besitzen - also auf beiden Seiten ohne Überhang eines Einzelstrangs enden. Deshalb wurden die Fragmente in der PCR mit der *Pfu*-DNA-Polymerase (Stratagene) amplifiziert, welche eine Proofreading-Funktion besitzt und bei der Strangsynthese blunt-ends erzeugt.
- Sie dürfen *nicht* die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease *SrfI* (5'-GCCC|GGGC-3') enthalten.

3.5.1 Ligation von PCR-Fragmenten und Plasmid

Die Ligationen wurden entsprechend dem Manual des pCR-ScriptTM SK(+) Cloning Kit durchgeführt. Das Prinzip ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Die Restriktionsendonuklease *SrfI* öffnet das Plasmid an der entsprechenden Schnittstelle und die T4-DNA-Ligase kann zum einen das Plasmid wieder schließen, zum anderen kann sie das gewünschte DNA-Fragment in das Plasmid einligieren, wodurch gleichzeitig die Schnittstelle für *SrfI* zerstört wird. Dadurch kann das Plasmid nicht mehr geöffnet werden und das gewünschte Reaktionsprodukt akkumuliert.

Arbeitsschritte:

1. Folgende Komponenten werden in ein steriles Eppendorftube pipettiert:
 - 1 μl pCR-ScriptTM cloning vector (10 ng/ μl)
 - 1 μl pCR-ScriptTM 10x reaction buffer
 - 0,5 μl rATP (10mM)

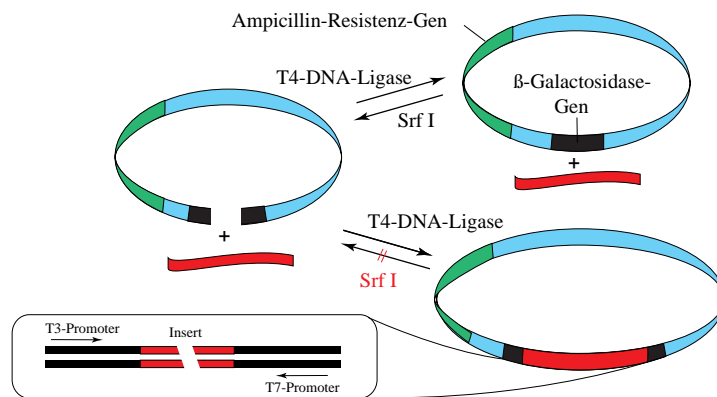


Abbildung 3.6: Prinzip der Ligation beim pCR-Script SK(+) Cloning Kit

- 2-4 μl PCR-Produkt
- 1 μl Restriktionsenzym *Srf* I
- 1 μl T4-DNA-Ligase
- steriles H_2O ad 10 μl

Eine optimale Ausbeute erhält man, wenn das Verhältnis Insert zu Vektor etwa zwischen 40:1 bis 100:1 liegt. Bei der Berechnung der Molekülzahl kann man Formel 3.3 nutzen:

$$pmol\text{Enden}/\mu\text{gDNA} = \frac{2 \cdot 10^6}{\text{Anzahl der Basenpaare} \cdot 660} \quad (3.3)$$

2. Der Reaktionsansatz wird vorsichtig gemischt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.
3. Die Reaktion wird 10 min auf 65°C erhitzt.
4. Bis zur Transformation wird das Tube auf Eis gelagert.

3.5.2 Transformation von Plasmiden in *E. coli*

Bei diesem Arbeitsschritt werden Plasmide in kompetente *E. coli*-Bakterien gebracht, damit sie, und die enthaltene cDNA, von diesen vermehrt werden können („Klonierung“).

Wie in Abbildung 3.6 dargestellt wird, enthält der pCR-ScriptTM cloning vector zum einen ein Ampicillin-Resistenzgen, wodurch die transformierten (Plasmid

enthaltenen) Bakterien im Ampicillin enthaltenden Nährmedium einen positiven Selektionsreiz erfahren. Zum anderen enthält dieser Vektor ein β -Galactosidase-Gen, das den transformierten Bakterien ermöglicht, das Substrat X-gal umzusetzen. Das Reaktionsprodukt ist blau gefärbt. In dem β -Galactosidase-Gen ist die Klonierungsstelle enthalten. Wenn ein PCR-Produkt erfolgreich in diese Stelle einligiert wurde, ist das Leseraster des Genes unterbrochen und das Bakterium enthält keine funktionstüchtige β -Galactosidase. Auf der Agar-Platte zeigen die Kolonien mit erfolgreich ligiertem Plasmid daher *keine* Färbung, während die mit „leeren“ Plasmiden blau gefärbt sind.

Die Transformation wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Die kompetenten (für die Transformation vorbehandelten) Zellen werden auf Eis aufgetaut.
2. Die Zellen werden vorsichtig gemischt und dann jeweils 40 μ l Aliquots in vorgekühlte 15-ml Falcon Tubes pipettiert.
3. Man fügt 0,7 μ l β -Mercaptoethanol hinzu und mischt vorsichtig.
4. Die Zellen werden 10 min auf Eis inkubiert, wobei alle 2 min gemischt wird.
5. Jetzt werden 2 μ l der DNA aus der Ligationsreaktion (Kapitel 3.5.1) hinzugefügt und wiederum gemischt.
6. Dieser Mix wird nun 30 min auf Eis gestellt. In dieser Zeit wird das SOC-Medium auf 42°C erwärmt.
7. Die Zellen werden für **45 s** in 42°C warmes Wasser gestellt. Die Zeitspanne ist entscheidend für die Effektivität der Transformation.
8. Die Tubes werden 2 min auf Eis gestellt.
9. 450 μ l vorgewärmtes SOC-Medium werden zugegeben und bei 37°C und etwa 180 rpm 1 h vorsichtig geschüttelt.
10. Jeweils 50, 100, 150 und 190 μ l des Transformations-Ansatzes werden auf Ampicillin-LB-Agar-Platten (mit 50 μ l 50 mg/ml X-gal bzw. 25 μ l 100 mM IPTG je Platte) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag kann man die positiven weißen Kolonien selektieren und einzeln in ampicillinhaltigem LB-Medium weiter vermehren. Die Plasmid-DNA kann dann, wie in den Kapiteln 3.7.1 und 3.7.2 beschrieben ist, präpariert werden.

3.6 Präparation von kompetenten *E.coli*

Eine einfache und effektive Methode zur Präparation kompetenter Bakterien (Zellen, die bereit sind, Plasmid-DNA aufzunehmen) ist die nach C.T. Chung *et al.* [17], bei der die Zellen in einer Lösung sowohl gelagert als auch transformiert werden können. Man benötigt lediglich LB-Medium, eine TSS-Lösung und TSS mit 20 mM Glucose.

Präparation

Die Zellen (verschiedene *E.coli*-Stämme sind möglich, in diesem Fall DH5 α) werden wie folgt präpariert:

1. Eine frische Übernacht-Kultur wird in vorgewärmtem LB-Medium 1:100 verdünnt und auf einem Schüttler mit 225 rpm und 37°C inkubiert, bis die Bakterien-Suspension einen OD₆₀₀-Wert von 0,3 bis 0,4 hat.
2. Die Zellen werden jetzt mit einem gleich großen Volumen eisgekühltem 2x TSS versetzt. Alternativ kann man die Zellen 10 min bei 1000 rpm zentrifugieren und den Überstand durch 1x TSS ersetzen.
3. Die nunmehr kompetenten *E.coli* werden in Eppendorf-Tubes (je 100 μ l) aliquotiert und entweder gleich verwendet oder in flüssigem N₂ schockgefroren. Man kann die Zellen bei -80°C funktionsfähig aufbewahren.

Transformation

Die Transformation der kompetenten Zellen mit der gewünschten Plasmid-DNA wird in 4 Schritten durchgeführt.

1. Die kompetenten Zellen werden auf Eis langsam aufgetaut, mit etwa 0,1 bis 1 ng Plasmid-DNA versetzt und vorsichtig vermischt.

2. Das Gemisch aus DNA und Zellen wird 5 - 60 min auf Eis inkubiert.
3. Man fügt 900 μl TSS mit 20 mM Glucose hinzu und inkubiert 1 h bei 37°C und 180 rpm.
4. Die positiven Klone werden nach der gleicher Weise selektiert, wie es in Kapitel (3.5.2) beschrieben wird.

3.7 Plasmid-DNA-Präparation

3.7.1 DNA-Mini-Präparation

Plasmid-DNA aus kleineren Bakterienmengen kann sehr einfach entsprechend einer abgewandelten Methode nach Holmes [39] isoliert werden.

Am Vortag werden 12 ml-Greiner-Röhrchen mit etwa 5 ml LB-Medium (mit 100 μg Ampicillin / ml) mit den gewünschten Einzelkolonien angeimpft und über Nacht auf einem Schüttler bei 225 rpm und 37°C kultiviert.

1. Etwa 1,5 ml der Übernachtskultur werden in einem Eppendorf-Tube 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert.
2. Der Überstand wird dekantiert und das Bakterienpellet in 200 μl STET-Puffer resuspendiert.
3. Man setzt 15 μl Lysozym-Stammlösung ($10 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$) zu, mischt und inkubiert 10 min bei Raumtemperatur.
4. Nach 1 min Inkubation bei 95°C wird bei 14000 rpm 10 min sedimentiert.
5. Das entstandene Proteinpellet wird mit einem sterilen Holzstäbchen entfernt.
6. Unter Zugabe von 20 μl 3 M NaCl-Lösung und 200 μl Isopropanol wird die DNA 20 min bei 4°C gefällt und 10 min bei 14000 rpm sedimentiert.
7. Nach Absaugen des Überstandes und Zugabe von 600 μl 70%igem Ethanol wird 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet 5 min bei Raumtemperatur getrocknet. Das DNA-Pellet kann nun

entweder in 40 μ l 1xTE pH 8,0 oder in H₂O gelöst werden (TE kann unter Umständen durch Bindung von Ionen nachfolgende Reaktionen behindern).

3.7.2 DNA-Midi-Präparation

Für die Präparation größerer Plasmid-Mengen aus Bakterienkulturen wurde das Plasmid-Midi-Kit der Firma QIAGEN verwendet. Man zentrifugiert 25 ml einer Übernachtskultur 10 min bei 6000x g und dekantiert den Überstand. Das entstandene Pellet wird in 4 ml Puffer P1 resuspendiert (*Achtung*: Soll die Plasmid-DNA später in einer *in vitro*-Transkription eingesetzt werden, verzichtet man auf den Zusatz von RNase A zu P1). Sind keine Zellaggregate mehr zu sehen, werden 4 ml Puffer P2 zugegeben, vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml gekühltem Puffer P3 mischt man wiederum vorsichtig und inkubiert 20 min auf Eis. Anschließend zentrifugiert man 30 min bei über 15000x g und überführt den Überstand in ein neues Röhrchen, welches man noch einmal 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer QIAGEN-100-Säule, die vorher mit 4 ml Puffer QBT equilibriert wird, gereinigt. Man fällt die DNA mit 0,7 Vol Isopropanol und sedimentiert bei etwa 16000x g und 4°C. Das Pellet wird zweimal mit 2 ml 70 %-igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in etwa 40 μ l sterilem H₂O gelöst. Die DNA-Konzentration kann man durch Gelelektrophorese (Kapitel 3.3) oder Messung der optischen Dichte gemäß Kapitel 3.1.2 (allerdings mit $E=50$ ng/ μ l) bestimmen.

3.8 DNA-Restriktion

Eine der am häufigsten angewendeten molekularbiologischen Methoden ist der DNA-Restriktionsverdau mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen. Diese schneiden DNA innerhalb bzw. in der Nähe ihrer spezifischen Erkennungssequenz. Durch die Auswahl bestimmter Restriktionsenzyme kann man z.B. definierte DNA-Fragmente erzeugen oder ein DNA-Stück auf das Vorhandensein der entsprechenden Erkennungssequenzen untersuchen. Durch Gelelektrophorese (3.3) kann man die Produkte sichtbar machen und gegebenenfalls erwünschte DNA-Banden eluieren (3.4). Der typischer Restriktionsansatz:

DNA	zu schneidende Menge
10x Restriktiospuffer	$\frac{1}{10}$ des Ansatzvolumens
Restriktionsenzym(e)	1 U/ μ g eingesetzter DNA
steriles H ₂ O	zur Einstellung des Ansatzvolumens

Normalerweise verdaut man 1 h bei 37°C mit 1 U/ μ g DNA. Um eine vollständige Restriktion abzusichern, wird 2 h mit etwa 3 U/ μ g DNA inkubiert. Nach der Restriktion werden die Restriktionsenzyme durch 2-minütiges Erhitzen auf 95°C inaktiviert. Danach kann die DNA in einem Agarosegel (Kapitel 3.3) aufgetrennt werden.

3.9 DNA-Sequenzierung

Die erfolgreiche Klonierung von DNA- bzw. cDNA-Fragmenten kann man durch verschiedene Sequenzierungstechniken nachweisen. Nachstehende Methoden wurden angewandt.

3.9.1 Sequenzierung nach Sanger

Bei der Sequenzreaktion nach Sanger [83] (unter Verwendung des T7-SequencingTM Kit Pharmacia) wird die doppelsträngige DNA denaturiert. Dann werden Sequenzierungsprimer angelagert („Annealing“) und danach durch die T7-Polymerase ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert. Dabei werden radioaktiv markierte Nukleotide eingebaut. In vier getrennten Ansätzen ist jeweils ein dNTP (A, C, G oder T) zu einem gewissen Teil durch das entsprechende ddNTP (Didesoxiribonukleotid) ersetzt. Diese wirken beim Einbau als Terminatoren und beenden die Strangsynthese an den durch die DNA-Sequenz vorgegebenen Stellen. Man erhält ein statistisches Gemisch unterschiedlich langer DNA-Fragmente. Das Verhältnis von dNTP zu ddNTP ist für einen Short-Mix (mehr ddNTP) und für einen Long-Mix (weniger ddNTP) optimiert. Die vier Ansätze werden nebeneinander in einem Sequenzgel aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht.

Die Sequenzierung wird in nachstehenden Schritten durchgeführt:

Vorbereitung der Sequenzgelpplatten Die Glasplatten werden mit *Aqua dest.* und danach mit 70 %-igem Ethanol gereinigt. Die gelbindende Platte wird mit einer Lösung aus 200 μl 10 %-iger Essigsäure, 28 μl Binding-Silan und 4 ml Ethanol (96 %) behandelt. Die nichtbindende Platte behandelt man mit 5 ml Repell-Silan und poliert sie anschließend mit 70 %-igem Ethanol. hiernach wird die Gelkammer vorbereitet.

Sequenzgel 25,2 g Harnstoff werden mit 6 ml 10x TBE-Puffer versetzt, mit *Aqua dest.* auf 51 ml aufgefüllt und unter leichter Erwärmung (max. 60°C) gelöst. Diese Lösung wird filtriert und 9 ml einer 40 %-igen (w/v) Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung zugegeben. Die Polymerisationsreaktion wird mit 300 μl 10 %-igem Ammoniumpersulfat und 60 μl TEMED gestartet. Die Lösung wird kurz intensiv gemischt und anschließend blasenfrei in die Gelkammer gegossen. Nach ungefähr 2 h ist die Polymerisation des Gels abgeschlossen.

Denaturierung der doppelsträngigen DNA Für jede Sequenzreaktion werden 32 μl Template-DNA (1,2-2 μg) mit 8 μl 2 M NaOH gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 7 μl 3 M Naazetat pH 4,5 und 4 μl H₂O zugefügt und vermischt. Nach Zusatz von 120 μl Ethanol wird die DNA 20 min auf Trockeneis gefällt und danach 15 min bei 10000x g und 4°C sedimentiert. Das entstandene Pellet wird mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 μl H₂O aufgenommen.

Annealing Dem denaturierten Template (10 μl) setzt man 2 μl (5-10 pmol) des entsprechenden Sequenzierungs-Primers (T3 oder T7) und 2 μl Annealing-Puffer zu, mischt und zentrifugiert kurz ab. Dann inkubiert man 5 min bei 65°C, 10 min bei 37°C und 5 min bei Raumtemperatur. Danach wird kurz abzentrifugiert.

Labelling-Reaktion Der Annealing-Reaktion (14 μl) werden 3 μl Labelling-Mix (Mix dATP), 2 μl verdünnte T7-Polymerase (1,5 U/ μl - entsprechend den Angaben des Herstellers) und 1 μl α -³⁵S-dATP (10 μCi) zugefügt. Danach wird gemischt, kurz zentrifugiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Termination Hierfür werden 4 Eppendorf-Tubes mit den jeweiligen ddNTP 1 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden je Tube 4,5 μ l der Labelling-Reaktion zugegeben und 5 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von jeweils 5 μ l Stop-Lösung wird die Reaktion beendet.

Sequenzgel-Elektrophorese Durch einstündigen Vorlauf bei 1500 V wird das Sequenzgel auf etwa 60°C vorgewärmt. Als Laufpuffer wird 1x TBE verwendet. Vor dem Auftragen müssen die Proben bei 95°C 2 min denaturiert werden. Danach werden je Slot 2 μ l Probe aufgetragen. Der verbleibende Rest kann für einen erneuten Lauf bei -20°C aufbewahrt werden. Die Elektrophorese erfolgt ebenfalls bei 1500 V.

Fixierung des Sequenzgels Nach der Elektrophorese werden die Gelplatten getrennt. Das an der bindenden Glasplatte haftende Gel wird in 10 %-iger Essigsäure 15 min fixiert. Anschließend wird es 15 min gewässert und über Nacht getrocknet.

Autoradiographie Auf das getrocknete Sequenzgel wird ein Röntgenfilm gelegt und in einer Röntgen-Kassette exponiert. Der Film wird entwickelt und ausgewertet.

3.9.2 Automatische Sequenzierung („Cycle sequencing“)

Diese sehr effektive Methode wird mit einem automatischen Sequenzer von ABI PrismTM unter Verwendung des ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit der Perkin-Elmer Corporation durchgeführt. Wie bei der Methode nach Sanger (Kapitel 3.9.1) kommen auch hier Didesoxiribonukleotide zum Einsatz, wobei jede der vier Basen unterschiedlich fluoreszenzmarkiert ist und so bei verschiedenen Wellenlängen ihr Absorptionsmaximum hat. Dadurch können alle vier Nukleotide der Sequenz aus einer Sequenzreaktion ausgelesen werden und eine radioaktive Markierung erübrigt sich. Die Sequenzreaktion wird in einem Thermo-Cycler entsprechend dem Manual durchgeführt.

3.10 In-vitro-Transkription

Bei der *in vitro*-Transkription wird mit Hilfe einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase entsprechend einer DNA-Matrize RNA synthetisiert. Als Matrize dient der pCR-ScriptTM cloning vector mit dem enthaltenen cDNA-Insert. Wie in Abbildung 3.6 zu sehen, besitzt der Vektor für die T3- und die T7-RNA-Polymerase jeweils einen Promotor. Im RNA Transcription Kit (Stratagene) sind beide Polymerasen enthalten. Da die Richtung der Insertion durch blunt-end-ligation (Kapitel 3.5.1) zufällig ist, muß man diese durch Sequenzierung (Kapitel 3.9) ermitteln. Es wird dann die RNA-Polymerase eingesetzt, die sense mRNA synthetisiert (Reaktionsbedingungen für CFTR und HK1 in Kapitel 3.2.8 angegeben). Die *in vitro*-Transkription kann in nachstehenden Schritten durchgeführt werden:

1. Um mRNA-Moleküle mit einer definierten Länge zu erhalten, wird die Plasmid-DNA (etwa 1 μg) hinter dem Insert mit einem Restriktionsenzym geschnitten (Kapitel 3.8), wodurch die RNA-Polymerase an dieser Stelle die Synthese abbricht. Man wählt ein Restriktionsenzym aus, das *nicht* im DNA-Insert schneidet und *blunt-ends* oder *5'-Überhänge* erzeugt, um unspezifische Starts der RNA-Polymerasen zu verhindern.
2. Der Restriktionsverdau wird dann im Agarosegel aufgetrennt (Kapitel 3.3) und das linearisierte Plasmid eluiert (Kapitel 3.4). Das Lösungsvolumen soll etwa 600 μl betragen.
3. Das Plasmid wird folgendermaßen von Proteinen und Gelresten gereinigt:
 - (a) Zu den 600 μl Plasmid gibt man 300 μl *puffergesättigtes* Phenol (für DNA) und 300 μl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1). Dieser Mix wird 3 min geschüttelt und dann 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert.
 - (b) Die wässrige Überphase wird in ein neues Tube überführt und mit 600 μl Chloroform-Isoamylalkohol versetzt. Danach wird geschüttelt und zentrifugiert.
 - (c) Den vorangehenden Schritt wiederholt man einmal.
 - (d) Die Überphase wird in ein neues Tube gegeben und zum Fällen $\frac{1}{10}$ Vol Ammoniumazetat und 0,7 Vol Isopropanol hinzugefügt.

Das Plasmid wird 1 h bei -20°C gefällt und danach 1 h bei -5°C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das entstandene Pellet 2 mal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen (500 μl Ethanol ins Tube geben und 5 min bei 14000 rpm zentrifugieren). Anschließend wird das Pellet getrocknet und in 13 μl DEPC- H_2O gelöst. Mit einer Gelelektrophorese (Kapitel 3.3) ermittelt man Qualität und Konzentration.

4. Für die eigentliche *in vitro*-Transkription werden folgende Komponenten in ein Tube gegeben.
 - 5 μl 5 x Transkriptions-Puffer
 - 1 μl rATP (10 mM)
 - 1 μl rGTP (10 mM)
 - 1 μl rCTP (10 mM)
 - 1 μl rUTP (10 mM)
 - 0,5 μl RNase-Inhibitor
 - 1 μl DTT (0,75 M) (*wichtig*: muß aliquotiert werden, da die Wirksamkeit des DTT bei wiederholtem Auftauen und Einfrieren *stark* abnimmt)
 - 10 U T3- bzw. T7-Polymerase
 - ca. 1 μg linearisiertes Plasmid
 - ad 25 μl DEPC- H_2O

Der Ansatz wird für 1 h bei 37°C inkubiert, danach im Gel aufgetrennt (Kapitel 3.3) und anschließend die gewünschte RNA-Bande eluiert (Kapitel 3.4).

5. Die RNA wird, wie im Punkt 3 beschrieben, gereinigt. Allerdings nimmt man statt puffergesättigtem Phenol *wassergesättigtes* Phenol (für RNA). Anschließend wird die RNA auf Eis in 25 μl DEPC- H_2O aufgenommen.
6. 1 μl der RNA wird zur Kontrolle auf ein Gel aufgetragen und 3 μl dienen der Konzentrationsbestimmung (Doppelbestimmung) durch Messung der optischen Dichte (Berechnung nach Gleichung 3.1).

7. Die RNA kann nun aliquotiert und bei -80°C gelagert werden.
8. Die Bestimmung der Anzahl der RNA-Transkripte pro μl kann gemäß der Formel 3.4 nach Thein und Wallace erfolgen:

$$C = \frac{A_{260} \cdot V \cdot N_A}{(a \cdot A + c \cdot C + g \cdot G + t \cdot T) \cdot 1000} \quad (3.4)$$

C	Anzahl der RNA-Moleküle pro μl
A_{260}	gemessene UV-Lichtabsorbtion
V	Verdünnungsfaktor des Meßansatzes
N_A	Avogadro-Konstante ($N_A = 6,0221367 \cdot 10^{23} \text{mol}^{-1}$)
A, C, G, T	Absorptionskoeffizienten der Nukleotidbasen (A=15200; C=7050; G=12010; T=8400)
a, c, g, t	Anzahl der Nukleotidbasen

Das Ergebnis dient später als Grundlage für die Verdünnungsreihe der kompetitiven RT-PCR (Siehe Kapitel 3.2.7).

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 „Splicing“ des Zystische Fibrose Transmembranregulator (CFTR) im menschlichen Herzen

Das primäre Transkript des CFTR unterliegt in Kardiomyozyten verschiedener Spezies einem alternativen splicing. Es gibt Splicing-Varianten, die das Exon 5 enthalten und solche, denen es fehlt. Um die Situation im menschlichen Herzen zu prüfen, wurde ein Primer-Paar gewählt, dessen PCR-Produkt das Exon 5 überspannt – also von Exon 4 bis Exon 6 reicht. Mit den angegebenen Primern muß das Exon 5-positive PCR-Produkt 332 bp lang sein, das Exon 5-negative dagegen nur 242 bp. Die mRNA aus 14 rechten Atrien und 6 linken Ventrikel wurde revers transkribiert und die cDNA durch Polymerasekettenreaktion (PCR) unter den in Kapitel 3.2.8 angegebenen Bedingungen vervielfacht. Das Agarosegel in Abb. 4.1

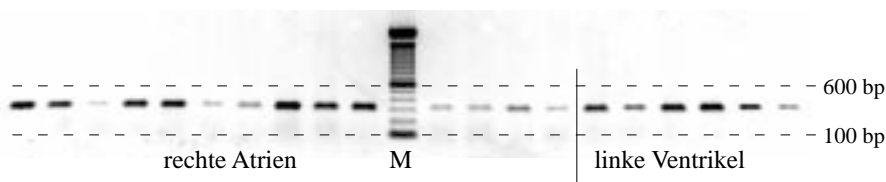


Abbildung 4.1: Agarose-Gelelektrophorese von PCR-Fragmenten nach Amplifikation mit CFTR-spezifischen Primern, die das Exon 5 überspannen. Es zeigt sich ausschließlich Exon 5-positive PCR-Produkte.

zeigt sowohl in den Atrien als auch in den Ventrikel ausschließlich ein PCR-Fragment von ca. 330 bp. Die Nukleotidsequenzanalyse durch „cycle sequencing“ bestätigte, daß es sich um das erwartete Fragment des epithelialen CFTR handelte, welches das Exon 5 enthält [79]. Aus den Experimenten der kompetitiven PCR unter ganz ähnlichen Bedingungen (Vgl. Kap. 3.2.4, 3.2.8 und Abb. 3.3) geht hervor, daß zwei DNA-Stränge unterschiedlicher Länge und Konzentration bis zu einem Konzentrationsverhältnis von 1:30 im Gel noch als Bande gut zu erkennen sind. Daraus folgt, daß der Anteil an Exon 5-negativer mRNA höchstens 3,3% betragen könnte (wegen der geringeren Länge des Exon 5-negativen PCR-Produkts wäre eher dieses bei der Polymerasekettenreaktion begünstigt). Die Exon 5-positive Variante ist also im rechten Atrium und linken Ventrikel des Menschen dominierend.

4.2 Quantifizierung der mRNA-Expression des CFTR im menschlichen Herzen

4.2.1 Rechte Atrien

Von 63 aufeinanderfolgenden Patienten, die sich einer Herzoperation unterziehen mußten, wurde die mRNA-Konzentration für den CFTR in Myokard-Proben des rechten Atriums durch kompetitive PCR (Kap. 3.2.4) bestimmt. Die Gesamt-RNA wurde dabei aus Herzgewebe des rechten Herzhohrs (Teil des rechten Atriums) isoliert (Kap. 3.1.2), welches beim Anschluß des venösen Katheters der Herz-Lungen-Maschine entfernt wurde.

In Abb. 4.2 ist die mRNA-Expression des CFTR in Abhängigkeit vom Schweregrad der Herzinsuffizienz – eingeteilt nach der NYHA-Klassifikation – dargestellt. Atriales Material von gesunden Probanden stand nicht zur Verfügung. Die mRNA-Expression im rechten Atrium zeigt keine signifikante Abhängigkeit vom Schweregrad der Herzinsuffizienz (NYHA 1: 36 ± 7 amol/mg RNA; $n = 8$, NYHA 2 bis 3: 42 ± 8 amol/mg RNA; $n = 29$, NYHA 3–4 und 4: 45 ± 8 amol/mg RNA; $n = 26$). Betrachtet man nur die Patienten, die keine Vasodilatoren wie Ca^{2+} -Antagonisten oder ACE-Hemmer erhielten (Abb. 4.3), sinkt die CFTR-Expression bei schwerer Herzinsuffizienz, ohne jedoch das Signifikanzniveau zu

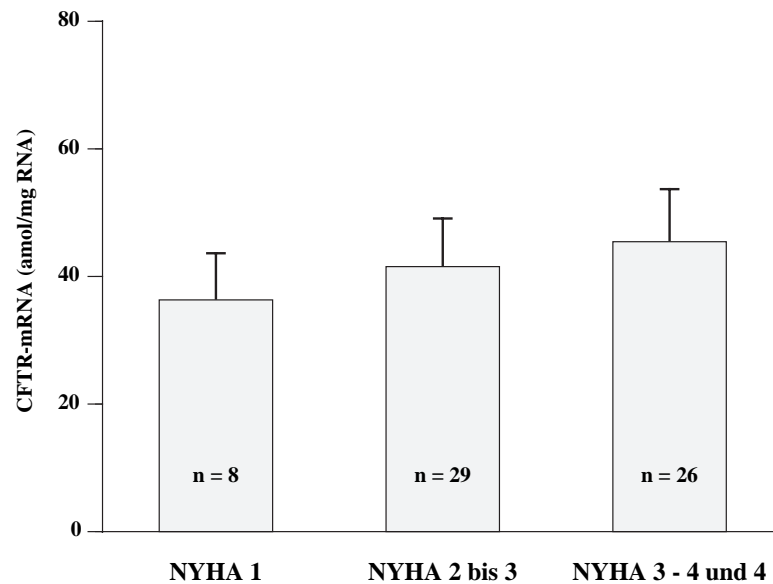


Abbildung 4.2: CFTR-Expression im rechten Atrium in Abhängigkeit vom Schweregrad der Herzinsuffizienz (Mittelwert und Mittelwertabweichung)

erreichen (NYHA 1 bis 3: 42 ± 24 amol/mg RNA; $n = 21$, NYHA 3–4 und 4: 26 ± 15 amol/mg RNA; $n = 6$).

In Abb. 4.4 wird die CFTR-mRNA-Expression von Patienten ohne Vasodilatator-Therapie mit der Expression von Patienten mit ACE-Hemmer-Medikation und der Expression des CFTR von Patienten, die eine andere Vasodilatator-Therapie (hauptsächlich Ca^{2+} -Antagonisten) erhielten, verglichen. Bei einer Therapie mit Ca^{2+} -Antagonisten ist die CFTR-Expression im Atrium (33 ± 14 amol/mg RNA; $n = 8$) gegenüber der Expression bei Patienten ohne Vasodilatator-Therapie (38 ± 5 amol/mg RNA; $n = 27$) nicht verändert. Patienten mit ACE-Hemmer-Therapie zeigen dagegen eine signifikant höhere Expression der CFTR-mRNA (59 ± 9 amol/mg RNA; $n = 16$; $p < 0,05$). Dieser Effekt beruht nicht auf einer Besserung des Herzinsuffizienz-Schweregrades, denn auch in der Gruppe der Patienten mit schwerster Herzinsuffizienz (NYHA 3 - 4 und 4 – dargestellt in Abb. 4.5) ist die CFTR-mRNA unter ACE-Hemmer-Therapie (59 ± 10 amol/mg RNA; $n = 12$) gegenüber der Gruppe ohne ACE-Hemmer signifikant erhöht (33 ± 13 amol/mg RNA; $n = 12$; $p < 0,05$).

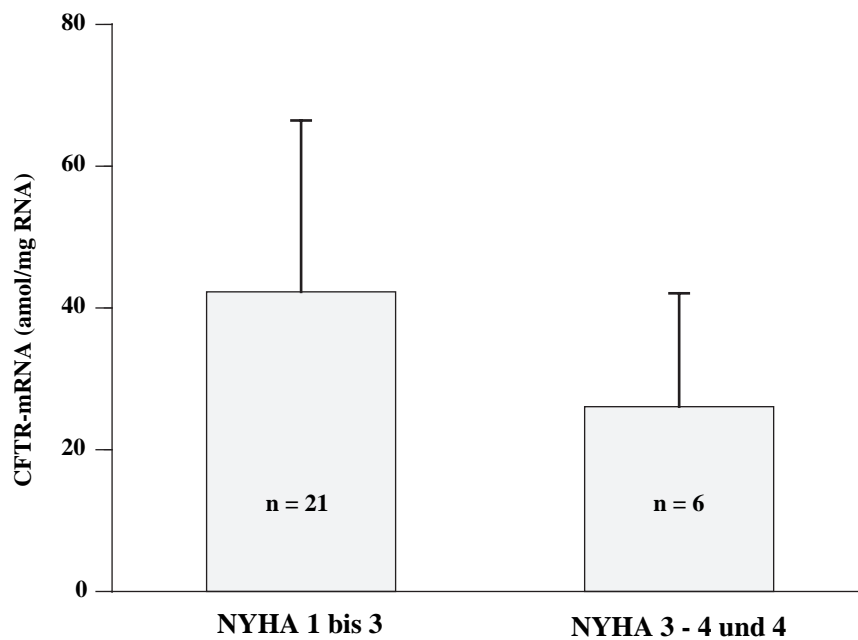


Abbildung 4.3: CFTR-mRNA-Expression im rechten Atrium in Abhängigkeit von der Herzinsuffizienz bei Patienten ohne Vasodilatator-Therapie (Mittelwert und Mittelwertabweichung)

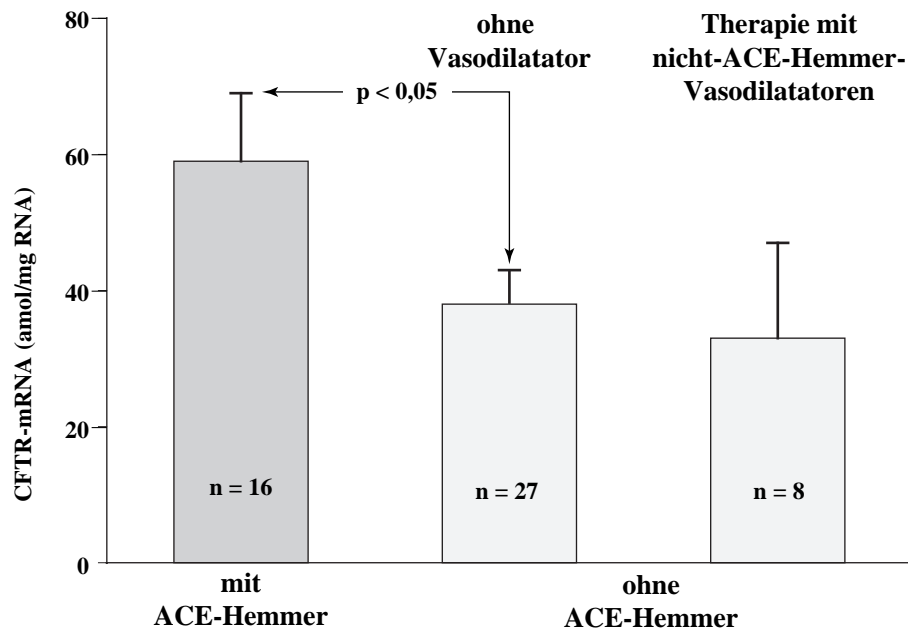


Abbildung 4.4: CFTR-mRNA-Expression im rechten Atrium in Abhängigkeit von der Vasodilatator-Therapie (Mittelwert und Mittelwertabweichung)

4.2.2 Linke Ventrikel

Die mRNA-Expression des CFTR wurde in insgesamt 21 Ventrikelproben von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz bestimmt, die nach einer Herztransplantation aus den explantierten Herzen gewonnen wurden. Die nicht-insuffizienten Myokardproben stammten aus Spenderherzen, die nicht transplantiert werden konnten.

In den linksventrikulären Herzproben der nicht-insuffizienten Spenderherzen betrug die mRNA-Expression des CFTR 52 ± 10 amol/mg Gesamt-RNA ($n = 7$). In den insuffizienten linken Ventrikel, die nicht unter ACE-Hemmer-Behandlung vor der Transplantation standen, war die CFTR-mRNA signifikant vermindert (24 ± 9 amol/mg Gesamt-RNA; $n = 5$; $p < 0,05$). Herzen von Patienten unter ACE-Hemmer-Therapie hatten dagegen eine signifikant höhere CFTR-mRNA-Konzentration (56 ± 8 amol/mg Gesamt-RNA; $n = 9$; $p < 0,05$), die annähernd auf dem Niveau der gesunden linken Ventrikel lag.

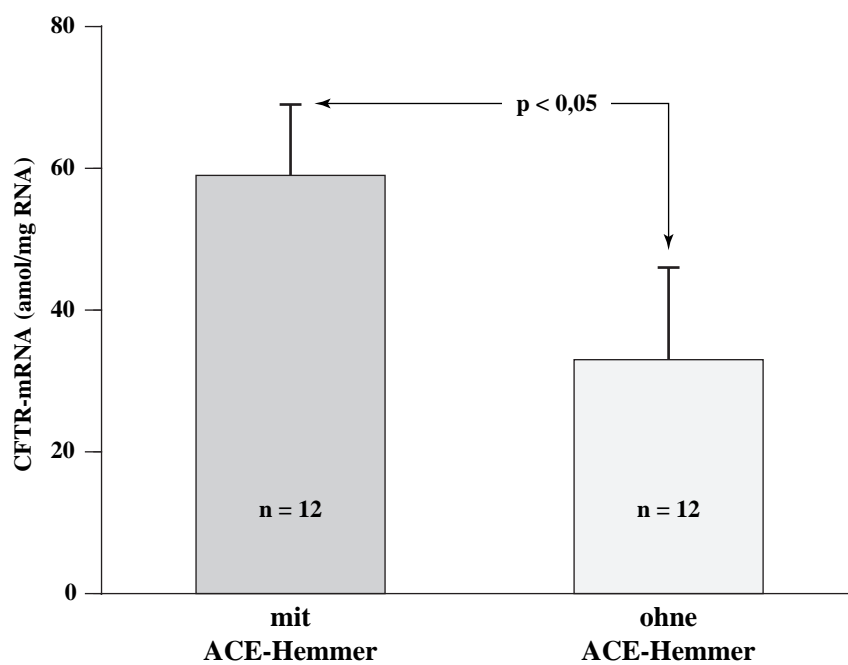


Abbildung 4.5: CFTR-Expression im rechten Atrium bei schwerer Herzinsuffizienz NYHA 3 - 4 und 4 (Mittelwert und Mittelwertabweichung)

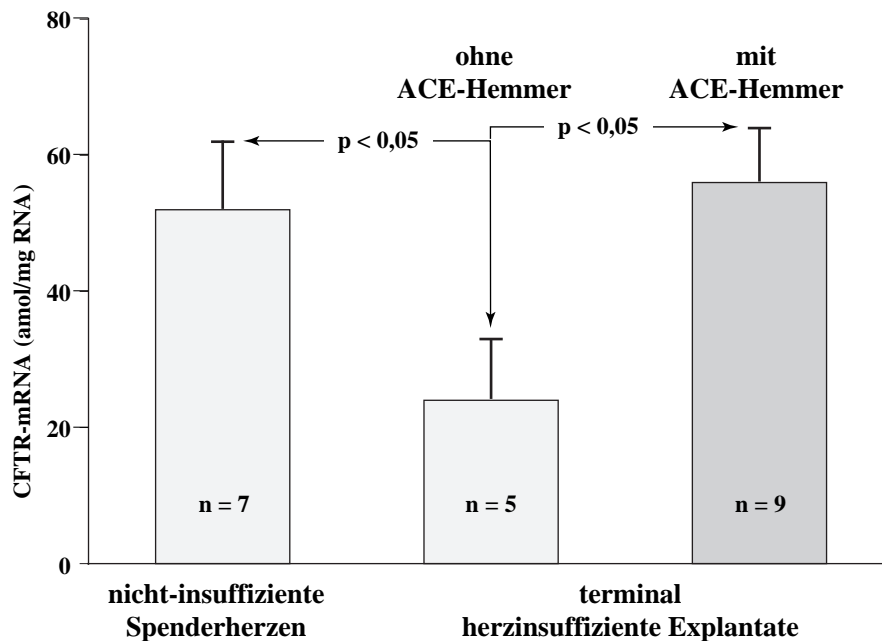


Abbildung 4.6: CFTR-mRNA-Expression im linken Ventrikel (Mittelwert und Mittelwertabweichung)

4.3 Quantifizierung der mRNA-Expression des Kalium-Kanals Kv1.4 in menschlichen Herzen

4.3.1 Rechte Atrien

Wie beim CFTR-Cl⁻-Kanal wurde auch beim Kv1.4-K⁺-Kanal die mRNA-Expression durch kompetitive PCR bestimmt. In Abb. 4.7 ist die Kv1.4-mRNA-Expression in rechten Atrien dargestellt. Leider standen zum Zeitpunkt der mRNA-Bestimmung nur 3 Proben von Patienten mit NYHA 1 zur Verfügung, so daß sich über eine Regulation keine Aussagen machen lassen (NYHA 1: 1,5 ± 0,8 amol/μg RNA; n = 3, NYHA 3 bis 4 ohne ACE-Hemmer: 0,61 ± 0,41 amol/μg RNA; n = 15, NYHA 3 bis 4 mit ACE-Hemmer: 0,95 ± 0,55 amol/μg RNA; n = 14). Es fällt jedoch auf, daß die Expression des Kv1.4 auch in den insuffizienten (NYHA 3 - 4) rechten Atrien stark variiert (hohe Mittelwertabweichung). Die mittlere mRNA-Expression ist im Atrium 0,85 amol/μg RNA (n = 32) und damit deutlich

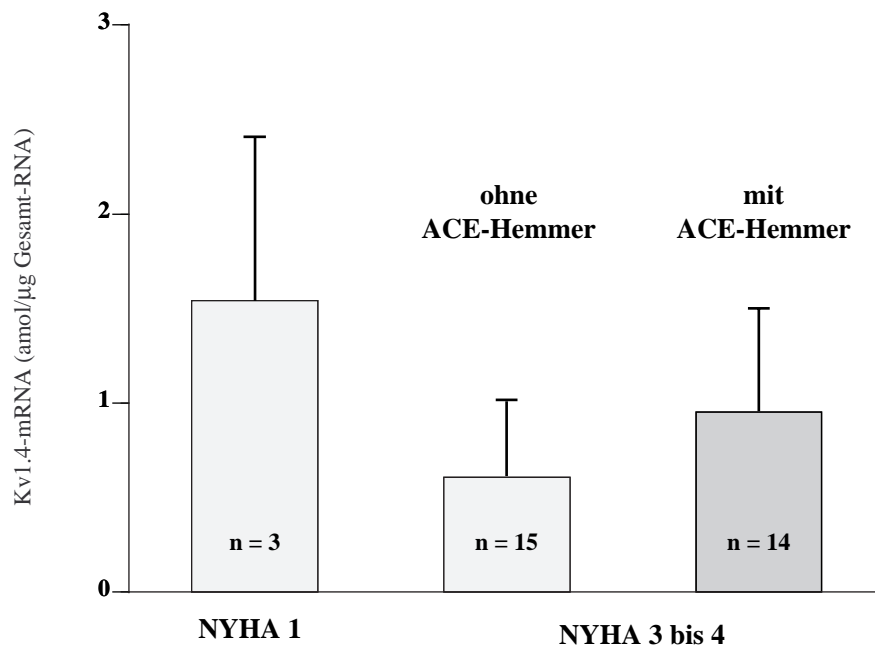


Abbildung 4.7: Kv1.4-mRNA-Expression im rechten Atrium (Mittelwert und Mittelwertabweichung)

niedriger als im Ventrikelmyokard ($33 \text{ amol}/\mu\text{g RNA}$; $n = 18$).

4.3.2 Linke Ventrikel

In insgesamt 18 linken Ventrikelproben wurde die Kv1.4-Expression bestimmt. Wie in Abb. 4.8 dargestellt ist, lag in den Spenderherzen die mRNA-Konzentration bei $22 \pm 4 \text{ amol}/\mu\text{g}$ Gesamt-RNA ($n = 6$). In terminal insuffizienten Explantaten ohne vorausgegangene ACE-Hemmer-Therapie war die Kv1.4-mRNA signifikant auf $51 \pm 9 \text{ amol}/\mu\text{g}$ Gesamt-RNA ($n = 5$; $p < 0,01$) erhöht. Die insuffizienten linken Ventrikel, die vor der Explantation unter dem Einfluß von ACE-Hemmern standen, zeigten dagegen eine Kv1.4-Expression, die gegenüber den Herzen ohne ACE-Hemmer grenzwertig vermindert ($30 \pm 6 \text{ amol}/\mu\text{g}$ Gesamt-RNA; $n = 7$; $p = 0,08$) und im Vergleich mit den Spenderherzen nur noch geringfügig erhöht war.

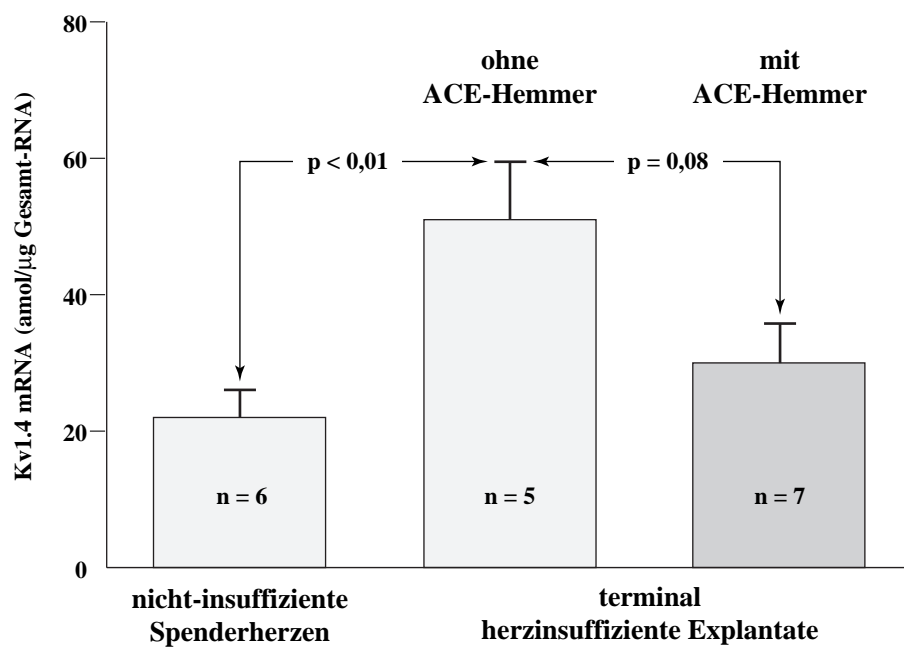


Abbildung 4.8: Kv1.4-Expression in linken Ventrikel (Mittelwert und Mittelwert-abweichung)

Kapitel 5

Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Myokardproben aus humanen Atrien und Ventrikel von herzgesunden und herzinsuffizienten Patienten auf mögliche mRNA-Expressionsunterschiede des CFTR-Chloridkanals und des spannungsabhängigen Kaliumkanals Kv1.4 zu untersuchen. Wegen der erhöhten Arrhythmieanfälligkeit bei Herzinsuffizienz und deren günstiger Beeinflussbarkeit durch ACE-Hemmer sollte dabei besonders auf eine möglicherweise veränderte Expression unter ACE-Hemmer-Therapie geachtet werden.

Eine grundlegende Überlegung dabei war, daß die Herzinsuffizienz über eine erhöhte myokardiale Wandspannung [40] Wachstum und Phänotypveränderungen der Myozyten hervorruft. Diese äußern sich unter anderem in einer instabilen Ca^{2+} -Homöostase [89], für die eine Expressionsveränderung von Transport- und Kanalproteinen [29] als Ursache gesehen wird. In diesem Zusammenhang stellte sich auch die Frage, ob die günstige Beeinflussung der Herzinsuffizienz und die Verminderung der Arrhythmieanfälligkeit bei ACE-Hemmer-Therapie unter anderem durch eine Umkehrung der Phänotypveränderungen zu erklären ist.

5.1 „Splicing“ des CFTR im Herzen

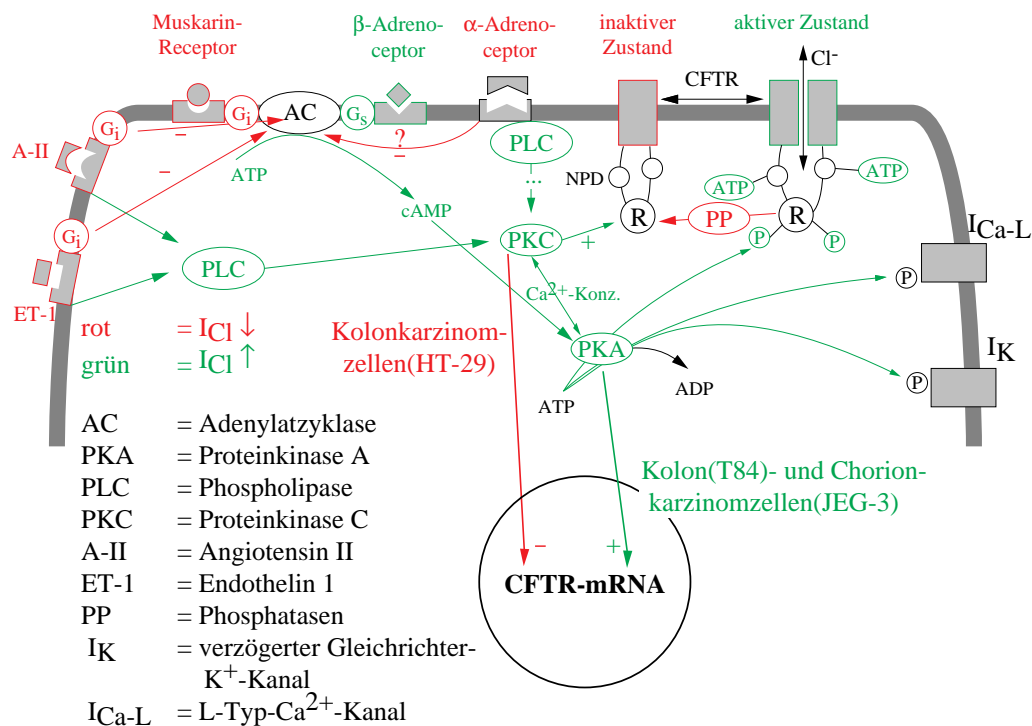
Nachdem Paul C. Levesque *et al.* 1992 die Expression des CFTR im humanen Herzen fanden [60], stellten Burton Horowitz *et al.* [42] fest, daß der CFTR im Herzen von Ratten und Meerschweinchen im Vergleich zum humanen epithelialen CFTR eine 90 bp Deletion exakt innerhalb der Intron/Exon Grenzen des Exon 5

aufweist. Das Exon 5 kodiert einen Teil der zytoplasmatischen Domäne zwischen den Transmembrandomänen 2 und 3 (Abb. 1.2) und enthält zwei potentielle Proteinkinase C-Bindungsstellen. Diese könnte eine veränderte PKC-Regulation zur Folge haben, wenn auch diese Region nicht zur regulatorischen Domäne gehört. John D. Warth *et al.* untersuchten 10 humane rechte Vorhöfe und 4 Ventrikel von Makaken (Menschenaffen) durch Southern Blot Analyse [103]. Nach ihren Ergebnissen sind in den humanen Atrien und in den Ventrikel der Makaken sowohl die Exon 5-positive als auch die Exon 5-negative Splice-Variante exprimiert. Wie im Kapitel 4.1 beschrieben, deuten die Ergebnisse dieser Arbeit zumindest auf eine starke Dominanz der Exon 5-positiven CFTR-mRNA im rechten Atrium und linken Ventrikel des Menschen hin (Exon 5-negative CFTR-mRNA unter 4%). Dies ist im Hinblick auf die Funktion insofern wichtig, als die Exon 5-negative Splice-Variante im Verdacht steht, ineffektiv prozessiert zu werden [22]. Im Gegensatz zum Menschen und zum Makaken exprimieren die meisten untersuchten Tiere lediglich die Exon 5-negative CFTR-mRNA [34], wodurch sich auch die verminderte funktionelle Expression erklären ließe [103].

5.2 CFTR-Expression

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit scheint die Expression des CFTR auf mRNA-Ebene bei Herzinsuffizienz, besonders im Myokard der linken Herzkammer, vermindert zu sein (Abb. 4.6).

Das Herz steht bei Herzinsuffizienz unter einer permanenten Stimulation durch Katecholamine. Wie in Kapitel 1.3 erwähnt, führt dies unter anderem zu einer Aktivierung des L-Typ-Ca-Kanals und des verzögerten Gleichrichter-Kaliumkanals. Der erhöhten Aktionspotentialdauer und der Anhebung des Ca^{2+} -Plateaus kann der CFTR mit einem erhöhten Auswärtsstrom durch β -adrenerge Aktivierung entgegenwirken. Der CFTR-Chlorid-Kanal, der ohne adrenerge Stimulation keinen nennenswerten Strom zeigt, kann via β -Rezeptoren, G_s -Protein, Adenylatzyklase-Aktivierung, cAMP-Erhöhung, Proteinkinase A-Aktivierung und schließlich Phosphorylierung der regulatorische Domäne aktiviert werden (Abb. 5.1)[41, 43, 95]. Der CFTR-Chlorid-Strom kann ebenso durch Forskolin (ein Adenylatzyklase-Aktivator) oder durch intrazelluläre Perfusion von cAMP über eine Patch-

Abbildung 5.1: Regulation des CFTR (nach M. Horie *et al.* [41])

Pipette aktiviert werden. Eine Stimulation der Muskarin-Rezeptoren, welche die Adenylatzyklase über ein G_I -Protein hemmen, antagonisiert die β -Rezeptor-Aktivierung des I_{Cl} [43, 95]. Die Öffnung des durch PKA-Phosphorylierung aktivierten CFTR ist zusätzlich an die Hydrolyse von ATP gebunden, das kontinuierlich zur Verfügung stehen muß [7]. Die Untersuchung der Wirkung des aktivierten CFTR-Stroms auf das Aktionspotential ist schwierig, da die β -adrenerge Stimulation auch andere für das Aktionspotential wichtige Kanäle, wie z.B. den L-Typ-Kalziumkanal und den verzögerten Gleichrichter-Kaliumkanal, beeinflusst. Bei einer Blockierung des L-Typ-Kalziumkanals durch Nisoldipin und Minimierung des verzögerten Gleichrichter-Kaliumstroms durch Raumtemperatur [102] konnte unter Isoprenalin eine Verkürzung der Aktionspotentialdauer beobachtet werden, die durch Muskarin-Rezeptor-Aktivierung wieder aufgehoben werden konnte [37]. Die Isoprenalin vermittelte Verkürzung der Aktionspotentialdauer konnte ebenfalls durch den Chloridkanal-Blocker Anthracenkarboxylsäure ant-

agonisiert werden [59]. Deshalb ist ein Beitrag des CFTR zur Regulation des Aktionspotentials sehr wahrscheinlich. Die antiarrhythmische Wirkung von β -Blockern, die das Aktionspotential zum Teil verlängern, ist so möglicherweise durch einen verminderten CFTR-Cl⁻-Strom erklärbar [37, 44]. Weiterhin könnte die mit Hypoxie und Ischämie verbundene Verkürzung des Aktionspotentials auf eine Aktivierung des CFTR-Cl⁻-Kanals zurückgeführt werden, da bekanntermaßen die zirkulierenden Katecholamine unter diesen Bedingungen erhöht sind.

Noradrenalin stimuliert α - und β -Adrenozeptoren. Unerwarteter Weise wurde gezeigt, daß eine Stimulation der α -Adrenozeptoren den CFTR-Cl⁻-Strom hemmt [27, 47, 72]. Nach Induktion des Cl⁻-Stromes durch Noradrenalin konnten die α_1 -adrenozeptor-selektiven Antagonisten Prazosin und Bunazosin die Cl⁻-Leitfähigkeit um 20 – 50% steigern. Da Phenylephrin (α_1 -Adrenozeptor-Agonist) keinen Einfluß auf den Forskolin (Adenylatzyklase-Aktivator) –aktivierten CFTR-Cl⁻-Strom hatte [47], schlossen Ehara *et al.*, daß die α_1 -Adrenozeptoren keinen direkten Effekt auf die Adenylatzyklase ausüben, sondern vor dieser in die β -adrenerge Funktionskette eingreifen. In den Experimenten von Obayashi *et al.* [70] dagegen reduzierte Phenylephrin den Forskolin-induzierten ebenso wie den Isoprenalin-induzierten (β -Adrenozeptor-Agonist) Cl⁻-Strom, was einen Effekt nach der Adenylatzyklase-Aktivierung nahe legt. Es ist bekannt, daß α_1 -Adrenozeptoren über Phosphatidylinositol/Phospholipase C (PLC) die Bildung von Inositoltriphosphat und Diazylglyzerin induzieren [30]. Diazylglyzerin aktiviert die Proteinkinase C (PKC), welche den CFTR-Cl⁻-Strom ebenfalls aktivieren kann [18]. Beide Experimente wurden allerdings bei niedrigen Ca²⁺-Konzentrationen (unter 1 nM) durchgeführt, so daß dabei nur von einer sehr geringen Aktivität der stark Ca²⁺-abhängigen Enzyme PLC und PKC auszugehen war. Möglicherweise stellt die Ca²⁺-Abhängigkeit dieser beiden Enzyme einen weiteren Weg der Regulation des CFTR-Cl⁻-Stroms dar – eine erhöhte CFTR-Leitfähigkeit bei gesteigerter intrazellulärer Ca²⁺-Konzentration wäre ja sinnvoll. Vielleicht kann eine α_1 -Adrenozeptor-Aktivierung unter bestimmten Bedingungen sowohl fördernd als auch hemmend auf den CFTR-Cl⁻-Strom wirken.

James *et al.* und Obayashi *et al.* haben gezeigt, daß die Peptidhormone Endothelin-1 [48, 49] und Angiotensin-II [71] den CFTR-Cl⁻-Strom über einen ähnlichen Mechanismus wie die Muskarin-Rezeptoren hemmen. Endothelin-1 ist ein

21 Aminosäuren großes parakrines Hormon, das von den Endothelzellen des Endokards und der Gefäße gebildet wird. Bisher wurden 2 Rezeptorsubtypen (ET_A und ET_B) kloniert, die beide im Herzen vorkommen. Endothelin-1 wirkt positiv inotrop und hypertrophierend auf die glatte Muskulatur der Gefäße. Die Sekretion ist bei verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen, wie z.B. unter koronaren Vasospasmen, Herzischämie und Myokardinfarkt, erhöht.

Angiotensin II, ein Oktapeptid, hat ebenfalls einen starken positiv inotropen Effekt und fördert nach einem Myokardinfarkt [68] und in hypertensiven Ratten [84] die Myokardhypertrophie. Bis jetzt sind 3 Rezeptoren bekannt. Diese (AT_1 , AT_2 und AT_3) gehören zur Familie der GTP-bindenden Proteine und kommen im Herzen vor. Die erhebliche pathophysiologische Bedeutung des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) ist in vielen Studien belegt worden, wobei die Therapie mit Angiotensin-Konvertierungsenzym-Hemmern (ACE-Hemmer) die kardiovaskuläre Mortalität und Morbidität erheblich verbessern konnte [35, 45, 46].

Ein weiterer Signalweg der beiden Peptidhormone Endothelin-1 und Angiotensin-II ist die Aktivierung der Proteinkinase C durch Aktivierung der Phospholipase C und Bildung von Diazylglyzerin [36, 51, 63, 71](Abb. 5.1).

Expressionsuntersuchungen an Epithelzellen (Kolon- und Chorionkarzinomzellen) haben gezeigt, daß die mRNA-Expression des CFTR durch Aktivierung der PKA erhöht wird [67]. Die Aktivierung der PKC vermindert dagegen die CFTR-mRNA-Expression [5]. Diese Ergebnisse sind mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit vereinbar, da bei Herzinsuffizienz erhöhte Angiotensinspiegel vorliegen und die β -Adrenozeptor-Dichte der Herzzellen vermindert ist [73]. Über eine erhöhte PKC-Aktivität und eine verminderte PKA-Aktivität wäre eine Herabregulierung der CFTR-Expression denkbar. Eine Therapie mit ACE-Hemmern vermindert die Bildung von Angiotensin-II und wirkt der Herabregulierung der kardialen β -Adrenozeptoren entgegen [82]. Ein vermindertes Angiotensin-II-Spiegel könnte die Aktivität der PKC vermindern und eine erhöhte β -Adrenozeptorzahl die der PKA erhöhen (Abb. 5.1). Beides wäre mit einer erhöhten CFTR-Expression unter ACE-Hemmer-Therapie vereinbar, wie sie im Rahmen dieser Arbeit auf RNA-Ebene gemessen wurde.

5.3 Kv1.4-Expression

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die mRNA des spannungsabhängigen Kaliumkanals Kv1.4 im linken Ventrikel terminal herzinsuffizienter Patienten gegenüber Ventrikel herzgesunder Organspender erhöht ist. Terminal herzinsuffiziente linke Ventrikel unter Behandlung mit ACE-Hemmern hatten dagegen eine Kv1.4-Expression, die annähernd auf dem Niveau der gesunden linken Ventrikel lag.

Die Bedeutung dieser Ergebnisse ist unklar, da noch nicht geklärt ist, in welchem Maße der Kv1.4 an der Bildung der Membrankanäle für den transienten K^+ -Auswärtsstrom (I_{to}) beteiligt ist. Als wichtigste Kandidaten für den I_{to} gelten der Kv4.2 und der Kv4.3. Die Eigenschaften der α -Untereinheiten können jedoch durch die β -Untereinheiten so stark variiert werden, daß der I_{to} möglicherweise durch eine ganz andere α -Untereinheit gebildet wird [78].

Im Laufe der Herzentwicklung verändert sich die Zusammensetzung der Ionenkanäle. Beispielsweise erhöht sich bei Ratten innerhalb der ersten 10 Lebens-tage der transiente Auswärtsstrom auf das 4fache, wohingegen der Einwärts-Gleichrichter-Strom nach 10 Tagen nur noch $\frac{1}{3}$ des Ausgangswertes aufweist [57]. Matsubara *et al.* [64] bestimmten die mRNA-Expression in Ratten-Herzzellen in Kultur und *in vivo*. Sie stellten fest, daß die Kv1.4-mRNA bei Stimulation durch KCl oder BAY K8644 in spontan schlagenden Rattenkardiomyozyten auf das 2- bis 3-fache gesteigert werden kann. Bei Ventrikel-Hypertrophie durch Nierenarterien-Klippung, die mit einer verlängerten Plateau-Phase verbunden war, verminderte sich die Kv1.5-mRNA. Die Kv1.4-mRNA erhöhte sich dagegen leicht.

Man geht derzeit davon aus, daß in Rattenkardiomyozyten der I_{to} von den 3 Kanalgenen Kv1.4, Kv4.2 und Kv4.3 kodiert wird [6, 23, 24, 80, 86, 98]. In den ersten Tagen nach der Geburt ist die Expression des Kv1.4 am höchsten und nimmt danach im Laufe der Entwicklung der Ratten ab. Im Gegensatz dazu sind der Kv4.2 und der Kv4.3 in der neonatalen Phase niedrig exprimiert und dominieren in den adulten Herzzellen [6, 23, 24, 64, 81, 87, 106]. Da die Kv-Gene *Kv1.4*, *Kv4.2* und *Kv4.3* bei heterologer Expression deutliche Unterschiede in den electrophysiologischen Eigenschaften aufweisen (z.B. der Refraktärzeit) [24, 86, 98]

kann man erwarten, daß es mit den Veränderungen der Expressionshöhen auch zu Veränderungen des I_{to} und des Aktionspotentialverlaufs kommt. Wickenden *et al.* [105] konnten in neonatalen Rattenherzen eine deutliche Verlängerung des Aktionspotentials bei hoher Stimulationfrequenz feststellen. Die gleiche Frequenzabhängigkeit fand Kukushkin [58] in Kaninchenventrikel. Diese Ergebnisse kann man mit dem Vorhandensein eines sich langsam reaktivierenden I_{to} erklären. Eine ähnliche Frequenzabhängigkeit hatten atriale Myozyten, die aus jungen menschlichen Herzen (1 Monat bis $2\frac{1}{2}$ Jahre) isoliert wurden [19]. Die postnatale Entwicklung ist mit einem erhöhten I_{to} und einer Verkürzung des Aktionspotentials verbunden [57]. Zusätzlich ist die Reaktivierung vom inaktiven Zustand in adulten Rattenherzen deutlich schneller. Damit im Einklang ist die Aktionspotentialdauer in diesen Herzzellen frequenzunabhängig [57, 101]. Wickenden *et al.* schlußfolgerten, daß der Kv1.4 die langsam reaktivierende Komponente des I_{to} kodiert, die mit der Entwicklung des Herzen abnimmt. Im Gegensatz dazu kodieren der Kv4.2 und der Kv4.3 die schnelle reaktivierende Komponente des I_{to} , welche mit der Herzentwicklung zunehmend dominiert [105].

Wickenden *et al.* konnten weiterhin zeigen, daß eine Trijodthyronin Behandlung bei Rattenherzenzellen *in vitro* eine Abnahme des Kv1.4 und eine Zunahme von Kv4.2 und Kv4.3 auf mRNA- und auf Proteinebene hervorruft. Eine Kultivierung ohne Trijodthyronin verhinderte diese Entwicklung [105].

Die Erhöhung der mRNA-Expression des Kv1.4 bei Herzinsuffizienz im linken menschlichen Ventrikel könnte man in den Rahmen der Dedifferenzierung in Richtung auf den postnatalen Phänotyp der Myozyten einordnen. Die Behandlung mit ACE-Hemmern wirkt dieser Tendenz entgegen. Takimoto *et al.* [93] konnte zeigen, daß Captopril-Behandlung die Downregulation von Kv4.2 und Kv4.3 bei renal bedingter Herzinsuffizienz bei Ratten verhinderte. Allerdings fanden sich keine Änderungen in der Kv1.4-Expression.

5.4 Einordnung der Ergebnisse

Wie in der Einleitung dargelegt, haben Patienten mit Überlasthypertrophie eine erhöhte Arrhythmieanfälligkeit, die einer veränderten Expression von Determinanten der kardialen Kalzium-Homöostase zugerechnet wird. Die Ergebnisse die-

ser Arbeit unterstützen diese Annahme. Sowohl der CFTR als auch der Kv1.4 werden im Ventrikelmuskel bei terminaler Herzinsuffizienz auf mRNA-Ebene verändert exprimiert. Im Vergleich zu Spenderherzen ist der CFTR etwa auf die Hälfte vermindert und der Kv1.4 ca. auf das 2-fache erhöht. Bei herzinsuffizienten Patienten mit vorausgegangener Behandlung mit Hemmern des Angiotensin-Konvertierungsenzyms (ACE-Hemmern) entspricht die Expression beider Kanäle etwa der Expression der Spenderherzen. Die veränderte Expression bei Therapie mit ACE-Hemmern konnte beim CFTR auch im rechten Atrium gezeigt werden. Damit unterstützen die Ergebnisse auch die Annahme, daß die verminderte Arrhythmieanfälligkeit herzinsuffizienter Patienten unter ACE-Hemmer-Therapie zumindest teilweise auf einer Normalisierung der Expression von Determinanten der Kalzium-Homöostase beruht.

Die Erhöhung der mRNA-Expression des Kv1.4 bei Herzinsuffizienz paßt zur These der Dedifferenzierung bei kardialer Überlast, da man in Rattenherzzellen eine hohe Expression bei neonatalen Ratten und eine Verminderung der Kv1.4-Expression im Laufe der Entwicklung beobachten konnte. Unter Kulturbedingung bewirkte das differenzierungsfördernde Schilddrüsenhormon Trijodthyronin ebenfalls eine Expressionsverminderung. Diese Veränderungen konnten auch elektrophysiologisch nachgewiesen werden (Kap. 5.3).

Eine Regulation des CFTR durch die Proteinkinase A und C wurde in Kolon- und Chorionkarzinom-Zelllinien nachgewiesen (Kap. 5.2). Bei verminderter PKA-Aktivität sowie bei erhöhter PKC-Aktivität ist die CFTR-Expression in diesen Zellen vermindert. Diese Bedingungen sind vereinbar mit der Situation bei Herzinsuffizienz (Kap. 5.2), bei der, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, die CFTR mRNA-Expression ebenfalls vermindert ist.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die mRNA-Expression des CFTR-Chloridkanals und des Kv1.4-Kaliumkanals (Kandidat für den Transienten Kaliumauswärtsstrom) von Myokardzellen herzinsuffizienter Patienten unterschiedlicher Schweregrade zu bestimmen. Diese beiden Kanäle stellen potentielle Determinanten der myokardialen Ca^{2+} -Homöostase dar und könnten daher zur erhöhten Arrhythmieanfälligkeit bei Herzinsuffizienz beitragen. Wegen der bekannten antiarrhythmischen Wirkung von ACE-Hemmern sollte in diesem Zusammenhang auch ein möglicher Einfluß einer Therapie mit ACE-Hemmern auf die mRNA-Expression beider Kanäle untersucht werden. Die Quantifizierung erfolgte durch „standardkalibrierte kompetitive Umkehr-Polymerasekettenreaktion“ (RT-PCR).

In linksventrikulären Herzproben gesunder Spenderherzen betrug die mRNA-Expression des CFTR 52 ± 10 amol/mg Gesamt-RNA ($n = 7$). In herzinsuffizienten linken Ventrikel, ohne ACE-Hemmer-Behandlung vor der Transplantation, war die CFTR-mRNA signifikant vermindert (24 ± 9 amol/mg Gesamt-RNA; $n = 5$; $p < 0,05$). Bei herzinsuffizienten Patienten mit ACE-Hemmer-Therapie lag dagegen die CFTR-mRNA-Konzentration (56 ± 8 amol/mg Gesamt-RNA; $n = 9$; $p < 0,05$) annähernd auf dem Niveau der gesunden linken Ventrikel. In den rechten Atrien war die CFTR-Expression unter ACE-Hemmern ebenfalls erhöht gegenüber Patienten ohne ACE-Hemmer-Therapie (59 ± 9 amol/mg RNA; $n = 16$ gegen 38 ± 5 amol/mg RNA; $n = 27$; $p < 0,05$). Andere Vasodilatoren, vor allem Ca^{2+} -Antagonisten, konnten diesen Effekt nicht hervorrufen.

In 14 rechten Atrien und 6 linken Ventrikel wurde das „Splicing“ des Exon 5

untersucht. In allen Herzproben dominierte die Exon 5-positive Splice-Variante und die Exon 5-negative lag, sofern vorhanden, unter 4%.

Die Kv1.4-mRNA-Konzentration betrug in den Spenderherzen 22 ± 4 amol/ μ g Gesamt-RNA (n = 6). In linken Ventrikel terminal insuffizienter Explantate ohne ACE-Hemmer-Therapie war die Kv1.4-mRNA signifikant auf 51 ± 9 amol/ μ g Gesamt-RNA (n = 5; $p < 0,01$) erhöht. Bei insuffizienten Ventrikel mit ACE-Hemmern lag die Kv1.4-Expression etwa auf dem Niveau der gesunden Ventrikel (30 ± 6 amol/ μ g Gesamt-RNA; n = 7; $p = 0,08$).

Damit konnte gezeigt werden, daß in Ventrikel herzinsuffizienter Patienten die mRNA-Expression des CFTR vermindert und die des Kv1.4 erhöht ist. Damit können beide Kanäle zur erhöhten Arrhythmieanfälligkeit bei Herzinsuffizienz beitragen. Diese Phänotypveränderungen sind bei Patienten, die unter ACE-Hemmer-Therapie standen, nicht zu beobachten, was man als Teil der antiarrhythmischen Wirkung der ACE-Hemmer verstehen kann.

Kapitel 7

Thesen

1. In humanen Myokardzellen überwiegt die Exon 5-positive Splice-Variante des CFTR-Cloridkanals die Exon 5-negative. Diese liegt, sofern vorhanden, unter 4%.
2. In linken Ventrikel terminal herzinsuffizienter Patienten *ohne* ACE-Hemmer-Therapie ist die CFTR-mRNA-Expression etwa halb so groß wie die der Spender-Ventrikel.
3. Die linksventrikuläre CFTR-Expression herzinsuffizienter Patienten *mit* vorausgegangener ACE-Hemmer-Therapie ist gegenüber der *ohne* ACE-Hemmer-Therapie doppelt so hoch und entspricht ungefähr der Expressionshöhe von nicht-insuffizienten Spenderventrikel.
4. Rechte Atrien herzinsuffizienter Patienten *mit* vorausgegangener ACE-Hemmer-Therapie zeigen eine signifikant erhöhte CFTR-mRNA-Expression gegenüber rechten Atrien von Patienten ohne ACE-Hemmer.
5. Die linksventrikuläre Kv1.4-mRNA-Expression terminal herzinsuffizienter Patienten *ohne* vorherige ACE-Hemmer-Therapie ist mehr als doppelt so hoch wie die Expression nicht-insuffizienter Spenderherzen.
6. Bei linken Ventrikel herzinsuffizienter Patienten *mit* ACE-Hemmer-Therapie ist die Kv1.4-Expression gegenüber denen *ohne* ACE-Hemmer deutlich vermindert und entspricht nahezu der Expression nicht-insuffizienter Spender-Ventrikel.

7. Bei Herzinsuffizienz kann man beim CFTR-Chloridkanal und beim Kv1.4-Kaliumkanal eine veränderte mRNA-Expressionshöhe beobachten, was durch Therapie mit Hemmern des Angiotensin-Konvertierungsenzyms (ACE) weitgehend verhindert werden kann. Dieser Effekt ist eine mögliche Erklärung für die antiarrhythmische Wirkung von ACE-Hemmern, wenn sich die Ergebnisse elektrophysiologisch bzw. durch Messung der Protein-Expression bestätigen lassen.

Literaturverzeichnis

- [1] Anderson MP, Berger HA, Rich DR, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell* 67(4) (1991) 775–784.
- [2] Anderson MP, Rich DR, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. *Science* 251(4994) (1991) 679–682.
- [3] Bahinski A, Gadsby DC, Greengard P, Nairn AC. Chloride conductance regulated by protein kinase A in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 418 (1989) 32P.
- [4] Bahinski A, Nairn AC, Greengard P, Gadsby DC. Chloride conductance regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase in cardiac myocytes. *Nature* 340(6236) (1989) 718–721.
- [5] Bargon J, Trapnell BC, Yoshimura K, Dalemans W, Pavirani A, Lecocq JP, Crystal RG. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene can be regulated by protein kinase C. *J Biol Chem* 267(23) (1992) 16056–16060.
- [6] Barry DM, Trimmer JS, Merlie JP, Nerbonne JM. Differential expression of voltage gated K⁺ channel subunits in adult rat heart. Relation to functional K⁺ channels? *Circ Res* 77 (1995) 361–369.
- [7] Baukrowitz T, Hwang TC, Nairn AC, Gadsby DC. Coupling of CFTR Cl channel gating to an ATP hydrolysis cycle. *Neuron* 12(3) (1994) 473–482.

- [8] Bear CE, Canhui L, Kartner N, Bridges RJ, Jensen TJ, Ramjeesingh M, Riordan JR. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell* 68(4) (1992) 809–818.
- [9] Bear CE, Duguay F, Naismith AL, Kartner N, Hanrahan H, Riordan J. Cl-channel activity in *Xenopus* Oocytes expressing the cystic fibrosis gene. *J Biol Chem* 266(29) (1991) 19142–19145.
- [10] Berger HA, Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Howard PW, Maurer RA, Mulligan R, Smith AE, Welsh MJ. Identification and regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-generated chloride channel. *J Clin Invest* 88(4) (1991) 1422–1431.
- [11] Berger HA, Travis SM, Welsh MJ. Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by specific protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* 268(3) (1993) 2037–2047.
- [12] Berger SL, Chirgwin JM. Isolation of RNA. *Methods Enzymol* 180 (1989) 3–13.
- [13] Boat TF, Welsh MJ, Beaudet AL. In: Scriver CL, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Hrsg.): *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, 1989, S.2649-2680 .
- [14] Bogusz S, Boxer A, Busath DD. An SS1-SS2 beta-barrel structure for the voltage-activated potassium channel. *Protein Eng* 5(4) (1992) 285–293.
- [15] Bromm B. *Membranpotential und Gleichgewichtspotentiale*. In: Keidel WD (Hrsg): *Kurzgefaßtes Lehrbuch der Physiologie*. Thieme, Stuttgart, New York, 1985, S.14.13 .
- [16] Chang XB, Tabcharani JA, Hou YX, Jensen TJ, Kartner N, Alon N, Hanrahan JW, Riordan JR. Protein kinase A (PKA) still activates CFTR chloride channel after mutagenesis of all 10 PKA consensus phosphorylation sites. *J Biol Chem* 268(15) (1993) 1304–1311.

- [17] Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (1989) 2172–2175.
- [18] Collier ML, Hume JR. Unitary chloride channel activated by protein kinase C in guinea-pig ventricular myocytes. *Circ Res* 76(2) (1995) 317–324.
- [19] Crumb WJ, Pigott JD, Clarkson CW. Comparison of I_{to} in young and adult human atrial myocytes: evidence for developmental changes. *Am J Physiol* 37(3 Pt 2) (1995) H1335–1342.
- [20] Dalemans W, Barby P, Champigny G, Jallat S, Dott K, Dreyer D, Crystal RG, Pavirani A, Lecocq JP, Lazdunski M. Altered chloride ion channel kinetics associated with DF508 cystic fibrosis mutation. *Nature* 354 (1991) 526–528.
- [21] Deal KK, England SK, Tamkun MM. Molecular physiology of cardiac potassium channels. *Phys Rev* 76(1) (1996) 49–67.
- [22] Delaney SJ, Rich DP, Thomson SA, Hargrave MR, Lovelock PK, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator splice variants are not conserved and fail to produce chloride channels. *Nature Genet* 4(4) (1993) 426–431.
- [23] Dixon JE, McKinnon D. Quantitative analysis of potassium channel mRNA expression in atrial and ventricular muscle of rats. *Circ Res* 75(2) (1994) 252–260.
- [24] Dixon JE, Shi W, Wang HS, McDonald C, Yu H, Wymore RS, Cohen IS, McKinnon D. Role of Kv4.3 K^+ channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ Res* 79(4) (1996) 659–668.
- [25] Drumm ML, Wilkinson DJ, Smit LS, Worrell RT, Strong TV, Frizzell RA, Dawson DC, Collins FS. Chloride conductance expressed by DF508 and other mutant CFTRs in *Xenopus* Oocytes. *Science* 254(5039) (1991) 1797–1799.

- [26] Ehara T, Ishihara K. Anion channels activated by adrenaline in cardiac myocytes. *Nature* 347(6290) (1990) 284–286.
- [27] Ehara T, Iyadomi I, Hirahara K. Regulation of cyclic AMP-dependent Cl⁻ channel in heart. *Jpn J Physiol* 44(2) (1994) 173–176.
- [28] Ehara T, Matsuura H. Single channel study of the cyclic AMP-regulated chloride current in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 464 (1993) 307.
- [29] Eick RET, Whalley DW, Rasmussen HH. Connections: heart disease, cellular electrophysiology and ion channels. *FASEB J* 6(8) (1992) 2568–2580.
- [30] Endoh M. Signal transducing of myocardial α_1 -adrenoceptors: regulation of ion channels, intracellular calcium and force of contraction – a review. *J Appl Cardiol* 6 (1991) 379–399.
- [31] England SK, Uebele VN, Shear H, Kodali J, Benett PB, Tamkun MM. Characterization of a voltage gated K⁺ channel beta subunit expressed in human heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(14) (1995) 6309–6313.
- [32] Fedida D, Wible D, Wang Z, Fermini B, Faust F, Nattel S, Brown AM. Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned K⁺ channel current. *Circ Res* 73(1) (1993) 210–216.
- [33] Förster E. An improved general method to generate internal standards for competitive PCR. *Biotechniques* 16(1) (1994) 18–20.
- [34] Gadsby DC, Nagel G, Hwang TC. The CFTR chloride channel of mammalian heart. *Annu Rev Physiol* 57 (1995) 387–416.
- [35] Group TCTS. Effect of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study. *N Engl J Med* 316 (1987) 1429–1435.
- [36] Hansen CA, Schroering AG, Robishaw JD. Subunit expression of signal transducing G proteins in cardiac tissue: implications for phospholipase C-beta regulation. *J Mol Cell Cardiol* 27(1) (1995) 471–484.

- [37] Harvey RD, Clark CD, Hume JR. Chloride current in mammalian cardiac myocytes. *J Gen Physiol* 95(69) (1990) 1077–1102.
- [38] Harvey RD, Hume JR. Autonomic regulation of a chloride current in heart. *Science* 244(4907) (1989) 983–985.
- [39] Holmes DS. Rapid purification of bacterial plasmids and coliphage M13 RF without CsCl centrifugation. *Anal Biochem* 127 (1982) 428–433.
- [40] Holtz J. The significance of myocardial hypertrophy in heart failure. *Z Kardiol* 81(4) (1992) 41–48.
- [41] Horie M, Obayashi K, Xie LH, James AF, Sasayama S. Hormonal regulation of cystic fibrosis transmembran conductance regulator chloride channels. *Jpn Heart J* 37(5) (1996) 661–671.
- [42] Horowitz B, Tsung SS, Hart P, C P, Hume JR. Alternativ splicing of CFTR Cl⁻ channels in heart. *Am Physiol Soc* 264 (1993) H2214–2220.
- [43] Hwang TC, Horie M, Nairn AC, Gadsby DC. Role of GTP-binding proteins in the regulation of mammalian cardiac chloride conductance. *J Gen Physiol* 99(4) (1992) 465–489.
- [44] Ijzerman AP, Soudijn W. The antiarrhythmic properties of β -adrenoceptor antagonists. *Trends Pharmac Sci* 10(1) (1989) 31–36.
- [45] Investigators TS. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. *N Engl J Med* 325 (1991) 293–302.
- [46] Investigators TS. Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asyptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. *N Engl J Med* 327 (1991) 685–691.
- [47] Iyadomi I, Hirahara K, Ehara T. α -adrenergic inhibition of the β -adrenoceptor-dependent chloride current in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 486 (1995) 95–104.

- [48] James AF, Xie LH, Fujitani T, Hayashi S, Horie M. Inhibition of the cardiac PKA-dependent Cl^- conductance by endothelin-1. *Nature* 370(6487) (1994) 297–300.
- [49] James AF, Xie LH, Horie M. The effects of endothelin-1 on the PKA-dependent Cl^- conductance in the heart. *Jpn J Physiol* 44(2) (1994) 227–230.
- [50] Jan LY, Jan YN. Structural elements involved in specific K^+ channel functions. *Annu Rev Physiol* 54 (1992) 537–555.
- [51] Johnston CI. Tissue angiotensin converting enzyme in cardiac and vascular hypertrophy, repair and remodeling. *Hypertension* 23(2) (1994) 258–268.
- [52] Joho RH. Toward a molecular understanding of voltage-gated potassium channels. *J Cardiovasc Electrophysiol* 3 (1992) 589–601.
- [53] Kajstura J, Leri A, Finato N, Loreto CD, Beltrami CA, Anversa P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(15) (1998) 8801–8805.
- [54] Kartner N, Hanrahan JW, Jensen TJ, Naismith AL, Sun S. Expression of the cystic fibrosis gene in non-epithelial invertebrate cells produces a regulated anion conductance. *Cell* 64(4) (1991) 681–691.
- [55] Katz AM. Cardiomyopathie of overload. A major determinant of prognosis in congestive heart failure. *N Engl J Med* 322(2) (1990) 100–110.
- [56] Katz AM. *Heart failure*. In: Katz, AM (Hrsg.): *Physiology of the Heart*. Raven Press, New York, 1992, S.638-668 .
- [57] Kilborn MJ, Fedida D. A study of developmental changes in outward currents of rat ventricular myocytes. *J Physiol Lond* 430 (1990) 37–60.
- [58] Kukushkin NI, Gainullin RZ, Sosunov EA. Transient outward current and rate dependence of action potential duration in rabbit cardiac ventricular muscle. *Pflugers Arch* 399(2) (1983) 87–92.

- [59] Levesque PC, Clark CD, Zakarov SI, Rosenshtraukh LV, Hume JR. Anion and cation modulation of the guinea-pig ventricular action potential during β -adrenoceptor stimulation. *Pflugers Arch* 424 (1993) 54.
- [60] Levesque PC, Hart PJ, Hume JR, Kenyon JL, Horowitz B. Expression of cystic fibrosis transmembrane regulator Cl^- -channels in heart. *Circ Res* 71(4) (1992) 1002–1007.
- [61] Levesque PC, Hume JR. ATP_0 but not cAMP_i activates a Cl^- conductance in mouse ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 29(3) (1995) 336–343.
- [62] Majumder K, de Biasi M, Wang Z, Wible BA. Molecular cloning and functional expression of a novel potassium channel β -subunit from human atrium. *FEBS Lett* 361(1) (1995) 13–16.
- [63] Masaki T, Yanagisawa M. Physiologie and Pharmacology of endothelins. *Med Res Rev* 12(4) (1992) 391–421.
- [64] Matsubara H, Suzuki J, Inada M. *Shaker*-related potassium channel, Kv1.4, mRNA regulation in cultured rat heart myocytes and differential expression of Kv1.4 and Kv1.5 genes in myocardial development and hypertrophy. *J Clin Invest* 92(4) (1993) 1659–1666.
- [65] Matsuoka S, Ehara T, Noma A. Chloride-sensitive nature of adrenaline-induced current in guinea-pig cardiac myocytes. *J Physiol Lond* 425 (1990) 579–598.
- [66] McCormack K, McCormack T, Tanouye M, Rudy B, Stühmer W. Alternative splicing of the human *shaker* K^+ channel $\beta 1$ gene and functional expression of the $\beta 2$ gene product. *FEBS Lett* 370(1-2) (1995) 32–36.
- [67] McDonald RA, Matthews RP, Idzerda RL, McKnight GS. Basal expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene is dependent on protein kinase A activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(16) (1995) 7560–7564.

- [68] Michel JB, Lattion AL, Salzmann JL, Cerol ML, Philippe M, Camilleri JP, Corvol P. Hormonal and cardiac effects of converting enzyme inhibition in rat myocardial infarction. *Circ Res* 62(4) (1988) 641–650.
- [69] Nagel GA, Hwang TC, Nastiuk KL, Nairn AC, Gadsby DC. The protein kinase A-regulated cardiac Cl⁻ channel resembles the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* 360(6399) (1992) 81–84.
- [70] Obayashi K, Horie M, Sasayama S. Stimulation of the α_1 -adrenoceptor inhibits cardiac PKA-regulated Cl⁻ conductance. *Jpn Circ J* 60 (1996) 467.
- [71] Obayashi K, Horie M, Xie LH, Tsuchiya K, Kubota A, Ishida H, Sasayama S. Angiotensin II inhibits protein kinase A-dependent chloride conductance in heart via pertussis toxin-sensitive G proteins. *Circulation* 95(1) (1997) 197–204.
- [72] Oleksa LM, Luca CM, Harvey RD. α_1 -adrenergic inhibition of the β -adrenergically activated Cl⁻ current in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res* 78(6) (1996) 1090–1099.
- [73] Pitschner HF, Droege A, Mitze M, Schlepper M, Brodde OE. Down-regulated beta-adrenoceptors in severely failing human ventricles: uniform regional distribution but no increased internalization. *Basic Res Cardiol* 88(2) (1993) 179–191.
- [74] Po S, Roberds S, Snyders DJ, Tamkun MM, Bennett PB. Heteromultimeric assembly of human potassium channels. *Circ res* 72(6) (1993) 1326–1336.
- [75] Po S, Snyders DJ, Baker R, Tamkun MM, Bennett PB. Functional expression of an inactivating potassium channel cloned from human heart. *Circ Res* 71(3) (1992) 732–736.
- [76] Pongs O. Structural basis of voltage-gated K⁺ channel pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 13(9) (1992) 359–365.

- [77] Rehm H, Lazdunski M. Purification and subunit structure of a putative K^+ channel protein identified by its binding properties for dendrotoxin I. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(13) (1988) 4919–4923.
- [78] Rettig J, Heinemann SH, Wunder F, Lorra C, Parcej DN, Dolly JO, Pongs O. Inactivation properties of voltage-gated K^+ channels altered by presence of beta-subunit. *Nature Lond* 369(6478) (1994) 289–294.
- [79] Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245 (1989) 1066–1073.
- [80] Roberds SL, Tamkun MM. Cloning and tissue-specific expression of five voltage-gated potassium channel cDNAs expressed in rat heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(5) (1991) 1798–1802.
- [81] Roberds SL, Tamkun MM. Developmental expression of cloned cardiac potassium channels. *FEBS Lett* 284(2) (1991) 152–154.
- [82] Sanbe A, Takeo S. Long-term treatment with angiotensin I-converting enzyme inhibitors attenuates the loss of cardiac beta-adrenoceptor responses in rats with chronic heart failure. *Circulation* 92(9) (1995) 2666–2675.
- [83] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74(12) (1977) 5463–5467.
- [84] Schunkert H, Dzau VT, Tang SS, Hirsch AT, Apstein CS, Lorell BH. Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy: Effects on coronary resistance, contractility and relaxation. *J Clin Invest* 86(6) (1990) 1913–1920.
- [85] Scott VE, Muniz ZM, Sewing S, Lichtinghagen R, Parcej DN, Pongs O, Dolly JO. Antibodies specific for distinct Kv subunits unveil a heteroligomeric basis for subtypes of alpha-dendrotoxin-sensitive K^+ channels in bovine brain. *Biochemistry* 33(7) (1994) 1617–1623.

- [86] Serodio P, Mira VSD, Rudy B. Cloning of a novel component of A-type K^+ channels operating at subthreshold potentials with unique expression in heart and brain. *J Neurophysiol* 75(5) (1996) 2174–2179.
- [87] Shimoni Y, Fiset C, Dixon RRCJE, McKinnon D, Giles WR. Thyroid hormone regulates postnatal expression of transient K^+ channel isoforms in rat ventricle. *J Physiol* 500 (1997) 65–73.
- [88] Snyders DJ, Tamkun MM, Bennett PB. A rapidly activating and slowly inactivating K^+ channel cloned from human heart. *J Gen Physiol* 101(4) (1993) 513–543.
- [89] Swynghedauw B. Heart failure: a disease of adaptation. *Heart failure* 6 (1990) 57–62.
- [90] T. Task Force on Arrhythmias. The Sicilian gambit. *Circul* 84 (1992) 1831–1851.
- [91] Tabcharani JA, Chang XB, Riordan JR, Hanrahan JW. Phosphorylation-regulated Cl-channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *Nature* 352 (1991) 628–631.
- [92] Takano M, Noma A. Distribution of the isoprenaline-induced chloride current in rabbit heart. *Pflugers Arch* 420(2) (1992) 223–226.
- [93] Takimoto K, Li D, Hershman KM, Li P, Jackson EK, Levitan ES. Decreased expression of Kv4.2 and novel Kv4.3 K^+ channel subunit mRNAs in ventricles of renovascular hypertensive rats. *Circ Res* 81(4) (1997) 533–539.
- [94] Tamkun MM, Knoth KM, Walbridge JA, Kroemer H, Roden DM, Glover DM. Molecular cloning and characterization of two voltage-gated K^+ channel cDNAs from human ventricle. *FASEB J* 5(3) (1991) 331–337.
- [95] Tareen FM, Ono K, Noma A, Ehara T. β -adrenergic and muscarinic regulation of the chloride current in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol* 440 (1991) 225–241.

- [96] Tempel BL, Papazian DM, Schwarz TL, Jan YN, Jan LY. Sequence of a probable potassium channel component encoded at *Shaker* locus of *Drosophila*. *Science Wash DC* 237(4816) (1987) 770–775.
- [97] Timpe LC, Schwarz TL, Tempel BL, Papazian DM, Jan YN, Jan LY. Expression of functional potassium channels from *Shaker* cDNA in *Xenopus oocytes*. *Nature* 331(6152) (1988) 143–145.
- [98] Tseng-Crank JC, Tseng GN, Schwartz A, Tanuoye MA. Molecular cloning and functional expression of a potassium channel cDNA isolated from a rat cardiac library. *FEBS Lett* 268(1) (1990) 63–68.
- [99] Tsui LC. The spectrum of cystic fibrosis mutations. *Trends Genet* 8(11) (1992) 392–398.
- [100] Uebele VN, England SK, Chaudhary A, Tamkun MM, Snyders DJ. Functional differences in Kv1.5 currents expressed in mammalian cell lines are due to the presence of endogenous Kv β 2.1 subunits. *J Biol Chem* 271(5) (1996) 2406–2412.
- [101] Wahler GM, Dollinger SJ, Smith JM, Flemal KL. Time course of postnatal changes in rat heart action potential and in transient outward current is different. *Am J Physiol* 267(3 Pt 2) (1994) H1157–1166.
- [102] Walsh K, Begenisich TB, Kass RS. β -adrenergic modulation of cardiac ion channels. Differential temperature sensitivity of potassium and calcium currents. *J Gen Physiol* 93(5) (1989) 841–854.
- [103] Warth JD, Collier ML, Hart P, Geary Y, Gelband CH, Chapman T, Horowitz B, Hume JR. CFTR chloride channels in human and simian heart. *Cardiovasc Res* 31(4) (1996) 615–624.
- [104] Warth JD, Horowitz B, Hume JR. Identification of CFTR_{cardiac} in non human primat ventricular myocytes. *Biophys J* 66 (1994) A420.
- [105] Wickenden AD, Kaprielian R, Parker TG, Jones OT, Backx PH. Effects of development and thyreoid hormon on K⁺ channel gene expression in rat ventricle. *J Physiol Lond* 504(2) (1997) 271–286.

- [106] Xu H, Dixon JE, Barry DM, Trimmer JS, Merlie JP, McKinnon D, Nerbonne JM. Developmental analysis reveals mismatches in the expression of K⁺ channel α -subunits and voltage gated K⁺ channel currents in rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 108(5) (1996) 405–419.

Anhang A

Tabellarischer Lebenslauf

Name: Eyk Schellenberger
Geburtsdatum/-ort: 29.1.1969, Halle/Saale
Anschrift: Amselweg 48 d
06110 Halle/Saale
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1976 – 1984 Oberschule „Ulrich von Hutten“
1984 – 1988 Erweiterte Oberschule „August Hermann
Francke“
Abitur im Juli 1988

Hochschulbildung:

1988 2 Monate Pflegepraktikum in der Inneren
Abteilung des Stadtkrankenhauses „Berg-
mannstrost“ in Halle
1988 – 1990 Grundwehrdienst
1990 3 Monate Pflegepraktikum an der Klinik für
Gynäkologie der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

1990	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1992	Physikum
1993	1. Staatsexamen der Humanmedizin
1995	2. Staatsexamen
1995 – 1996	Stipendium des Landes Sachsen-Anhalt für den experimentellen Teil der Dissertation
1996 – 1997	Praktisches Jahr
1997	3. Staatsexamen
seit 10/97	Arzt im Praktikum an der Klinik für Diagnostische Radiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Sonstige Kenntnisse:

Sprachen	Englisch, Russisch
EDV	Programmierung, Grafik-, Textverarbeitungs- und Textsatzprogramme auf Apple Macintosh, Windows

Anhang B

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation
**„Expression von Determinanten der elektromechanischen Kopplung
in Kardiomyozyten bei Überlast-Hypertrophie des menschlichen Her-
zens.“**

selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt
zu haben.

Halle/Saale, im Februar 1999

Eyk Schellenberger

Anhang C

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation
**„Expression von Determinanten der elektromechanischen Kopplung
in Kardiomyozyten bei Überlast-Hypertrophie des menschlichen Her-
zens.“**

zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin (Dr. med.) erstma-
lig einzureichen.

Es liegt nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens vor.

Halle/Saale, im Februar 1999

Eyk Schellenberger

Anhang D

Danksagung

Ich möchte mich besonders bei Herrn Prof. Dr. med. J. Holtz für die Überlassung des interessanten Themas und die Unterstützung beim Zustandekommen dieser Arbeit bedanken.

Für die persönliche Beratung und Betreuung danke ich herzlich Frau Dr. rer. nat. D. Darmer, die mir bei der Realisierung der Experimente und der Vollendung der Arbeit stets zur Seite stand.

Besonders dankbar bin ich auch Marten Szibor, Susanne Rohrbach, Andreas Schubert, Uwe Rückschloß, Heike Schumann und Herrn Dr. rer. nat. H. Morawietz

Bei Frau B. Heinze und Frau R. Gall bedanke ich mich für die tatkräftige Unterstützung im Labor.

Ich danke meinen Eltern und meiner Freundin, Saskia Schmuck.