

Analyse der differentiellen Genexpression während der Entwicklung zur kardialen Hypertrophie bei der Spontan Hypertensiven Ratte

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von
Torsten Hahn
geb. am 26.02.1973 in Dessau

Gutachter:

1. Prof. Dr. E. Wahle
2. Prof. Dr. B. H. F. Weber

Halle (Saale), 22.03.2006

urn:nbn:de:gbv:3-000010065

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010065>]

*Für meine lieben
Eltern Doris & Winfried Hahn
und meine Frau Maria.*

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
1 EINLEITUNG	1
1.1 Bedeutung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen	1
1.2 Die Myokardhypertrophie.....	1
1.3 Molekulare Mechanismen der Hypertrophie von Kardiomyocyten	3
1.4 Modellsysteme kardiovaskulärer Erkrankungen	6
1.5 Identifizierung von differentiell exprimierten Genen	7
1.6 Ziel der Arbeit.....	8
2 MATERIAL UND METHODEN.....	9
2.1 Chemikalien	9
2.1.1 Laborchemikalien und Radiochemikalien.....	9
2.1.2 Enzyme und vorgefertigte Systeme (Kits)	9
2.1.3 Molekulargewichts-Standards.....	10
2.1.4 Gebrauchslösungen	10
2.1.5 Sequenzen und Herkunft der synthetischen Oligonukleotide	11
2.2 Versuchstiere	12
2.2.1 Blutdruck- und Herzfrequenzmessungen bei den Ratten	12
2.2.2 Organentnahme	13
2.3 Molekularbiologische Standardmethoden.....	13
2.3.1 Agarosegel-Elektrophorese	13
2.3.2 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)	13
2.3.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	14
2.3.4 Phenol-/ Chloroform-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren	14
2.3.5 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA und RNA	14
2.3.6 Isolierung von Plasmid-DNA.....	14
2.3.7 Herstellung von Stammkulturen	15
2.4 Isolierung von poly(A ⁺)-RNA	15
2.5 Subtraktive Suppressions-Hybridisierung (cDNA-Subtraktion)	15
2.5.1 Molekulare Grundlagen der PCR-gestützten cDNA-Subtraktion	16
2.5.2 Erst- und Zweit-Strang-Synthese der cDNA.....	18
2.5.3 Restriktionsansatz: <i>Rsa I</i> -Spaltung	19
2.5.4 Adapterligation	19

2.5.5	Erste und zweite Hybridisierung.....	20
2.5.6	Erste und zweite PCR-Amplifikation.....	20
2.6	Herstellung der subtraktiven cDNA-Bibliothek	21
2.7	Differentielles Screening	21
2.7.1	Amplifikation der ersten PCR-Produkte	22
2.7.2	Reinigung von PCR-Produkten.....	24
2.7.3	Immobilisierung subtrahierter Klone in cDNA-Arrays.....	24
2.7.4	<i>Random Primer</i> -Markierung der cDNA-Sonden	25
2.7.5	Hybridisierung mit der subtrahierten cDNA	25
2.7.6	Interpretation der Ergebnisse des differentiellen Screenings	25
2.8	Northern Blot-Analyse	27
2.8.1	Denaturierende Formaldehyd-Agarosegel-Elektrophorese	27
2.8.2	Northern-Blotting.....	27
2.8.3	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden.....	28
2.8.4	Northern-Hybridisierung.....	28
2.9	Sequenzierung von DNA	28
2.10	EDV-gestützte Sequenzanalyse	29
2.11	<i>Real-time</i> quantitative RT-PCR	29
2.11.1	Theoretischer Hintergrund	29
2.11.2	Reverse Transkription.....	30
2.11.3	<i>Real-time</i> PCR	30
2.11.4	Datenanalyse mittels <i>comparative quantitation</i>	30
2.12	Statistik.....	31
3	ERGEBNISSE	32
3.1	Evaluierung der Methode	32
3.2	Nachweis des hypertrophen Zustands der SHR	34
3.2.1	Ermittlung von Blutdruck und Herz-/ Körpergewicht-Quotienten der Ratten	34
3.2.2	Phänotypische Beobachtungen bei den Rattenherz-Präparationen	35
3.3	Isolierung von poly(A⁺)-RNA	35
3.4	cDNA-Subtraktion.....	36
3.4.1	cDNA-Synthese, <i>Rsa</i> I-Spaltung und Adapterligation.....	36
3.4.2	PCR-Amplifikation der subtraktiv hybridisierten cDNA.....	37
3.4.3	Klonierung der subtrahierten cDNA-Bibliotheken	38
3.5	Differentielles Screening	39
3.5.1	Subtraktion SHR-04 → SHR-12.....	40
3.5.2	Subtraktion SHR-12 → SHR-26.....	42
3.6	Northern Blot-Analysen	43
3.6.1	Subtraktion SHR-04 → SHR-12.....	43

3.6.2	Subtraktion SHR-12 → SHR-26.....	45
3.6.3	Kontrollhybridisierungen.....	47
3.7	Sequenzanalysen.....	47
3.7.1	Subtraktion SHR-04 → SHR-12.....	48
3.7.2	Subtraktion SHR-12 → SHR-26.....	48
3.8	Bestimmung der relativen Expression durch <i>real-time</i> RT-PCR.....	53
3.8.1	Evaluierung der <i>real-time</i> PCR anhand einer GAPDH-Verdünnungsreihe.....	53
3.8.2	Test der mRNA auf Kontamination mit genomischer DNA.....	56
3.8.3	Überprüfung von <i>housekeeping</i> -Genen als mögliche interne Kontrollgene.....	57
3.8.4	Relative Quantifizierung von Kandidaten für differentielle Genexpression.....	58
4	DISKUSSION.....	65
4.1	cDNA-Subtraktion.....	65
4.2	Northern Blot-Analysen.....	65
4.3	Relative Quantifizierung durch <i>real-time</i> RT-PCR.....	66
4.3.1	Suche nach geeigneten Referenzgenen.....	66
4.3.2	Neue und konventionelle Verfahren der quantitativen Datenanalyse.....	68
4.4	Charakterisierung von Kandidatengen aus <i>real-time</i> RT-PCR.....	69
4.4.1	<i>Gamma sarcoglycan</i> (Sgcg).....	69
4.4.2	<i>Titin, transcript variant Novex-2</i> (Ttn).....	72
4.4.3	<i>Calmodulin-binding transcription activator</i> (Camta1).....	76
4.4.4	<i>Solute carrier family 35, member F5</i> (Slc35f5).....	77
4.4.5	<i>Goliath protein</i> (Gp).....	78
4.4.6	<i>Epidermal growth factor receptor substrate</i> (Eps15r).....	79
4.4.7	<i>Beta actin</i> (Actb).....	80
4.5	Charakterisierung weiterer Kandidatengene aus Northern Blots.....	80
4.5.1	<i>Gap junction membrane channel protein alpha 1</i> (Gja1).....	80
4.5.2	<i>Cadherin 2, type 1, N-cadherin</i> (Cdh2).....	83
4.5.3	<i>Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long chain</i> (Acadl).....	84
4.5.4	<i>Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)</i> (Nol3).....	85
4.5.5	<i>Muscleblind-like 2</i> (Mbnl2).....	86
4.5.6	<i>Ribosomal protein L3</i> (Rpl3).....	87
4.5.7	<i>hnRNP methyltransferase-like 2</i> (Hrmt112).....	87
4.5.8	<i>Suppressor of cytokine signaling 6</i> (Socs6).....	88
4.5.9	<i>Citrate lyase beta like</i> (Clybl).....	89
4.5.10	<i>Monoglyceride lipase</i> (Mgl1).....	90
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	94
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	95
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	105

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen

„Im Herzen soll die Liebe zu Hause sein. Weit weniger prosaisch, aber noch viel wichtiger ist das Herz als unermüdlicher Motor unseres Lebenskreislaufs. Leider sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Deutschland immer noch Todesursache Nummer 1.“¹ Hohe Kosten werden nicht alleine durch die Diagnostik, Behandlung und die enormen Arzneimittelausgaben verursacht. Zu diesen Ausgaben kommen dann noch die Aufwendungen für die Rehabilitation der Patienten und die weitere Betreuung nach ihrer Entlassung aus dem Krankenhaus hinzu.

Auch in den anderen westlichen Industrieländern Europas und Nordamerikas stehen die kardiovaskulären Erkrankungen mit einem Anteil von 45 % weit oben auf der Liste der Todesursachen. Die kardiovaskuläre Mortalität ist in den letzten Jahrzehnten zahlenmäßig deutlich um jährlich 1,5 % zurückgegangen. Trotzdem ist zu erwarten, dass Herz- und Kreislauf-Erkrankungen zu Beginn des 21. Jahrhunderts weltweit gesehen die Liste der Krankheiten mit Todesfolge bzw. Arbeitsunfähigkeit anführen werden (Christ *et al.*, 1998; Hanrath *et al.*, 1999; Vosberg, 1999). Obwohl viele der Faktoren, die zur kardiovaskulären Morbidität und Mortalität beitragen, erworben sind, tragen genetische Komponenten (Mutationen, Polymorphismen) in erheblichem Umfang zur Ätiologie und Pathogenese dieser Krankheiten bei.

1.2 Die Myokardhypertrophie

Unter Herzhypertrophie wird die infolge chronischer Mehrbelastung des Herzens einsetzende Zunahme von Herzmuskelmasse allein durch die Vergrößerung der Herzmuskelzellen verstanden, die durch harmonisches Faserwachstum bei unveränderter Faserzahl zustande kommt. Die pathologische Veränderung des Herzens soll in Abb. 1.1 anhand des Größenunterschieds zwischen einem erkrankten und einem gesunden menschlichen Herzen verdeutlicht werden. Rechts im Bild wird ein hypertrophiertes, deutlich vergrößertes Herz im Vergleich zu einem normalen Herzen, links, gezeigt.

¹ <http://www.bmbf.de/de/1135.php>

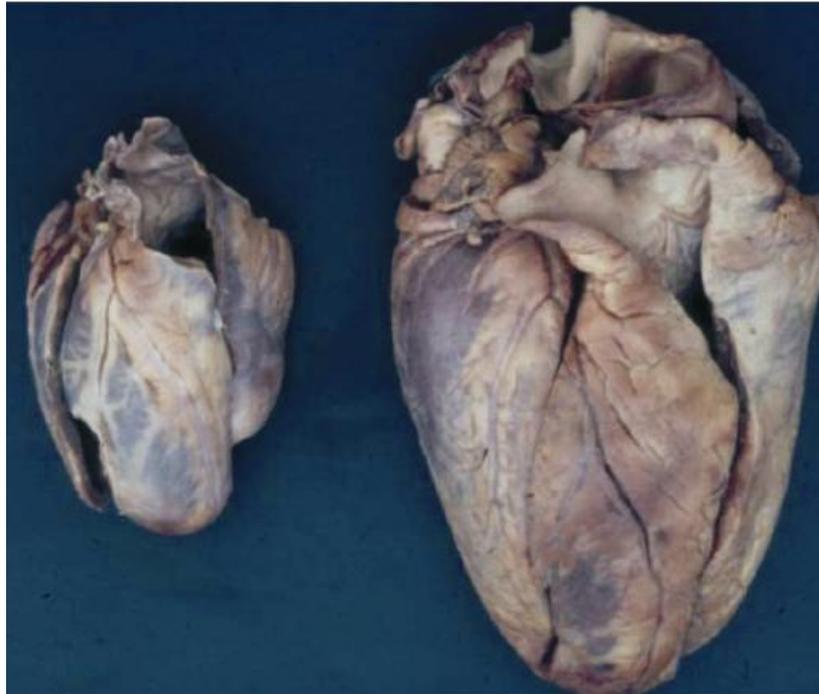


Abb. 1.1: Menschliches Herz: Es ist jeweils ein normales Herz (links) im Vergleich zu einem hypertrophierten Herz (rechts) dargestellt.²

Die Myokardhypertrophie stellt eine Anpassungsreaktion des Herzens auf eine Vielzahl mechanischer und hormoneller Stimuli dar und repräsentiert ein frühes Ereignis im klinischen Ablauf, der zur Herzinsuffizienz (Herzschwäche) führt (Brancaccio *et al.*, 2003). Sie gilt als zuverlässiger Hinweis auf eine sich progressiv entwickelnde chronische Herzinsuffizienz, die mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einhergeht (Levy *et al.*, 1990).

Da das Herz die Stoffwechselfunktionen des Körpers nicht mehr in vollem Umfang aufrechterhalten kann, stellt die Herzinsuffizienz eine schwere und häufig tödliche Erkrankung des Herzmuskels dar. Der verschlechterten Pumpleistung des Herzens können verschiedene Ursachen zugrunde liegen. Zum einen kann sie primär durch einen kranken Herzmuskel selbst (Kardiomyopathie) bedingt sein. Zum anderen kann die Herzkraft sekundär beeinträchtigt sein, wofür als wichtige Ursachen die mangelnde Durchblutung des Herzmuskels aufgrund einer Koronararteriosklerose, der Verlust von funktionierendem Muskelgewebe nach einem Herzinfarkt oder die andauernde Überlastung des Herzmuskels infolge einer chronischen arteriellen Hypertonie (Bluthochdruck) zu nennen wären. Um einer reduzierten Herzleistung entgegen zu wirken, geht die verminderte Pumpleistung des Herzens stets mit einer Aktivierung des vegetativen Nervensystems (Sympathikus) und der Freisetzung von bestimmten

² Abb. entnommen von <http://www.ruhr-uni-bochum.de/homepathologie/Herz3myoweb.pdf>

Hormonen, wie die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin sowie das Renin-Angiotensin-System, einher. Diese neuro-humorale Aktivierung hält den Blutdruck konstant und sichert die Durchblutung peripherer Organe. Ist der Herzmuskel einer lang anhaltenden Überlastung oder Erkrankung ausgesetzt, reagiert er mit strukturellen Änderungen: Erweiterung der Herzkammern, Zunahme der Wanddicke des Herzmuskels. Allerdings resultiert die Vergrößerung der Herzkammern in einer erhöhten Wandspannung des Herzens, die den Blutfluss behindert und letztendlich zu seiner eigenen chronischen Mangelversorgung führt. Um die vermehrte Last und die daraus entstehende erhöhte Wandspannung zu kompensieren, reagiert das Herz mit einem weiteren Mechanismus, der Herzhypertrophie. Es kommt zu einer Zunahme der Herzgröße und der Muskelmasse, wie es sich auch ansatzweise bei den Herzen von gesunden Leistungssportlern („Sportlerherz“) beobachten lässt. Der verdickte, „muskelstarke“ Herzmuskel kann aber keine ausreichend Herzkraft entwickeln. Dieser Widerspruch lässt sich dadurch erklären, dass der Herzmuskel als terminal differenziertes Gewebe gilt. Bei Kardiomyocyten erfolgt die Regeneration nicht durch Zellteilung, sondern durch die Vergrößerung (Hypertrophierung) der einzelnen Zellen, die von einer Vielzahl komplexer Veränderungen begleitet wird. Die Muskelmasse nimmt also nicht durch die Vermehrung gesunder Herzmuskelzellen zu. Den Kompensationsmechanismen des Herzens sind aber klare Grenzen gesetzt. Wird das Herz anhaltend mehr belastet, geht die anfänglich reversible kompensierte Hypertrophie zur dekompenzierten Herzinsuffizienz mit Dilatation über (Holtz, 1992; Frey *et al.*, 2003; Katus *et al.*, 2003).

1.3 Molekulare Mechanismen der Hypertrophie von Kardiomyocyten

Die typischen Merkmale einer Hypertrophie sind eine Vergrößerung der Kardiomyocyten, eine gesteigerte Proteinsynthese und eine Umgestaltung des Sarkomers. Diese Veränderungen des zellulären Phänotyps werden stimuliert und begleitet durch die Reinduktion des so genannten fetalen/ embryonalen Genprogrammes (Parker, 1995; Frey *et al.*, 2003). Auf molekularer Ebene ist die Hypertrophie durch ein verändertes Spektrum der im Herzen exprimierten Gene charakterisiert.

Die Arbeiten der letzten Jahre haben gezeigt, dass mechanische Überlast offenbar mehrere Signalwege aktiviert, um eine hypertrophe Antwort auszulösen (McKinsey *et al.*, 1999). Die Signale oder die Rezeptoren, die der Herzmuskelzelle chronische Überlast anzeigen, sind noch nicht vollständig bekannt. Neben biomechanischem Stress gelten Angiotensin II und Phenylephrine als hypertrophe Stimuli. Ein weiterer Stimulus ist Endothelin-1, als Botenstoff für eine direkte Zell-Zell-Kommunikation identifiziert, wird es *in vitro* von kardialen Nichtmyocyten sezerniert und induziert in kokultivierten Myocyten hypertrophe Merkmale (Harada *et al.*, 1997).

Es konnte die veränderte Expression einiger Wachstumsfaktoren (TGF β 1, IGFII) und deren Rezeptoren im hypertrophen Ventrikelgewebe nachgewiesen werden (Engelmann *et al.*, 1996). Ebenso sind „klassische“ Transkriptionsfaktoren, wie *egr1*, *fos*, *jun*, *myc* (Schunkert *et al.*, 1995), Mitglieder der Proteinkinasen-Kaskade, wie *Rafl*, *MAPKK*, *MAPKs*, (Yamazaki *et al.*, 1996) und *second messenger*, wie *cAMP*, *PKC*, intrazelluläres Calcium, (Schneider *et al.*, 1994) in den Wachstumsprozess involviert.

Eine zentrale Rolle bei der Weiterleitung hypertropher Stimuli spielen G-Proteingekoppelte Rezeptoren, wie z. B. die α_1 - und β_1 -adrenergen Rezeptoren, der Angiotensin II-Rezeptor und der Endothelin-Rezeptor (Rockman *et al.*, 1997; Sugden *et al.*, 1998), die über heterotrimere G-Proteine Effektoren wie *cAMP*, Calcineurin, Phospholipase C (PLC), Proteinkinase C (PKC) und Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) aktivieren. Diese Effektoren wiederum wirken über eigenständige Signalketten auf spezifische Transkriptionsfaktoren im Zellkern. Den aktuellen Stand der Forschung soll der schematische Überblick in Abb. 1.2 widerspiegeln.

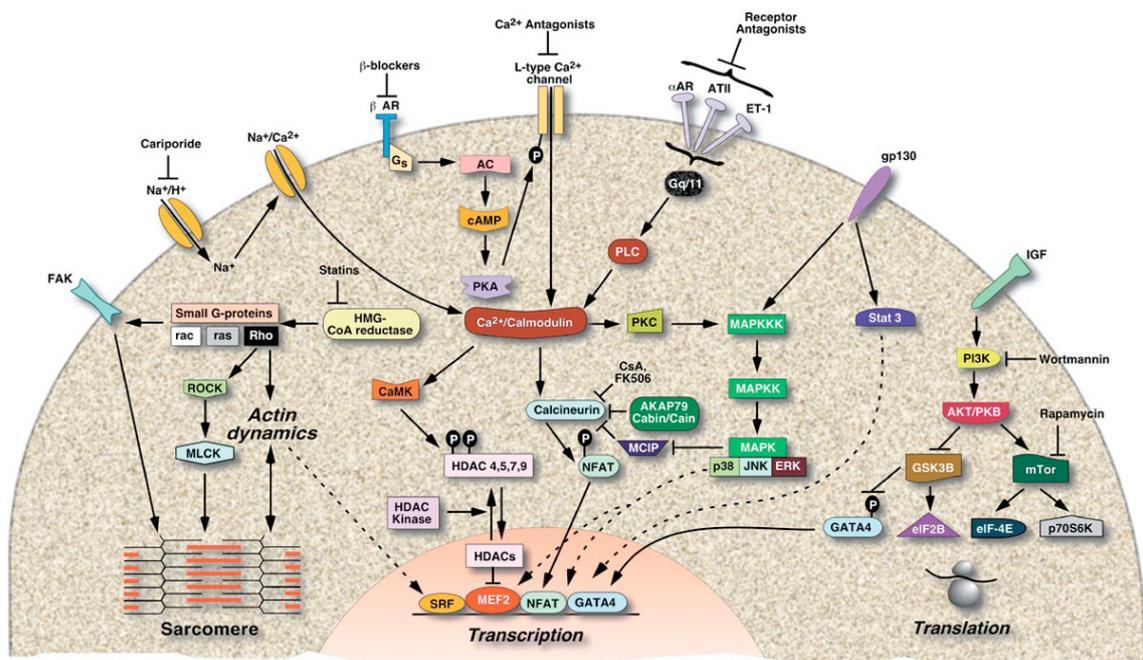


Abb. 1.2: Signaltransduktion bei der kardialen Hypertrophie (Frey *et al.*, 2003)

Eine wichtige Regulationsfunktion kommt dem intrazellulären Calciumgehalt (Ca^{2+}) zu, der die Signalketten über die Effektoren Calcineurin, MAPKs und PLC steuert. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in der Kardiomyocyte steigt z. B. durch mechanischen Stress (Bustamante *et al.*, 1991) oder humorale Stimuli wie Angiotensin II, Phenylephrine oder Endothelin-1 (Sadoshima *et al.*, 1993; Leite *et al.*, 1994; Eble *et al.*, 1998) an. Gut beschrieben ist die Signalkette über Calcineurin, einer Ca^{2+} -abhängigen

Phosphatase, die den membrangängigen Transkriptionsfaktor NT-AF3 aktiviert, der in Kooperation mit dem herzspezifischen Transkriptionsfaktor GATA-4 Gene der hypertrophen Antwort, wie z. B. das natriuretische Peptid Typ B, induziert (Molkentin *et al.*, 1998). Für den cAMP-Weg sind der Mediator PKC und der Transkriptionsfaktor CREB die Transduktionssignale (Rockman *et al.*, 1997).

Die veränderten Eigenschaften des hypertrophierten Myokards sind mit einer komplexen Neuprogrammierung der kardialen Genexpression assoziiert. Die charakteristische Expression fetaler/ embryonaler herzspezifischer Gene umfasst vor allem ein Spektrum kontraktile Proteine der Herzmuskelzelle, wie β -MHC (*β -myosin heavy chain*) und Skelett- α -Actin sowie die Peptidhormone ANF (atrialer natriuretischer Faktor) und BNP (natriuretisches Peptid Typ B). Im Folgenden sind vier wichtige Markergene aufgeführt, für die signifikante Veränderungen der Genexpression im hypertrophierten Herzen gezeigt werden konnten. Eine erhöhte Expression hypertropher Markergene wird berichtet für:

1. den atrialen natriuretischen Faktor (ANF) (Winer *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2001; Hempel *et al.*, 2002)
2. das B-Typ natriuretische Peptid (BNP) (Bruneau *et al.*, 2001; Iemitsu *et al.*, 2002; Sakai *et al.*, 2002)
3. Isoformen-Switching zum Skelett- α -Actin (Clement *et al.*, 1999; Depre *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2001); kardiales und Skelett- α -Actin wird fetal coexprimiert, während kardiales Actin im adulten Herzen überwiegt
4. Isoformen-Switching zum β -MHC (Schoenfeld *et al.*, 1998; Depre *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2002; Thum *et al.*, 2002; Razeghi *et al.*, 2003); β -MHC ist die fetale Isoform, während α -MHC die adulte Isoform darstellt

Über die Faktoren, die dieses Programm auslösen, wird bisher nur spekuliert. Mögliche Stimuli wären Retinsäure oder deren Derivate, die Retinoide, die in der frühen Entwicklung des Herzens eine Schlüsselrolle einzunehmen scheinen (Sucov *et al.*, 1995).

Möglicherweise sind solche Faktoren, die an der frühen Herzentwicklung beteiligt sind, auch in den Entwicklungsprozess der kardialen Hypertrophie involviert. So konnte in einem Hamstermodell mit vererbter Myokardhypertrophie gezeigt werden, dass die Induktion des embryonalen Genprogrammes vor dem Einsetzen der hämodynamischen Überlast erfolgt (Di Nardo *et al.*, 1997). Zur Identifikation der beteiligten Differenzierungs- bzw. Induktionsgene und zum Verständnis der Mechanismen, die zur Hypertrophie des Herzens führen, erscheint es daher sinnvoll, in genetisch bedingten Tiermodellen für Hypertrophie nach solchen Genen zu suchen, die maßgeblich an der Entwicklung und Differenzierung des Herzens beteiligt sind.

1.4 Modellsysteme kardiovaskulärer Erkrankungen

Für die Untersuchung kardiovaskulärer Erkrankungen stehen eine Reihe verschiedener Modellsysteme zur Verfügung, die zum Verständnis der Krankheitsentwicklungen beitragen sollen. Neben Zellkulturen von Kardiomyocyten gibt es diverse Tiermodelle, die auch für die Erforschung der kardialen Hypertrophie angewendet werden. Unter diesen sind die vorrangigen Forschungsobjekte die Maus und diverse Rattenstämme. Für die Maus existieren mittlerweile eine Reihe von *knock out* Varianten (Brancaccio *et al.*, 2003; Izumiya *et al.*, 2003). Des Weiteren gilt der Kardiomyopathische Hamster (CM-Hamster, eine δ -Sarcoglycan-Mangelmutante) als repräsentatives Modell für erbliche dilatierte und hypertrophe Kardiomyopathien des Menschen (Di Nardo *et al.*, 1997; Sakamoto *et al.*, 1997). Ebenfalls zu erwähnen sind Untersuchungen des Muskelcytoskeletts im Sarkomer beim Zebrafisch (Clark *et al.*, 2002; Hoshijima *et al.*, 2002).

Demgegenüber steht das Tiermodell der *Spontan Hypertensiven Ratte* (SHR). Sie wird schon seit Jahren mit ihrem Kontrollstamm, der Wistar-Kyoto-Ratte (WKY), erfolgreich für eine Vielzahl von Studien des Blutdrucks und für die Erforschung kardiovaskulärer Krankheiten verwendet (Dalton *et al.*, 2000; Jurkovicova *et al.*, 2001; Bell *et al.*, 2002; Naito *et al.*, 2002). Die SHR wurde 1963 von Okamoto (Kyoto School of Medicine) aus einer Kreuzung eines Wistar-Kyoto Männchens mit Bluthochdruck und eines Weibchens mit leicht erhöhtem Blutdruck entwickelt. Es erfolgte eine Selektion der Nachkommen von Bruder-Schwester-Kreuzungen auf Bluthochdruck³. Männliche SHR bilden im Alter von 3-4 Monaten spontan eine arterielle Hypertonie (Bluthochdruck) mit einem systolischen Blutdruck größer als 200 mmHg aus, der im weiteren Krankheitsverlauf eine Hypertrophie des linken Herzventrikels und terminales Herzversagen folgen. Einen Überblick hierzu gibt Abb. 1.3 (Gray, 1984; Brilla *et al.*, 1991; Masuzaki *et al.*, 1996). Von der gleichen, oben genannten Einrichtung stammt die WKY als Auszucht einer Linie von Wistar-Ratten. Aufgrund des gemeinsamen Ursprungs ist die WKY-Ratte der geeignete Kontrollstamm zur SHR.

Die Entwicklung der Hypertonie ist, wie beim Menschen, multifaktoriell bestimmt. Durch die Konstruktion kongener Rattenstämme konnten Kandidatenregionen (*quantitative trait loci*; QTLs) für den Blutdruck regulierende Gene auf den Chromosomen 1, 4, 5, 8, 10, 13 und 18 lokalisiert werden (Hilbert *et al.*, 1991; Krenz *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1996; Kovacs *et al.*, 1997a; Kovacs *et al.*, 1997b; Kren *et al.*, 1997), die im homozygoten Zustand in der SHR den Grad der Hypertonie absenken. QTLs für die Entwicklung einer Herzhypertrophie konnten bislang auf den Chromosomen 1, 2 und 14 der Ratte identifiziert werden (Clark *et al.*, 1996; Innes *et al.*, 1998). Die Diversität der Kandidatenregionen für Bluthochdruck und Herzhypertrophie weisen auf unabhängige

³ Quelle: Produktkatalog der Firma Charles River Deutschland, Sulzfeld

genetische Ursachen für beide Krankheitsbilder hin, was in Abb. 1.3 durch den grün-roten Doppelpfeil (links neben dem durchgehenden, roten Pfeil) dargestellt ist.

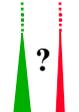
Ratte	Alter (Wochen p.n.)	Phänotyp	
SHR	4	normotensiv	
SHR	12	hypertensiv	
SHR	26	hypertroph	

Abb. 1.3: Entwicklungsstadien der SHR. Die Frage, ob die Hypertrophie eine Folge der Hypertonie oder eine eigenständige Entwicklung darstellt, ist durch die Pfeile symbolisiert.

1.5 Identifizierung von differentiell exprimierten Genen

Für die Identifizierung spezifischer im Herzen exprimierter Gene wurden erfolgreich die Methoden des *differential display* (Masuda *et al.*, 1997; Sirokman *et al.*, 1997) und das *large scale screening and sequencing* von Herz-cDNA-Bibliotheken eingesetzt (Hwang *et al.*, 1997). In einer Weiterentwicklung kann die Identifizierung differentiell exprimierter Gene auch mittels der Methode einer PCR-gestützten, subtraktiven cDNA-Selektion erfolgen (Diatchenko *et al.*, 1996; Gurskaya *et al.*, 1996). Diese Methode erlaubt sowohl die Differenzierung der ausschließlichen Expression eines Gens in einem von zwei Vergleichsgeweben (oder Entwicklungsstadien) als auch die quantitative Unterscheidung der Expressionslevel eines Gens in beiden Geweben. Die Methode der subtraktiven cDNA-Selektion erhöht die Sensitivität der Methode des *differential display* durch die zweimalige Subtraktion redundanter cDNAs aus unterschiedlichen Geweben und die Anreicherung der unterschiedlich exprimierten Sequenzen durch die PCR um mehr als das 1000-fache (Diatchenko *et al.*, 1996). Diese starke Anreicherung selektiv exprimierter Transkripte erhöht deutlich die Wahrscheinlichkeit, auch die auf sehr niedrigem Niveau exprimierten Gene, zu denen z. B. auch Differenzierungsgene oder Transkriptionsfaktoren gehören können, zu identifizieren. Die Sensitivität der Methode sollte es daher auch ermöglichen, eine differentielle Genexpression in der Hypertrophieentwicklung des Herzens im Tiermodell der SHR zu erfassen. Erfolgreich wurde die Methodik bzw. eine Variante (*cDNA representational difference analysis*, cDNA-RDA) bereits für die Identifikation differentiell exprimierter Gene in

Entwicklungsprozessen der Embryogenese (Wada *et al.*, 1997), der Krebsentwicklung (Gress *et al.*, 1997) und bei Patienten mit DiGeorge-Syndrom (Sirotkin *et al.*, 1997) oder Down-Syndrom mit kongenitalen Herzfehlern (Egeo *et al.*, 1998) eingesetzt.

1.6 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation differentiell exprimierter Gene in der Entwicklung der Myokardhypertrophie am Tiermodell der SHR. Aufgrund ihrer Eigenschaften (Abschnitt 1.4) und der stufenweisen Entwicklung des Krankheitsverlaufes erscheint die SHR als ein geeignetes genetisches Modell zum Studium der Entwicklung von Hypertonie und Herzhypertrophie. Im Besonderen erlaubt das Modell der SHR auch die Analyse der molekularen Mechanismen, die das Herz durch mechanische Überlast (Hypertonie) zur Hypertrophierung veranlassen. Mittels der erwähnten Methode einer PCR-gestützten subtraktiven cDNA-Selektion sollte durch subtraktiven Vergleich der Expressionsmuster von Genen im Herzen der SHR während der Entwicklung vom normotensiven zum hypertrophen Tier (Abb. 1.3; nach 4, 12 und 26 Wochen p.n.) solche Gene identifiziert werden, deren Induktion oder Repression die hypertrophe Konversion des Herzens initiieren bzw. charakterisieren. Der subtraktive Vergleich des Expressionsmusters im Herzen der SHR mit etablierter Hypertonie (Abb. 1.3; 12 Wochen p.n.; grüner Pfeil) sollte zusätzliche Erkenntnisse liefern, inwieweit die Hypertonie der SHR eine Vorbedingung für die hypertrophe Konversion des Herzens ist (hämodynamische Überlast) oder eine parallele, unabhängige Entwicklung darstellt. Die identifizierten Gene von normotensiven, hypertonen und hypertrophen Ratten sollten ansequenziert, quantitativ durch *real-time* RT-PCR analysiert und ihre chromosomale Colokalisation mit bekannten QTLs für Herzhypertrophie überprüft werden. Aus diesen Informationen der Kandidatengene für die Herzhypertrophierung sollten sich Hinweise für Induktions- oder Signalkaskaden im sich hypertroph entwickelnden Herzventrikel der SHR ableiten lassen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Soweit nicht anders genannt, wurden die verwendeten Chemikalien, Enzyme und Feinchemikalien von folgenden Firmen bezogen:

- Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
- Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
- Clontech, Heidelberg
- Fluka, Neu-Ulm
- Gibco BRL, Eggenstein
- Merck KgaA, Darmstadt
- Roche Diagnostics, Mannheim
- Sigma, Deisendorf

2.1.1 Laborchemikalien und Radiochemikalien

Advantage [®] UltraPure dNTPs	Clontech
ExpressHyb [™] Hybridization Solution	Clontech
Hybond [™] -N+	Amersham Life Science
MicroSpin [™] G-50 Columns	Amersham Pharmacia Biotech
ULTRAhyb [™]	Ambion
[α - ³² P]dCTP	MP Biochemicals, Eschwege

2.1.2 Enzyme und vorgefertigte Systeme (Kits)

Advantage [®] 2 Polymerase Mix (50 \times ; A2-Polymerase)	Clontech
Omniscript [™] Reverse Transcriptase	Qiagen
AdvanTAge [™] PCR Cloning Kit	Clontech
Clontech PCR-Select [™] cDNA Subtraction Kit	Clontech
FlexiPrep [™] Kit	Amersham Pharmacia Biotech
NucleoSpin [®] Extraction Kit	Clontech
PCR-Select Differential Screening Kit	Clontech
PolyATtract [®] System 1000	Promega
Ready-To-Go [™] DNA Labelling Beads (-dCTP)	Amersham Pharmacia Biotech
Thermo Sequenase Dye Terminator Cycle Sequencing Premix Kit	Amersham Pharmacia Biotech

2.1.3 Molekulargewichts-Standards

Bezeichnung	NS	Größenbereich	Firma
pUC Marker 8	DNA	0,019-1,12 kb	MBI Fermentas, Lithuania
Lambda DNA/Eco130I; M 16	DNA	0,42-19,33 kb	MBI Fermentas, Lithuania
Marker I	RNA	0,3-6,9 kb	Roche, Mannheim
Marker II	RNA	1,5-6,9 kb	Roche, Mannheim

2.1.4 Gebrauchslösungen

<u>Blocklösung (Dot Blot)</u>	10 mg/ml 0,3 mg/ml	Lachsspermien-DNA, geschnitten Oligonukleotide, den <i>Nested</i> Primern & komplementären Sequenzen entsprechend
<u>Blocklösung (Northern)</u>	100 µl 100 µl	Lachsspermien-DNA (6mg/ml) Plazenta-DNA (1:10)
<u>DEPC-H₂O</u>	1,0 ml	Diethylpyrocarbonat (DEPC) zu 1 l ddH ₂ O (0.1 % v/v), 1 h rühren, autoklavieren
<u>20× EDTA/ Glycogen</u>	0,2 M 1,0 mg/ml	EDTA Glycogen
<u>LB-Medium (Luria-Bertani)</u>	1,0 % 0,5 % 1,0 %	Bacto-Trypton Hefeextrakt NaCl
<u>10× MOPS</u>	200 mM 50 mM 10 mM	3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure Natriumacetat EDTA
<u>10× PBS</u>	pH 7,0 mit NaOH 145 mM 70 mM 30 mM	NaCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄
	1× PBS	pH 7,2
<u>10× Probenpuffer</u>	50 % 0,25 %	Glycerin Bromphenolblau in TE
<u>5× RNA-Ladepuffer</u>	16 µl 80 µl 720 µl 2,0 ml 3,1 ml 4,0 ml	gesättigtes Bromphenol-Blau EDTA, 500 mM, pH 8,0 Formaldehyd, 37 % (=12,3 M) Glycerol, 100 % Formamid 10× MOPS
		Gesamt-Vol. mit DEPC-H ₂ O auf 10 ml bringen
<u>Stop-Lösung</u>	0,1 M 0,5 mg/ml	EDTA Hefe-tRNA

<u>50× TAE</u>	242 g	Tris	
	57 ml	Eisessig	
	37,2 g	EDTA	
<u>10× TBE</u>	89 mM	Tris	
	89 mM	Borsäure	
	2,5 mM	Na-EDTA	
<u>TE</u>	10 mM	Tris-HCl (pH 8,0)	
	1,0 mM	EDTA	
<u>Waschlösung (Dot Blot) 1</u>	2,0× SSC / 0,1 % SDS		(niedrig stringent)
<u>Waschlösung (Dot Blot) 2</u>	0,1× SSC / 0,1 % SDS		(hoch stringent)
<u>Waschlösung (Northern) 1</u>	2,0× SSC / 0,5 % SDS		(niedrig stringent)
<u>Waschlösung (Northern) 2</u>	0,2× SSC / 0,5 % SDS		(hoch stringent)

2.1.5 Sequenzen und Herkunft der synthetischen Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech, Biosource (Belgien) und Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert.

Primer-Sequenzen (5' → 3')

cDNA Synthese Primer: TTTTGTACAAGCTT₃₀N-₁N

bAct-Fw: AAGTGTGACGTTGACATCCG	gSG-Fw: TGAGCACCCATTTCAAGACC
bAct-Rv: ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	gSG-Rv: CCTGTGTCCCCTGCTTCAAC
GAPDH 5': ACCACAGTCCATGCCATCAC	28-2-Fw: CCTTATGGGTCCCGGAGGTC
GAPDH 3': TCCACCACCCTGTTGCTGTA	28-2-Rv: GCGAGACAACGGGAGTCAAC
77-Fw: AACAGACGAAGAATGACCCG	33-Fw: AACGGACGGACGACGGAAAG
77-Rv: AGTACTCTGACCTCGGAAATC	33-Rv: CGACTCAGCCACACGAGGAG
92-Fw: TTATTTCTTCAGCGTGGCTC	65-Fw: CCCGTGTAAGGTTTAGCAAT
92-Rv: AGGGATCCACACAGGATTTG	65-Rv: CTACTTGGGTTGCAGTCAAT

Nested PCR-Primer 1:

TCGAGCGGCCGCCCCGGGCAGGT

(komplementär zum 3'-Bereich von Adapter 1)

Adapter 1:

CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCCGGGCAGGT
GGCCCCGTCCA

PCR-Primer 1:

CTAATACGACTCACTATAGGGC

(komplementär zum 5'-Bereich von Adapter 1 und Adapter 2R)

Adapter 2R:

CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT
CCGGCTCCA

Nested PCR-Primer 2R:

AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT

(komplementär zum 3'-Bereich von Adapter 2R)

2.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten weibliche NMRI-Mäuse aus dem Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Martin-Luther-Universität und 10 männliche SHR sowie 10 männliche WKY-Ratten der Firma Charles River Deutschland GmbH. Es handelte sich um 3 SHR im Alter von 4 Wochen und 7 SHR im Alter von 11 Wochen sowie gleichaltrige WKY-Ratten im gleichen Verhältnis. Die Tierversuche waren genehmigt, das Deutsche Tierschutzgesetz wurde beachtet. Die Ratten wurden bis zur Verwendung im ZMG unter Standardbedingungen weitergezüchtet. Jeweils 2-3 Tiere wurden in normierten Käfigen mit Standardeinstreu für Labortiere gehalten. Futter und Wasser wurden frei zur Verfügung gestellt. In den Stallungen herrschte ein Hell-/Dunkel-Rhythmus von jeweils 12 Stunden.

2.2.1 Blutdruck- und Herzfrequenzmessungen bei den Ratten

Im Alter von 12 und 26 Wochen wurden Blutdruck- und Herzfrequenzmessungen an den Ratten durchgeführt. Die Bestimmung von systolischem Blutdruck und Herzfrequenz erfolgte nach der *tail-cuff*-Methode nicht-invasiv am Schwanz der nicht-narkotisierten Ratte. Bei dem verwendeten Meßsystem handelte es sich um das Sphygmomanometer S-2 (Firma Hugo Sachs Elektronik, March/ Freiburg). Die Ratten wurden in einer Plastikröhre fixiert, sodass nur noch der Schwanz herausragte. Zur Beruhigung und Erwärmung wurden die Ratten für 20 min in der Wärmebox mit einer Temperatur von 37°C platziert. Druckmanschette und Pulssensor wurden auf den Schwanz direkt bis hinter die Schwanzwurzel aufgeschoben. Die Temperatur-induzierte Dilatation der Schwanzarterie führte zu einer messbaren Pulswelle, die auf einem Oszillografen dargestellt wurde. Die Druckmanschette wurde bis zum Verschluss der Schwanzarterie aufgepumpt, wodurch der Pulssensor keine Pulsation mehr erkennt. Es

folgte eine Druckabsenkung der Manschette bis zum Wiedereinsetzen des Pulssignals. Der abgelesene Druck wurde als systolischer Blutdruck protokolliert. Die Herzfrequenz wurde aus dem Pulssignal errechnet. Zwei Messreihen wurden einen Tag vor und am Tag der Organentnahme als Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.2.2 Organentnahme

Die Tiere wurden mit Halothan (Rüsch, Böblingen) narkotisiert und durch Durchtrennung der Halswirbelsäule getötet. Die Ratten wurden gewogen, der Brustkorb geöffnet, die Herzen entnommen und in eiskaltem 1× PBS-Puffer gespült. Nach der Bestimmung des Herzgewichts erfolgte sofort als Vorbereitung der RNA-Isolierung (siehe Abschnitt 2.4) die Aufnahme des Gewebes in GTC-Extraktionspuffer (Promega) mit β -Mercaptoethanol (β ME, 48,7 % β ME / ml GTC-Puffer). Dazu wurden die Herzen mit einem Ultra-Turrax (IKA Labortechnik, Staufen) in 800 μ l Puffer /100 mg Gewebe auf Eis homogenisiert und bei -20°C zur baldigen Weiterverarbeitung eingefroren.

2.3 Molekularbiologische Standardmethoden

Soweit nicht anders beschrieben, wurde die Durchführung der molekularbiologischen Standardmethoden im wesentlichen von Sambrook *et al.* (1998) entnommen.

2.3.1 Agarosegel-Elektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte in 1-2 %-igen Agarosegelen (w/v) in 1× TAE-Puffer. Die Proben wurden in 0,1 Vol. 10× Probenpuffer aufgenommen, mit einem Längenstandard aufs Gel aufgetragen und bei 5-10 V/cm aufgetrennt. Das Gel wurde in EtBr-Lösung (0,7 μ g/ml) gefärbt, die DNA-Banden auf einem UV-Transilluminator visualisiert und fotografisch dokumentiert.

2.3.2 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

Polyacrylamidgele wurden für die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten unter 500 bp Länge verwendet. Es wurden 14 cm \times 16 cm große Gele mit 1,5 mm Dicke und einem Acrylamidanteil von 4-12 % eingesetzt. Die Elektrophorese wurde in Vertikalkammern für 2-3 Stunden bei konstanter Spannung von 5-8 V/cm in 1× TBE-Puffer durchgeführt. Die DNA konnte durch Ethidiumbromidfärbung unter UV-Bestrahlung sichtbar gemacht werden (siehe 2.3.1).

2.3.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente und PCR-Produkte wurden nach elektrophoretischer Auftrennung folgendermaßen aus dem Gel isoliert. Zwei 1,5 ml Tubes wurden ineinander gesteckt, wobei das obere im Boden ein kleines Loch und innen einen Filterpapiertrichter enthielt. Die unter UV-Licht als Gel-Blöckchen ausgeschnittenen DNA-Banden wurden in obiges System gegeben, mit 50 µl ddH₂O überschichtet und 20 s bei 10000 rpm zentrifugiert. Die DNA wurde anschließend gefällt (siehe Abschnitt 2.3.4).

2.3.4 Phenol-/ Chloroform-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren

Zur Aufreinigung von DNA/ RNA wurde 1 Vol. eines Phenol-/ Chloroform-Gemisches (1:1) zugegeben und 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die Oberphase wurde mit Chloroform extrahiert. Die DNA /RNA wurde aus der wässrigen Oberphase durch 0,1 Vol. NaAc (3 M) und 2,5 Vol. 96 % EtOH (-20°C) bzw. 0,7 Vol. Isopropanol bei -20°C für 30 min präzipitiert und bei 14000 rpm für 20 min/ 4°C pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70 % EtOH gewaschen und in ddH₂O aufgenommen.

2.3.5 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA und RNA

Die Quantifizierung der DNA bzw. RNA erfolgte mit dem Spektrophotometer Ultraspec III (Pharmacia Biotech). Der A₂₆₀-Wert erlaubt die Berechnung der DNA- bzw. RNA-Konzentration der Probe. Eine A₂₆₀-Einheit entspricht ca. 50 µg/ml an ds DNA und 40 µg/ml an ss DNA und RNA. Der A₃₂₀-Wert gibt einen Hinweis auf Verunreinigungen mit Salzen, das Verhältnis A₂₆₀/ A₂₈₀ über die Reinheit (1,8 bzw. 2,0). Die Konzentration z. B. von DNA errechnet sich wie folgt:

$$c_{\text{DNA}} = (A_{260} - A_{320}) \times f \times 50 \text{ µg/µl}$$

c_{DNA}, Konzentration; A, Absorption bei entsprechender Wellenlänge; f, Verdünnungsfaktor

2.3.6 Isolierung von Plasmid-DNA

Die subklonierte cDNA wurde mit Hilfe des pT-Adv-Vektors in *E. coli* vermehrt (siehe 2.6) und die Plasmid-DNA nach einer modifizierten Methode der alkalischen Lyse isoliert, wofür der FlexiPrep™ Kit benutzt wurde. Von rekombinanten *E. coli*-Einzelkolonien wurden Schüttelkulturen durch Animpfen von 6 ml LB/Amp-Medium mit 10 µl Bakteriensuspension angelegt und bei 37°C/ 225 rpm über Nacht wachsen gelassen. Die Bakterien aus je 2 ml Kultur wurden durch Zentrifugation bei 13000 rpm/ 30 s vom Medium getrennt und aus dem Pellet die Plasmid-DNA entsprechend der Anleitung des FlexiPrep™ Kits isoliert.

2.3.7 Herstellung von Stammkulturen

Es wurden 850 µl Bakterienkultur (siehe 2.3.6) mit 150 µl sterilem Glycerin in einem 1,5 ml-Tube gemischt. Die Glycerin-Stocks wurden sofort für 5 min auf Trockeneis gestellt, um ein Sedimentieren der Bakterien zu verhindern, und bei -70°C gelagert.

2.4 Isolierung von poly(A⁺)-RNA

Für die Isolierung von poly(A⁺)-RNA aus Gewebe wurden der PolyATtract[®] System 1000-Kit eingesetzt und die Herzmuskelzellen zusätzlich mit Proteinase K zum optimalen Aufschluss behandelt. Das homogenisierte Herzgewebe (Abschnitt 2.2.2) wurde in 70°C Verdünnungspuffer (1,6 ml/100 mg Gewebe; enthält βME) aufgenommen. Nach Zugabe von 35 µl Proteinase K (20 mg/ml) pro 100 mg Gewebe wurde 10 min bei 55°C und nach Zugabe der biotinylierten oligo(dT)-Sonde (100 pmol/100 mg Gewebe) 5 min bei 70°C inkubiert. Das Lysat wurde in sterilen 15 ml-Tubes 10 min bei 12000 rpm/ RT zentrifugiert. Die *Streptavidin MagneSphere[®] Paramagnetic Particles* (SA-PMPs, 1,2 ml/100 mg Gewebe) wurden abseits vom Magnetständer in ein 15 ml-Tube gegeben und durch Neigen in die Horizontale im Magnetständer eingefangen. Die Partikel wurden in 1,2 ml/100 mg Gewebe 0,5× SSC resuspendiert, zweimal gewaschen und wieder in 0,5× SSC resuspendiert. Es folgten die Zugabe des klaren Überstandes der Zentrifugation zu den SA-PMPs (entfernt vom Magnetständer) und Inkubation für 2 min bei RT. Die SA-PMPs wurden mittels Magnetständer eingefangen und in 1 ml/100 mg Gewebe 0,5× SSC resuspendiert und im selben Puffer gewaschen. Es folgte die Elution der RNA in 800 µl/100 mg Gewebe DEPC-H₂O, die Entfernung der SA-PMPs und die Bestimmung der Konzentration der RNA. Zur Verhinderung der RNA-Degradation wurden alle Arbeiten mit DEPC-H₂O durchgeführt.

2.5 Subtraktive Suppressions-Hybridisierung (cDNA-Subtraktion)

Die subtraktive Hybridisierung ist eine leistungsfähige Methode, die den Vergleich zweier mRNA-Populationen ermöglicht und Klone liefert, welche in der einen Population exprimiert werden und in der anderen nicht. Es wurden die mRNAs der Herzen von SHR im normotensiven (SHR-04), im hypertonen (SHR12) und im hypertrophen Stadium (SHR-26) miteinander verglichen (Abb. 2.1). Zur Normalisierung gegen die regelrechte Genexpression in der Herzentwicklung wurden die Herzen von Kontrolltieren des Wistar-Kyoto-Rattenstammes verwendet (Abb. 2.1). Für die subtraktive Hybridisierung wurde der Clontech PCR-Select[™] cDNA Subtraction Kit verwendet. Putativ differentiell exprimierte Klone wurden durch ein differentielles Screening

überprüft und durch Northern-Hybridisierung sowie Sequenzierung weiter analysiert. mRNA-Populationen, die spezielle (differentiell exprimierte) Transkripte enthalten, werden als *Tester* bezeichnet (siehe Abb. 2.2). Die Referenz-RNA ist der *Driver*.

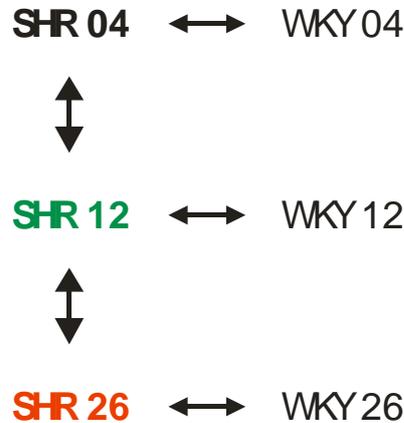


Abb. 2.1: Überblick über die durchgeführten cDNA-Subtraktionen

2.5.1 Molekulare Grundlagen der PCR-gestützten cDNA-Subtraktion

In Abb. 2.2 sind die molekularen Abläufe der PCR-gestützten cDNA-Subtraktion dargestellt, die dem Benutzerhandbuch des Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit entnommen sind. Aus poly(A⁺)-RNA von zwei zu vergleichenden Rattenherzen wird die cDNA synthetisiert. Tester und Driver werden mit *Rsa I* geschnitten, was in glatten DNA-Enden resultiert. Die Tester-cDNA wird aufgeteilt und jede Hälfte mit einem unterschiedlichen cDNA-Adapter ligiert. Die Enden der Adapter besitzen keine Phosphatgruppe, so dass nur ein Strang eines jeden Adapters an das 5'-Ende der cDNA passt. Die beiden Adapter besitzen identische Sequenzenabschnitte, was nach Auffüllung der fehlenden Adapterstränge die Anlagerung der PCR-Primer ermöglicht.

Zwei Hybridisierungen werden durchgeführt (Abb. 2.2, siehe auch Tab. 2.1). Bei der ersten wird jede Testerprobe mit einem Überschuss an Driver hitzedenaturiert und den Proben die Möglichkeit zur Anlagerung gegeben. Es entstehen einzelsträngige (ss) und doppelsträngige (ds) cDNA-Moleküle entweder mit Adapter oder ohne. Speziell durch die ss cDNAs mit Adapter werden Konzentrationsunterschiede zwischen niedrig- und hochexprimierten Sequenzen ausgeglichen, weil die Wiederanlagerung für hochexprimierte Moleküle aufgrund der Kinetik zweiter Ordnung der Hybridisierung schneller erfolgt. Von diesen ss Testermolekülen mit Adapter werden die differentiell exprimierten Sequenzen signifikant angereichert, wohingegen die nicht differentiell exprimierten Sequenzen Doppelstränge mit dem Driver bilden.

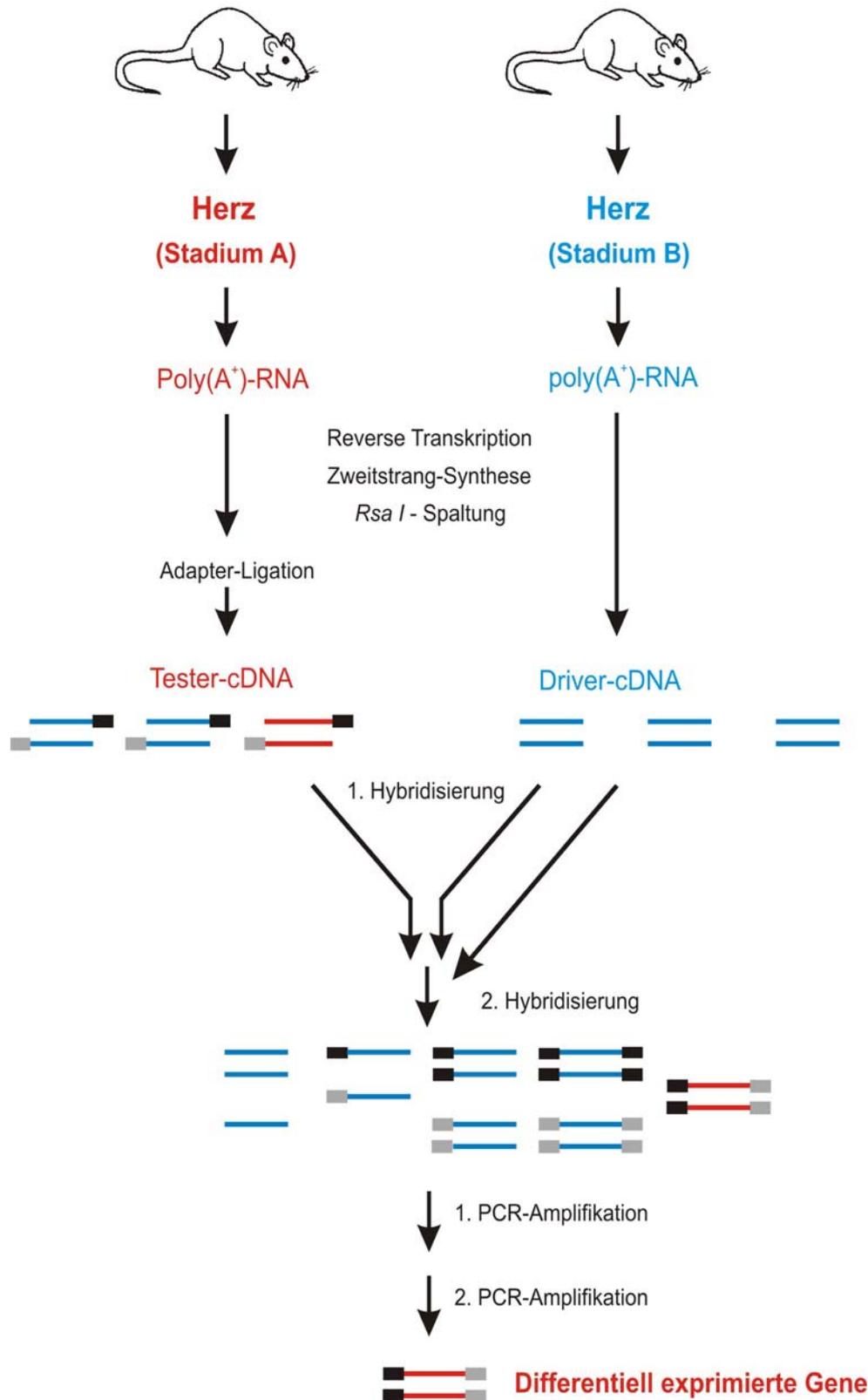


Abb. 2.2: Schema der subtraktiven Suppressions-Hybridisierung. Während der ersten Hybridisierung wird die Tester-cDNA mit einem Überschuss an Driver-cDNA hybridisiert, wobei aufgrund der Reaktionskinetik die Anlagerung hoch exprimierter Sequenzen schneller erfolgt. Die einzelsträngigen, differentiell exprimierten Testermoleküle mit Adapter werden signifikant angereichert, bilden während der zweiten Hybridisierung DNA-Doppelstränge, von denen nur diejenigen mit zwei unterschiedlichen Adaptern an beiden Enden aufgrund des Suppressionseffektes selektiv amplifiziert werden.

Während der zweiten Hybridisierung werden die beiden ersten Hybridisierungsproben ohne vorherige Denaturierung gemischt. Es können sich jetzt nur die übrig gebliebenen normalisierten und subtrahierten ss Tester-cDNAs zusammenlagern und neue Hybride bilden. Diese neuen Hybride sind ds Tester-Moleküle mit zwei unterschiedlichen Adaptern an den Enden. Frisch denaturierte Driver-cDNA wird erneut ohne Denaturierung des Subtraktionsgemisches hinzu gegeben, um die genannten neuen ds Tester-cDNAs als differentiell exprimierte Sequenzen weiter anzureichern. Nachdem die DNA-Stränge an den Enden durch DNA-Polymerase aufgefüllt wurden, besitzen die ds Tester-cDNAs unterschiedliche Bindungsstellen für Primer an ihren Enden.

Alle in Abb. 2.2 dargestellten Moleküle werden dann mittels PCR amplifiziert, um die gewünschten differentiell exprimierten Sequenzen anzureichern. Während der PCR werden ss cDNAs mit und ohne Adapter und ds cDNAs ohne Adapter aufgrund der fehlenden Primerbindungsstellen nicht amplifiziert. Moleküle, die zwar ds sind, aber nur an einem Ende Adapter haben, besitzen nur eine Primerbindungsstelle, so dass nur eine lineare Amplifikation möglich ist. Wegen des so genannten *Suppression PCR*-Effektes bilden die meisten ds Tester-cDNAs mit gleichen Adaptern an ihren Enden Haarnadelstrukturen, die eine exponentielle Amplifikation verhindern. Suppression tritt auf, wenn sich nach dem Denaturierungsschritt an den Enden der ss cDNA die komplementären Sequenzen der Adapter befinden. Während jedes *Annealing*-Schrittes (Anlagerung) bevorzugt die Hybridisierungskinetik sehr stark - stärker als die Anlagerung der kürzeren Primer - die Ausbildung von haarnadelförmigen Sekundärstrukturen, die eine Primeranlagerung verhindern. Selbst wenn die Primeranlagerung einmal unspezifisch vorkommen sollte, würde im nächste Zyklus die weitere Amplifikation des neu synthetisierten cDNA-Stranges durch den beschriebenen Effekt effizient unterdrückt werden. Lediglich ds Tester-cDNAs mit zwei ungleichen Adaptern an ihren Enden können exponentiell amplifiziert werden und stellen die normalisierten, differentiell exprimierten Sequenzen dar. Durch eine zweite PCR-Amplifikation mit *nested* Primern werden erneut unspezifische PCR-Produkte reduziert und differentiell exprimierte Sequenzen angereichert.

2.5.2 Erst- und Zweit-Strang-Synthese der cDNA

Von Tester und Driver wurden jeweils 2 µg poly(A⁺)-RNA mit 10 pmol cDNA Synthesis Primer für 2 min bei 70°C in einem Thermocycler und danach auf Eis inkubiert. Die Erststrangsynthese wurde bei 42°C für 90 min mit 20 U AMV Reverse Transcriptase durchgeführt. Dieser Schritt fand im Hybridisierungsöfen statt, um niedrigere Reaktionseffizienzen durch Verdunstung zu vermeiden. Direkt anschließend erfolgte die Zweitstrangsynthese durch Zugabe eines Enzymcocktails, bestehend aus

DNA-Polymerase I (6 U/ μ l), RNase H (0,25 U/ μ l) und *E. coli* DNA-Ligase (1,2 U/ μ l), und Inkubation für 2 Stunden bei 16°C. Um glatte Enden zu erzeugen, wurden 6 U T4 DNA-Polymerase hinzu gegeben und für weitere 30 min bei 16°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 4 μ l 20 \times EDTA/ Glycogen beendet. Die synthetisierte ds cDNA wurde durch Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol-Extraktion (25:24:1) und Chloroform : Isoamylalkohol-Reextraktion (24:1) gereinigt und durch Zugabe von NH₄OAc (Endkonzentration 400 mM) und 2 Vol. 100 % EtOH präzipitiert. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm/ 4°C für 20 min wurde das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen, luftgetrocknet und in 50 μ l ddH₂O gelöst. Von der synthetisierten ds cDNA wurden 5 μ l für eine Agarosegel-Elektrophorese eingesetzt.

2.5.3 Restriktionsansatz: *Rsa I*-Spaltung

Die übrigen 45 μ l der synthetisierten ds Tester- und Driver-cDNA wurden mit 15 U *Rsa I* für 1 h geschnitten, um kürzere, glatte ds cDNA-Fragmente mit einer Größe von ca. 0,2-1,2 kb zu generieren. Nach Beendigung der Reaktion mit 1 \times EDTA/ Glycogen wurde die Effizienz der *Rsa I*-Spaltung durch Agarosegel-Elektrophorese analysiert. Die cDNA-Fragmente wurden gereinigt wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben.

2.5.4 Adapterligation

Um zu ermöglichen, dass speziell nur Tester-cDNAs nach der Hybridisierung amplifiziert werden, aber nicht Driver-cDNAs, wurden nur an die *Rsa I* geschnittenen Tester-cDNA-Fragmente Adapter ligiert. Die Tester-cDNA wurde geteilt in Tester-cDNA 1 und Tester-cDNA 2 und an jede Gruppe der entsprechende Adapter ligiert: Adapter 1 bzw. Adapter 2R (siehe auch Abb. 2.3). Die Reaktion wurde über Nacht bei 16°C mit 400 U T4-DNA-Ligase durchgeführt, mit 1 \times EDTA/ Glycogen gestoppt und die Ligase bei 72°C für 5 min hitzedeaktiviert.

Anschließend wurde mittels eines PCR-Experimentes die Ligationseffizienz ermittelt, um sicherzustellen, dass wenigstens 25 % der cDNAs Adapter an beiden Enden tragen. Dazu war die PCR mit komplementären Primern zu den ligierten Adaptern und GAPDH-Primern derart gestaltet, dass nur cDNA-Fragmente amplifiziert wurden, die die Adapter-cDNA-Verbindung von Tester 1 bzw. Tester 2 überspannen. Das soll beispielhaft an Tester 1 verdeutlicht werden: Die Amplifikation von Tester 1-1 mit den Primern GAPDH 5' und GAPDH 3' stellt einen imaginären Basiswert von 100 % dar, wogegen mit dem Primerpaar PCR Primer 1/ GAPDH 3' Schätzungen über die prozentuale Ligationseffizienz möglich sind. Die PCR-Produkte werden auf ein Agarosegel aufgetragen und die Bandenintensitäten verglichen.

2.5.5 Erste und zweite Hybridisierung

Bei diesem Schritt wurde ein Überschuss an Driver-cDNA zur Tester-cDNA zugegeben, die Proben hitzedenaturiert und den Proben die Möglichkeit zum *Annealing* gegeben. Die Tab. 2.1 soll die Vorgehensweise bei der subtraktiven Hybridisierung verdeutlichen. Während der ersten Hybridisierung wurde die Driver-cDNA entweder mit Adapter 1- oder Adapter 2R-ligierter Tester-cDNA gemischt. Diese Hybridisierung wurde nach Denaturierung bei 98°C für eine Dauer von 8 h bei 68°C durchgeführt. Die im Tester- und Driver-Pool redundanten cDNAs bildeten ds Hybride aus. Die verbleibenden ss cDNAs, die einer zweiten Hybridisierung zur Verfügung standen, waren dadurch mit differentiell exprimierten Sequenzen angereichert.

Tab. 2.1: Übersicht über den Hybridisierungsansatz zweier paralleler cDNA-Subtraktionen. fw: vorwärts; rv: rückwärts; sub: subtrahiert; HS: Hybridisierungsprobe

SHR-12 _{rv} $\leftarrow \Rightarrow$ ^{fw} SHR-26				WKY-26 _{rv} $\leftarrow \Rightarrow$ ^{fw} SHR-26			
Vorwärts-Subtraktion		Rückwärts-Subtraktion		Vorwärts-Subtraktion		Rückwärts-Subtraktion	
1. Hybridisierung							
<u>SHR-26</u> <u>HS 1</u>	<u>SHR-26</u> <u>HS 2</u>	<u>SHR-12</u> <u>HS 1</u>	<u>SHR-12</u> <u>HS 2</u>	<u>SHR-26</u> <u>HS 1</u>	<u>SHR-26</u> <u>HS 2</u>	<u>WKY-26</u> <u>HS 1</u>	<u>WKY-26</u> <u>HS 2</u>
Tester 1 SHR-26 +	Tester 2 SHR-26 +	Tester 1 SHR-12 +	Tester 2 SHR-12 +	Tester 1 SHR-26 +	Tester 2 SHR-26 +	Tester 1 WKY-26 +	Tester 2 WKY-26 +
Driver SHR-12	Driver SHR-12	Driver SHR-26	Driver SHR-26	Driver WKY-26	Driver WKY-26	Driver SHR-26	Driver SHR-26
2. Hybridisierung							
<u>SHR-26</u> <u>HS 1 + HS 2</u> +		<u>SHR-12</u> <u>HS 1 + HS 2</u> +		<u>SHR-26</u> <u>HS 1 + HS 2</u> +		<u>WKY-26</u> <u>HS 1 + HS 2</u> +	
Driver SHR-12		Driver SHR-26		Driver WKY-26		Driver SHR-26	
SHR-26, fw-sub		SHR-12, rv-sub		SHR-26, fw-sub		WKY-26, rv-sub	

Die zweite Hybridisierung, bei der die Proben der ersten Hybridisierung miteinander gemischt wurden und denen denaturierte Driver-cDNA zugegeben wurde, fand bei 68°C über Nacht statt. Es entstanden neue Hybride mit unterschiedlichen Adaptern an jedem Ende, welche die differentiell exprimierten cDNAs des Testers repräsentierten.

2.5.6 Erste und zweite PCR-Amplifikation

Die differentiell exprimierten cDNAs aus dem vorangegangenen Absatz wurden selektiv durch zwei PCR-Reaktionen amplifiziert. Vor der Amplifikation wurden die fehlenden Stränge der Adapter durch einen Präinkubationsschritt bei 75°C für 5 min in Gegenwart von A2-Polymerase aufgefüllt. Die erste PCR-Reaktion wurde mit Primer 1 durchgeführt, der an beide Adapter 1 und 2R binden kann, mit 27 Zyklen bei 68°C *Annealing*-Temperatur. Eine zweite PCR mit 12 Zyklen und 68°C *Annealing*-

Temperatur wurde mit *Nested* Primer 1 und 2R durchgeführt, die an die Adapter 1 bzw. 2R binden können. Die PCR-Produkte beider PCRs wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese (2 %/ 1× TAE) analysiert. Das Produkt der zweiten Amplifikation enthält die angereicherten differentiell exprimierten cDNAs der Testerpopulation, die in unterschiedlicher Anzahl in der Original-mRNA vorkamen, und die jetzt zusätzlich in annähernd gleichen Verhältnissen vorliegen sollten.

2.6 Herstellung der subtraktiven cDNA-Bibliothek

Die amplifizierten PCR-Produkte haben 3'-Enden mit einem einzelnen Desoxy-adenosin-Überhang (A). Nach der zweiten Amplifikation wurden die PCR-Produkte mittels des AdvanTAge™ PCR Cloning Kit direkt in den Vektor pT-Adv (enthält ein einzelnes Thymidin (T)) kloniert, um subtraktive cDNA-Bibliotheken zu erstellen.

Von den PCR-Produkten der zweiten Amplifikation wurden jeweils 3 µl für einen Ligationsansatz mit 50 ng pT-Adv-Vektor und 4 U (Weiss) T4-DNA-Ligase eingesetzt. Die Reaktionen wurden über Nacht bei 14°C inkubiert. Von jedem Ligationsansatz wurden 2 µl in 50 µl kompetente Zellen *TOP10F' E. Coli* transformiert. Dazu wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert, für 30 s im 42°C-Wasserbad hitzegeschockt und für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium (RT, Gibco BRL) wurden die Zellen in einem Schüttelinkubator bei 37°C für 1 h bei 225 rpm inkubiert. Es wurden 50 µl und 200 µl jedes Transformationsansatzes auf LB/ X-Gal/ IPTG-Platten ausplattiert, die 50 µg/ml Ampicillin (50 mg/ml Stammlösung) enthielten. *TOP10F' E. coli* Zellen exprimieren den lacZ-Repressor (LacI^q), welcher die Transkription vom lac-Promoter verhindert. Durch die Zugabe von 40 µl X-Gal (40 mg/ml Stammlösung) und IPTG (100 mM Stammlösung) zu den Agarplatten kann lacZα exprimiert werden, was ein *blue-white*-Screening nach Inserts rekombinanter Bakterien (weiße Kolonien) ermöglichte. Die Platten wurden 18 h bei 37°C und danach noch für 2 h bei 4°C inkubiert, um eine korrekte Farbentwicklung zu ermöglichen.

2.7 Differentielles Screening

Die PCR-gestützte cDNA-Subtraktion reichert überwiegend differentiell exprimierte Sequenzen an. Trotzdem wird die subtrahierte Probe noch cDNAs enthalten, die in Tester und Driver gemeinsam vorkommen. Dieser Hintergrund ist nicht nur abhängig von der Reinheit der RNA und der Durchführung der cDNA-Subtraktion, sondern entsteht hauptsächlich, wenn nur ganz wenig mRNA differentiell exprimiert ist in Tester und Driver. Dieser Screeningschritt, durchgeführt mit dem PCR-Select

Differential Screening Kit, soll Falsch-Positive eliminieren, die beim Picken zufälliger Klone aus der subtraktiven Bibliothek für die Northern Blot-Analyse entstehen können.

Bei dieser Methode wird die subtraktive Bibliothek mit vorwärts- und rückwärts-subtrahierten cDNA-Sonden hybridisiert (Abb. 2.3). Die vorwärts-subtrahierte Sonde wird aus derselben subtrahierten cDNA hergestellt, die für die subtraktive Bibliothek verwendet wurde. Die rückwärts-subtrahierte Sonde entsteht aus der subtraktiven Hybridisierung mit der originalen Tester-cDNA als Driver und der Driver-cDNA als Tester. Klone, die differentiell exprimierte mRNAs repräsentieren, hybridisieren nur mit der vorwärts-subtrahierten Probe, während mit der rückwärts-subtrahierten Probe hybridisierende Klone den Hintergrund darstellen (Wang *et al.*, 1991; Lukyanov *et al.*, 1996).

2.7.1 Amplifikation der ersten PCR-Produkte

Die verdünnten Produkte der ersten Amplifikation der PCR-gestützten cDNA-Subtraktion aus Abschnitt 2.5.6 wurden hier amplifiziert. Wie in Abb. 2.3 ersichtlich ist, wird das zweite PCR-Produkt der Vorwärts-Subtraktion dazu benutzt, um die subtraktive Bibliothek herzustellen und um als vorwärts-subtrahierte cDNA-Sonde zu fungieren. Als subtrahierte Proben dienen die verdünnten PCR-Produkte der Vorwärts- und Rückwärts-Subtraktion. Um unsubtrahierte Sonden zu erhalten, wurden die Tester- und Driver-cDNA amplifiziert. Für die Tester-Sonde diente das erste PCR-Produkt der unsubtrahierten Tester-Kontrolle (Tube 1-c) der Vorwärts-Subtraktion als Ausgangsmaterial. Analog wurde die Driver-Sonde aus dem ersten PCR-Produkt der unsubtrahierten Tester-Kontrolle (Tube 2-c) der Rückwärts-Subtraktion hergestellt (Abb. 2.3).

Für die cDNA-Arrays wurden zwei Negativ-Hybridisierungskontrollen mitgeführt. Es handelt sich dabei um Plasmide, die ein von zwei cDNA-Inserts enthalten. Das cDNA 1R-Insert korrespondiert zu 320 bp eines Menschhomologen der Maus-mRNA für Testis-spezifisches Protein und das cDNA 2R-Insert zu 220 bp der menschlichen Semenogelin II-mRNA. Die beiden Negativ-Hybridisierungskontroll-cDNAs 1R und 2R enthalten die Sequenzen von *Nested* Primer 1 und 2R.

Für jede subtrahierte und unsubtrahierte cDNA-Sonde wurden zwei PCR-Reaktionen angesetzt, für die Negativ-Kontrollen nur eine. Jeder PCR-Ansatz enthielt: 1× PCR-Puffer (10×), 0,2 mM dNTP-Mix (10mM), jeweils 0,4 µM *Nested* Primer 1 und 2R (10 µM), 1× A2-Polymerase (50×) und DNA-Template. Die Reaktion wurde mit folgenden PCR-Bedingungen gestartet: 11 Zyklen mit 94°C für 10 sec, 68°C für 30 sec, 72°C für 1,5 min und ein abschließender Zyklus mit 72°C für 5 min. Von jeder Reaktion wurden 8 µl in einem 2 %-igen Agarosegel in 1× TAE aufgetrennt.

Vorwärts-Subtraktion

Rückwärts-Subtraktion

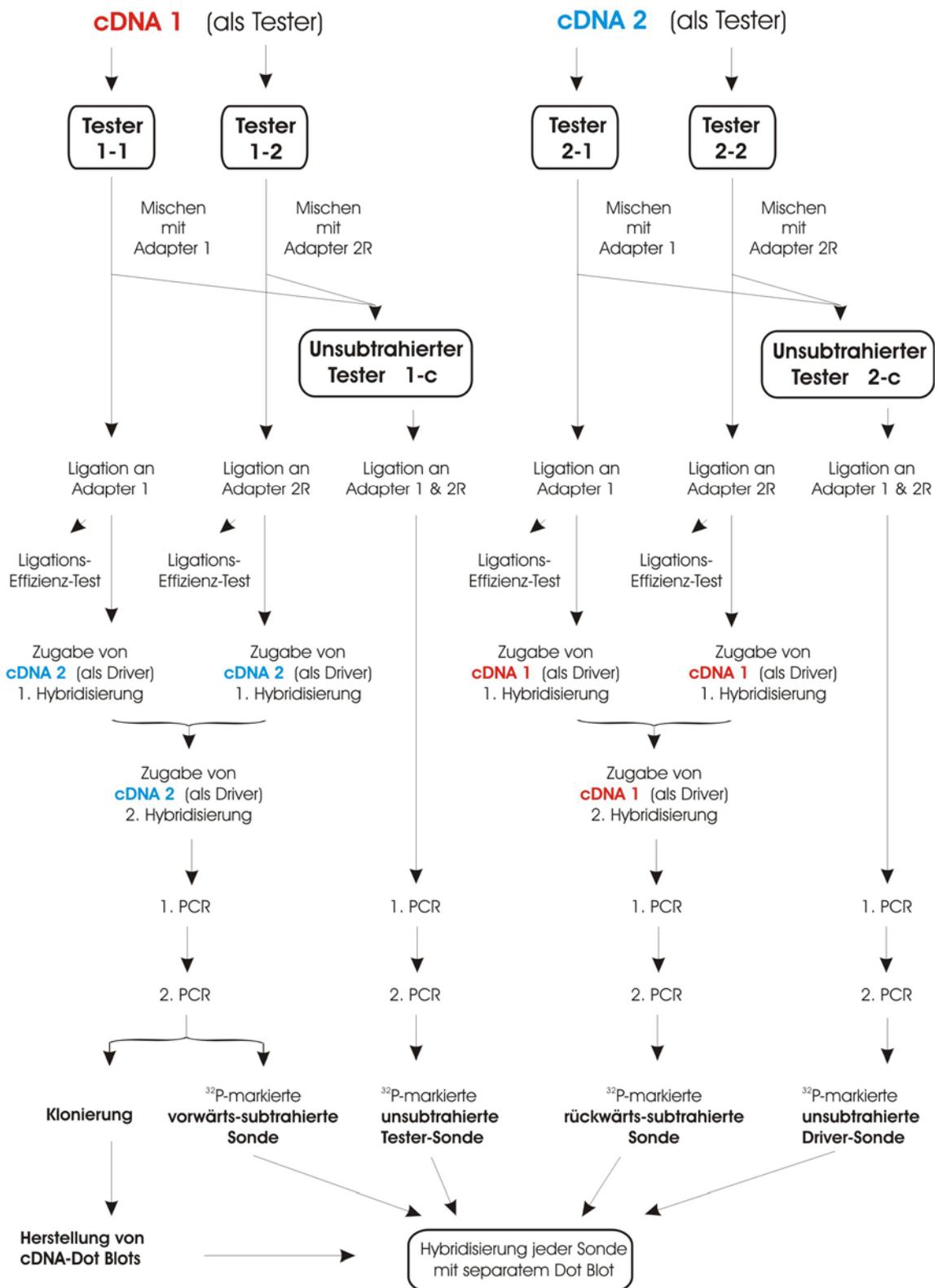


Abb. 2.3: Experimenteller Ansatz von PCR-gestützter cDNA-Subtraktion und differentiellem Screening. Die Grafik soll die Vorgehensweise bei der Herstellung der subtrahierten und unsubtrahierten Proben verdeutlichen. Obwohl das Screening allein mit den subtrahierten Proben schon sehr sensitiv ist, wird die Verwendung von subtrahierten und unsubtrahierten Proben empfohlen.

2.7.2 Reinigung von PCR-Produkten

Für die Aufreinigung der PCR-Produkte diente der NucleoSpin[®] Extraction Kit. Mit ihm werden DNA-Fragmente größer als 100 bp aus PCR-Produkten isoliert. Das Volumen wurde zunächst mit TE-Puffer (pH 7,0-7,5) auf 100 µl eingestellt. Nach Zugabe von 400 µl Puffer NT2 wurden die Proben in die NucleoSpin Extraktionssäulen gegeben und mit 13000 rpm zentrifugiert. Auf die Säulen wurden 700 µl Puffer NT3 gegeben und erneut mit 13000 rpm zentrifugiert. Der letzte Waschschrift wurde wiederholt und noch einmal zusätzlich 1 min zentrifugiert. Die DNA wurde aus den Säulen mit 50 µl Puffer NE durch Zentrifugation mit 13000 rpm für 1 min eluiert. Die Konzentration der gereinigten DNA wurde UV-spektrophotometrisch ermittelt.

2.7.3 Immobilisierung subtrahierter Klone in cDNA-Arrays

PCR-Amplifikation der cDNA-Inserts

Von den Agarplatten aus Abschnitt 2.6 wurden zufällig 96 weiße Kolonien gepickt und in 100 µl LB/Amp-Medium in einer 96-Loch-Platte bei 37°C als Schüttelkultur über Nacht wachsen gelassen. Für jeden Klon wurden 19 µl Master-Mix vorbereitet und mit 1 µl Bakterienkultur amplifiziert. Der Master-Mix enthielt für jede Reaktion in der Endkonzentration: 1× PCR-Puffer (10×), 0,2 mM dNTP-Mix (10mM), 0,4 µM *Nested* Primer 1 (10 µM), 0,4 µM *Nested* Primer 2R (10 µM) und 1× A2-Polymerase (50×). Der Thermocycler Perkin-Elmer GeneAmp 9600 wurde wie folgt programmiert: 1 Zyklus Prädenaturierung 94°C/ 30 sec, 23 Zyklen 95°C/ 10 sec, 68°C/ 3 min. Von jedem PCR-Produkt wurden 5 µl im Agarosegel (2 %/ 1× TAE) aufgetrennt.

Herstellung der cDNA-Dot Blots von PCR-Produkten

Vier identische Dot Blots wurden für die Hybridisierung mit den zwei subtrahierten und zwei unsubtrahierten cDNA-Sonden hergestellt. Für jede PCR-Reaktion mit amplifiziertem Insert wurden 5 µl Produkt und 5 µl einer 0,6 N NaOH-Lösung (frisch verdünnt aus 5 N NaOH) gemischt, um die DNA für die Hybridisierung zu denaturieren. Mit einer Mikropipette wurde 1 µl jeder cDNA als Dublette auf jede Membran aufgetragen. Die Blots wurden für 2-4 min in 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5) neutralisiert, in ddH₂O gewaschen und getrocknet. Durch den UV Stratalinker[™] 1800 (Stratagene) im *Auto-CrossLink*-Programm wurde die DNA mit der Membran quervernetzt.

2.7.4 *Random Primer*-Markierung der cDNA-Sonden

Die radioaktive Markierung der DNA-Sonden erfolgte mit Ready-To-Go™ DNA Labelling Beads (-dCTP). Der Reaktionsansatz des Kits liegt hierbei in RT-stabilen, getrockneten Perlen vor und enthält Puffer, dATP, dGTP, dTTP, FPLC*pure*™ Klenow-Fragment (7-12 U) und zufällige Oligodeoxyribonukleotide (hauptsächlich 9-er). Jeweils 3 µl der cDNA-Sonden (20-100 ng), beschrieben im Abschnitt 2.7.2, wurden mit 42 µl TE-Puffer bei 98°C für 5 min denaturiert. Ein DNA Labelling Bead wurde in den 45 µl DNA aufgelöst. Jedem Ansatz wurden 5 µl [α -³²P]dCTP (50 µCi, 3000 Ci/mmol) dazugegeben, gemischt und 15-30 min bei 37°C inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mit Hilfe von MicroSpin™ G-50-Säulen entfernt.

2.7.5 Hybridisierung mit der subtrahierten cDNA

Die ³²P-markierten Sonden wurden mit den auf Nylonmembranen fixierten subtrahierten Klonen hybridisiert. Die Inkubations- und Waschschrte erfolgten im Hybridisierungssofen in rotierenden Hybridisierungsbehältern. Für jede Membran wurde die Hybridisierungslösung hergestellt, indem 50 µl 20× SSC und 50 µl Blocklösung gemischt, 5 min bei 98°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und zu 5 ml ExpressHyb™ Hybridization Solution gegeben wurde. Die in 2× SSC voräquilierten Membranen wurden mit der Hybridisierungslösung bei 72°C für 60 min vorhybridisiert. Zu den radioaktiv markierten DNA-Sonden (siehe 2.7.4) wurden ebenfalls 50 µl 20× SSC und 50 µl Blocklösung dazugegeben und denaturiert. Dieser Ansatz wurde in die Hybridisierungsbehälter pipettiert und über Nacht bei 72°C hybridisiert. Am nächsten Tag erfolgte das Waschen der Membranen bei 68°C: 4 × 20 min mit Waschlösung 1 und 2 × 20 min mit Waschlösung 2. Zwischendurch erfolgte die Messung der Blots, um die Effizienz der Waschschrte zu beobachten und ein Abwaschen der Sonde zu vermeiden. Die Membranen wurden luftgetrocknet und in Plastikfolie eingeschweißt. Die Membranen wurden in einer Expositions-Kassette mit einem *Storage Phosphor Screen* über Nacht exponiert und im Storm 860-PhosphorImager (Molecular Dynamics) gescannt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software *ImageQuant*.

2.7.6 Interpretation der Ergebnisse des differentiellen Screenings

Die folgende Tab. 2.2 gibt einen Überblick über die Auswahlkriterien, die angewandt wurden, um geeignete Kandidaten für differentiell exprimierte Transkripte aus der Vielzahl von Klonen der subtraktiven Bibliotheken zu ermitteln. Die Abb. 2.4 soll die Auswertung der Dot Blots an einem Beispiel bildlich veranschaulichen.

Tab. 2.2: Interpretation der Hybridisierungsergebnisse der Dot Blots

Sonden-Typ				Interpretation
fw-sub	rv-sub	uns-T	uns-D	
+	-	+	-	Klone, die mit der vorwärts-subtrahierten und der unsubtrahierten Tester-Sonde hybridisieren, aber nicht mit der rückwärts- oder unsubtrahierten Driver-Sonde, sind fast immer (ca. 95 %) differentiell exprimierte Gene.
+	-	-	-	Klone, die nur mit der vorwärts-subtrahierten Sonde hybridisieren, sind starke Kandidaten für differentielle Expression. Sie werden als typischerweise weniger exprimierte Transkripte durch die Subtraktion angereichert.
+	-	+	+	Klone, die mit der vorwärts-subtrahierten und beiden unsubtrahierten Sonden hybridisieren, können nur schwer zugeordnet werden. Weiteren Aufschluss könnten nur Northern-Analysen geben.
++	+	+	+ / -	Klone, die mit beiden subtrahierten Sonden hybridisieren, aber mit unterschiedlicher Intensität, können vermutlich dann den differentiell exprimierten Genen zugeordnet werden, wenn die Signalintensität größer als 5-mal ist.
+	+	+	+	Klone, die nahezu gleich mit beiden subtrahierten und beiden unsubtrahierten Sonden hybridisieren, sind fast nie differentiell exprimiert.
-	-	-	-	Klone, die für keine der subtrahierten Sonden ein detektierbares Signal zeigen, präsentieren für gewöhnlich nicht-differentiell exprimierte cDNAs.

fw-sub, vorwärts-subtrahierte; rv-sub, rückwärts-subtrahierte; uns-T, nicht-subtrahierter Tester; uns-D, nicht-subtrahierter Driver

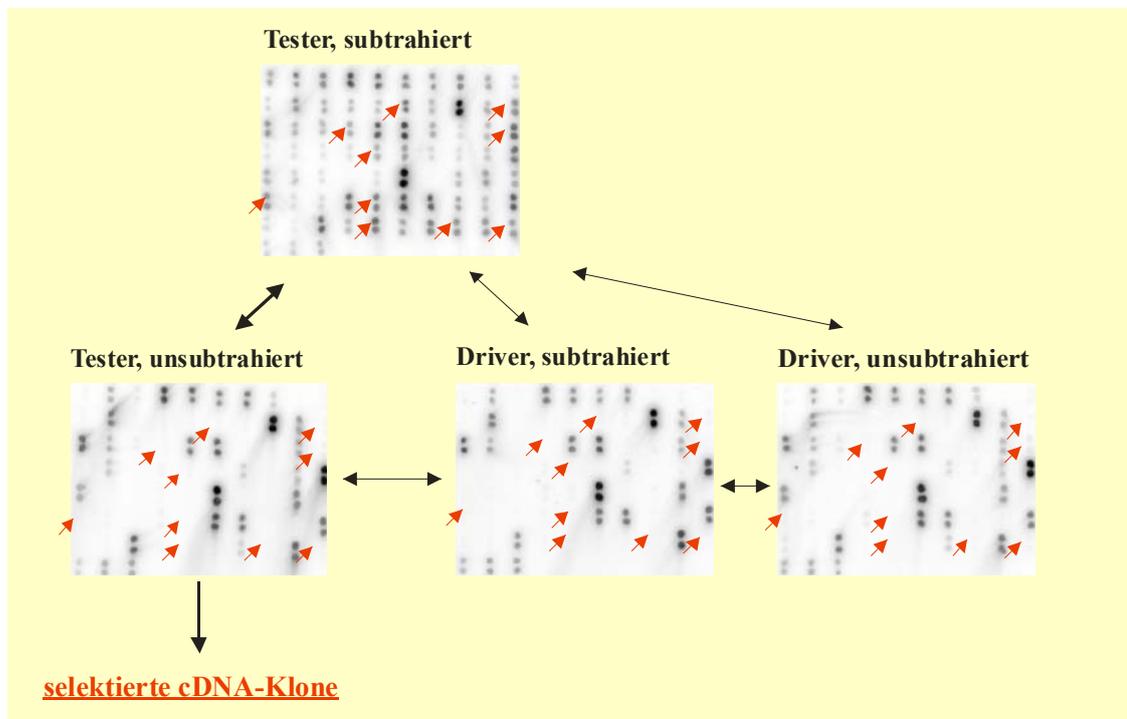


Abb. 2.4: Beispiel für die Auswertung der Dot Blots. Die Pfeile kennzeichnen differentiell exprimierte Kandidatenklone, die nur im subtrahierten Tester ein Hybridisierungssignal liefern.

2.8 Northern Blot-Analyse

Mittels Northern-Hybridisierung wurden die putativ differentiell exprimierten Kandidaten des differentiellen Screenings überprüft. Dazu wurden von jedem Entwicklungsstadium (4, 12, 26 Wochen) von SHR und WKY poly(A⁺)-RNA elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonmembranen transferiert. Die immobilisierten RNAs wurden dann mit den radioaktiv markierten Kandidaten-cDNAs als Sonden hybridisiert.

2.8.1 Denaturierende Formaldehyd-Agarosegel-Elektrophorese

Zur Vermeidung von Sekundärstrukturen durch intramolekulare Basenpaarung wurde die RNA unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt, was durch Zugabe von Formaldehyd zum Lauf- und Ladepuffer erreicht wurde. Für die Herstellung eines Gels mit einem Volumen von 100 ml wurden 1,0 g Agarose in 85 ml DEPC-H₂O und 10 ml 10× MOPS-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlung auf ca. 65°C wurden 5,4 ml 37 %-iges Formaldehyd (12,3 M) zugegeben und das Gel gegossen. Es wurde für 30 min in 1× MOPS-Puffer äquilibriert und für 10 min bei 6 V/cm laufen gelassen. Die RNA-Proben (2 µg poly(A⁺)-RNA) wurden im entsprechenden Volumen 5× RNA-Ladepuffer aufgenommen, mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 25 µl gebracht, 10 min bei 65°C denaturiert. Der Lauf erfolgte in 1× MOPS-Puffer bei 20 V über Nacht in einer Elektrophoresekammer mit Pufferumwälzung. Das Gel wurde in EtBr-Lösung gefärbt und auf einem UV-Transilluminator dokumentiert.

2.8.2 Northern-Blotting

Um das Formaldehyd zu entfernen, wurde das Gel zweimal 20 min in ddH₂O gespült. Der eigentliche Transfer der RNA vom Gel auf eine Membran mit Nukleinsäurebindenden Eigenschaften (HybondTM-N⁺) erfolgte mittels Kapillarblotting. Dazu wurde ein in 20× SSC getränktes Filterpapier auf eine Glasplatte gelegt, sodass die überhängenden Ränder in eine mit 20× SSC gefüllte Fotoschale reichten. Darauf wurde das RNA-Gel gelegt und die nicht vom Gel bedeckte Fläche mit Parafilm abgedichtet. Auf das Gel wurde luftblasenfrei die in 2× SSC äquilibrierte Nylonmembran und darüber zwei ebenfalls angefeuchtete Filterpapiere gelegt. Dieses Blotting-Sandwich wurde mit einem Stapel saugfähigem Papier überschichtet und mit ca. 500 g Gewicht beschwert. Der Transfer der RNA erfolgte über Nacht. Im Anschluss wurde die Membran beschriftet, mit 2× SSC gespült, das Gel unter UV-Licht auf Rest-RNA überprüft und die RNA mit Hilfe eines UV StratalinkerTM 1800 (Stratagene), *Auto-CrossLink*-Programm, mit der Membran quervernetzt.

2.8.3 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung der DNA-Sonden erfolgte mittels der Ready-To-Go™ DNA Labelling Beads (-dCTP), wie bereits in Abschnitt 2.7.4 beschrieben wurde. Hierbei wurden jedoch 0,7 µl cDNA (Produkte der Insertamplifikation aus 2.7.3) in 44 µl TE-Puffer gelöst und als Sonde eingesetzt.

2.8.4 Northern-Hybridisierung

Die Hybridisierung wurde generell bereits in Abschnitt 2.7.5 besprochen. Die Hybridisierungslösung wurde aus 8 ml ULTRAhyb™ (68°C) und 200 µl denaturierter Blocklösung hergestellt. Zu den in 2× SSC voräquilierten Membranen wurde die Hybridisierungslösung dazu gegeben und 30 min bei 42°C vorhybridisiert. Zu den markierten DNA-Sonden wurden ebenfalls 200 µl Blocklösung dazugegeben, denaturiert, in die Hybridisierungsbehälter pipettiert und über Nacht bei 42°C hybridisiert. Am nächsten Tag erfolgte das Waschen der Membranen bei 42°C mit den vorgewärmten Waschlösungen: 2 × 5 min mit Lösung 1 und 2 × 15 min mit Lösung 2.

2.9 Sequenzierung von DNA

Die cDNAs wurde mit dem Thermo Sequenase Dye Terminator Cycle Sequencing Premix Kit beidseitig ansequenziert. Dazu wurde die rekombinante DNA im Vorfeld entweder mittels Plasmidvektoren in Bakterien vermehrt und die Plasmid-DNA als Minipräparation isoliert (siehe 2.3.6) oder die DNA wurde aus dem Plasmid heraus direkt durch PCR amplifiziert (siehe 2.7.3) und die PCR-Produkte entweder direkt gereinigt (siehe 2.7.2) oder mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und die DNA-Fragmente aus dem Gel isoliert (siehe 2.3.3). Für die Sequenzierung wurden 0,5 - 2,0 µg ds Plasmid-DNA eingesetzt, die in 11 µl ddH₂O gelöst wurden. Für jede Reaktion wurden 8 µl *Sequencing reagent premix*, 1 µl Primer (10 µM) und 11 µl DNA-Template pipettiert. Im Robocycler Gradient 96 (Stratagene, Heidelberg) wurde folgendes Programm gestartet: 1 Zyklus Vordenaturierung 96°C/ 1 min, 27 Zyklen Denaturierung 96°C/ 30 s, *Annealing* 55°C/ 15 s und Elongation 60°C/ 4 min sowie 1 Zyklus 60°C/ 4 min. Die 20 µl der Reaktion wurden mit 7 µl 7,5 M NH₄Ac und 68 µl kaltem 100 % EtOH (-20°C) versetzt und für 10 min präzipitiert. Nach der Zentrifugation bei 12000 rpm/ 15 min/ 4°C wurde das Pellet mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen, luftgetrocknet und in 4 µl Formamid-Ladepuffer resuspendiert. Die DNA wurde für 5 min bei 70°C denaturiert, auf Eis gestellt und 2 µl der Proben im Sequenziergel des automatischen Sequenziersystems ABI 377 (ABI, Weiterstadt) aufgetrennt und die Sequenz mit dem lasergekoppelten optischen System detektiert.

2.10 EDV-gestützte Sequenzanalyse

Von den entsprechenden Kandidatengenomen wurden die Randsequenzen ermittelt. Die Sequenzaufbereitung sowie die Suche von überlappenden Sequenzen und die Erstellung von Kontigs wurden mit der *DNASIS*-Software (Hitachi, San Bruno, CA) durchgeführt. Ein Abgleich aller Sequenzen gegen die elektronischen online-Datenbanken (EMBL, Genbank, Swissprot) auf Homologien erfolgte mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (*Basic local alignment search tool*) beim National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

2.11 *Real-time* quantitative RT-PCR

2.11.1 Theoretischer Hintergrund

Für die Quantifizierung von Genen wurde eine kinetische Variante der PCR genutzt, bei der die Akkumulation der PCR-Produkte während der zyklisch ablaufenden Amplifikation (*real-time*) störungsfrei über Fluoreszenzmessungen verfolgt wird (Higuchi *et al.*, 1993; Heid *et al.*, 1996). Die Fluoreszenzintensität des verwendeten Doppelstrang-DNA-spezifischen Fluorophors SYBR-Green I nimmt dabei proportional zur ds DNA im Reaktionsansatz zu. Die Interkalation dieses Fluorophors in den DNA-Doppelstrang erfolgt unspezifisch, es fehlt somit die Spezifität hinsichtlich der zu untersuchenden DNA-Probe, da auch Nebenprodukte und Primerdimere einen Fluoreszenzanstieg bewirken. Die Quantifizierung unbekannter Proben erfolgt normalerweise mit externen Standardproben, deren Konzentration bekannt ist und die unter möglichst identischen Bedingungen amplifiziert werden sollten. Mit dem Reaktionsende ist die Quantifizierung abgeschlossen, wodurch eventuelle Kontaminationen vermieden werden. Solange die Reaktion ungehindert abläuft, ist die Zeitdauer bis zum Erreichen eines Produktschwellenwertes (*threshold*) linear abhängig vom Logarithmus der initialen Konzentration der Zielsequenz. Der Zeitpunkt, zu dem der Signalverlauf einer Probe den gegebenen Schwellenwert überschreitet, wird als C_T -Wert (*cycle threshold*) bezeichnet (siehe Abb. 3.12, Seite 54). Über eine Schmelzkurvenanalyse können die Amplifikationsprodukte anhand ihrer Schmelztemperatur charakterisiert und Nebenprodukte alternativ zur Gelelektrophorese durch abweichende Schmelztemperaturen identifiziert werden (Abb. 2.5). Möglicherweise auftretende Primerdimere weisen meist einen niedrigeren Schmelzpunkt als das spezifische Produkt auf.

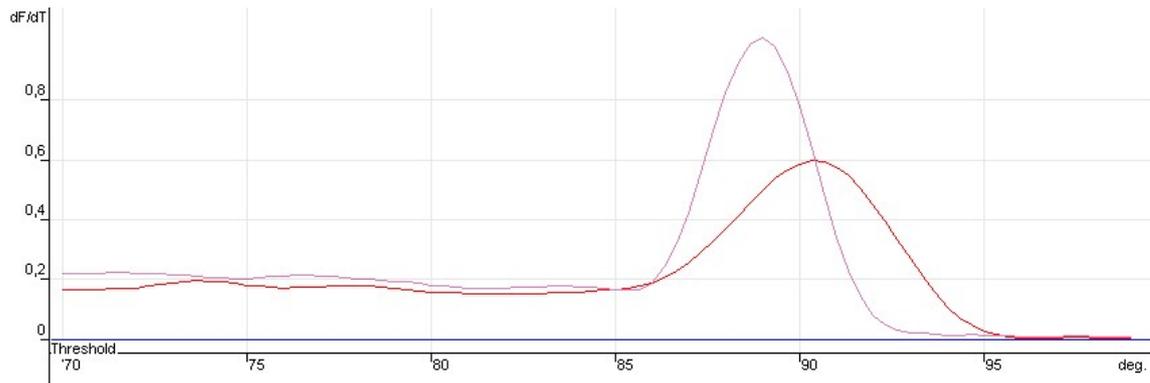


Abb. 2.5: Grafische Darstellung einer Schmelzkurvenanalyse zweier unterschiedlicher PCR-Produkte. Die Fluoreszenzintensität bricht beim Schmelzen des Produktes ein und resultiert in der negativen Ableitung als peak, dessen Lage die Schmelztemperatur des PCR-Produkts bezeichnet. Nebenprodukte können über abweichende Schmelztemperaturen identifiziert werden.

2.11.2 Reverse Transkription

Die cDNA-Synthese wurde mittels Omniscript™ Reverse Transcriptase (RT) durchgeführt. Ein 20 µl-Ansatz bestehend aus 1× Puffer RT, dNTP-Mix aus je 0,5 mM dNTPs, 1 µM oligo(dT)-Primer, 10 U RNasin (Promega), 4 U Omniscript™ RT, 2 µg poly(A⁺)-RNA und nukleasefreiem ddH₂O wurde für 60 min bei 37°C inkubiert und das Enzym durch 93°C für 5 min inaktiviert.

2.11.3 Real-time PCR

Die PCRs wurden im *Light-Cycler* Rotor Gene 2000 (Corbett Research) durchgeführt und wie folgt angesetzt: 0,2× SYBR Green I (Biozym, Oldendorf), 1× PCR-Puffer (10×), 0,2 mM dNTP-Mix (10mM), 0,4 µM Primer 1 (10 µM), 0,4 µM Primer 2 (10 µM) und 1× A2-Polymerase (50×). Zu 24 µl Master-Mix wurden 1 µl DNA-Template hinzu gegeben. Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: Denaturierung bei 95°C/ 5 min, 30-35 Zyklen: Denaturierung 95°C/ 20 s, *Annealing* 60-65°C/ 20 s, *Extension* (Verlängerung) 72°C/ 30 s und Fluoreszenzmessung bei 82°C/ 15 s. Im Anschluss an die PCR wurden die Schmelzkurven der PCR-Produkt im Temperaturbereich von 70°C bis 99°C in 1°C-Schritten ermittelt.

2.11.4 Datenanalyse mittels *comparative quantitation*

Die Daten wurden mit Hilfe der Rotor Gene Analysesoftware, Version 4.6, ausgewertet. Die Quantifizierung der Proben erfolgte nach der so genannten *comparative quantitation* Methode (Herrmann [Corbett Research], 2002, unveröffentlicht), die

benutzt wird, um unterschiedliche Proben (z. B. verschiedene Entwicklungsstadien) mit einer Kontrolle zu vergleichen. Es handelt sich um eine *real-time* PCR-Analysetechnik, mit der eine Einschätzung der relativen Expression von Genen ohne Standardkurven möglich ist. Es wird die Amplifikationseffizienz jeder Probe und deren Durchschnitt mit einem Fehlerkoeffizienten berechnet. Eine 100 %-ige Reaktionseffizienz würde in einem Amplifikationswert von 2 für jede Probe resultieren, was eine Verdopplung eines Amplikons in jedem Zyklus bedeutete. Die durchschnittliche Amplifikationseffizienz wird verwendet, um anhand des *take off*-Punktes jeder Probe die relative Konzentration der Proben im Vergleich zur Kontrolle zu bestimmen. Der *take off* gibt im Zyklus den Eintrittszeitpunkt der Proben in die exponentielle Phase an und für seine Berechnung wird die 2. Ableitung der Rohdaten herangezogen. Zu dem Zeitpunkt, an dem die Amplifikationsreaktion mit dem höchsten Anstieg abläuft, ergibt sich ein *peak*, der sich bei der exponentiellen Reaktion kurz hinter dem *take off*-Punkt befindet (Abb. 2.6).

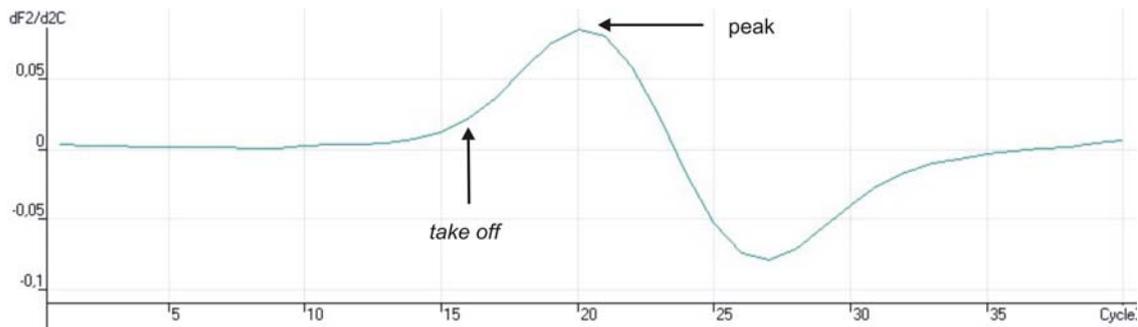


Abb. 2.6: Dieses Diagramm zeigt die 2. Ableitung der Quantifizierungsreaktion gegen die Zyklusanzahl aufgetragen. Der take off liegt bei 16,3 Zyklen.

2.12 Statistik

Für die statistische Auswertung der Daten der quantitativen Expressionsanalysen wurde der zweiseitige Zweistichproben-t-Test unter der Annahme ungleicher Varianzen verwendet. Das Signifikanzniveau α wurde auf 0,05 festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Evaluierung der Methode

Die Methoden der poly(A⁺)-RNA-Isolation, der cDNA-Subtraktion und des differentiellen Screenings wurden vor der Anwendung am Rattenherzen am Mausmodell evaluiert und die Reproduzierbarkeit des Systems überprüft. Für die Gewinnung der poly(A⁺)-RNA zur Herstellung der cDNA-Pools wurden unterschiedliche Verfahren der Isolierung getestet: zum einen die Isolierung von Gesamt-RNA mit nachfolgender Aufreinigung der poly(A⁺)-RNA und zum anderen die direkte Isolierung der poly(A⁺)-RNA aus Gewebe. Als Ausgangsgewebe dienten Gesamtembryonen und Herzen von NMRI-Mäusen. Die direkte Isolierung der poly(A⁺)-RNA aus frischem Gewebe mit dem PolyATtract System 1000 erwies sich als die optimale Methode und lieferte die qualitativ hochwertigste poly(A⁺)-RNA für die cDNA-Synthese. In der Ligationsanalyse für die cDNA-Adapterprimer wurde für das Kontrollgen GAPDH die höchste Ligationseffizienz (ca. 45 %) erreicht. Zudem gewährleistete das genannte System reproduzierbar die Isolierung großer Mengen an poly(A⁺)-RNA auch von stark bindegewebshaltigem Herzmuskelgewebe (16 µg/100 mg Gesamtembryonen 10 Tage p.c.; 13 µg/100 mg Embryonenherz 15 Tage p.c.; 4 µg/100 mg Herz adulter Mäuse).

In der Anfangsphase wurde die Methode der subtraktiven cDNA-Selektion auf der Grundlage des Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit erfolgreich etabliert. Es konnte reproduzierbar die Detektion der zu subtrahierenden ϕ X174/*HaeIII*-Kontroll-DNA aus dem Kit und eine 40-50 %-ige Ligationseffizienz für die an die cDNA-Fragmente zu ligierende Adapterprimer erreicht werden. Beide Kriterien waren Voraussetzungen für die Verwendbarkeit des genannten Kits (siehe Abb. 3.4).

Zur Überprüfung der Effizienz der subtraktiven cDNA-Selektion wurde eine Subtraktion von zwei cDNA-Pools durchgeführt, die das Transkriptspektrum kompletter Mausembryonen der Entwicklungsstufen Tag 10 p.c. und Tag 11 p.c. repräsentieren. Insgesamt wurden in der Subtraktion von Tag 10 nach Tag 11 nach der Subklonierung 58 cDNA-Klone (ca. 300 bp - 1200 bp) isoliert. Nach Abgleich auf die unsubtrahierten cDNA-Pools wies das differentielle Screening 23 cDNA-Klone als zugehörig zu potentiell in der Expression hochregulierten Genen aus (Abb. 3.1).

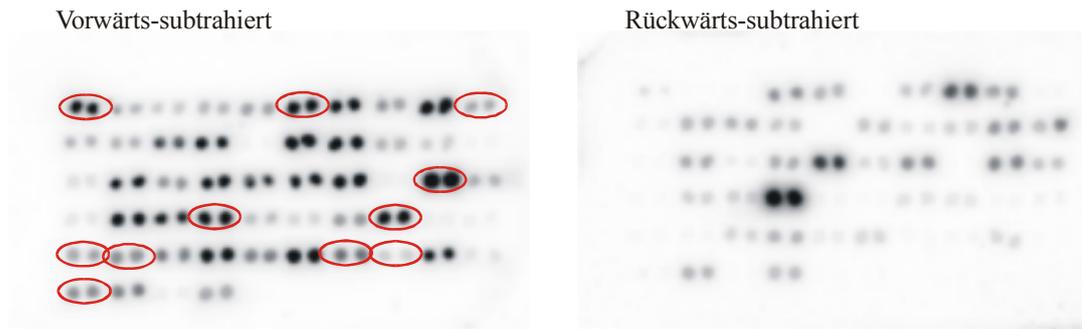


Abb. 3.1: Subtrahierte cDNA-Klone von Mausembryonen in der Entwicklung vom Tag 10 p.c. zum Tag 11 p.c. nach differentiellem Screening sind potentielle Kandidaten für differentielle Genexpression. Klone mit roten Kreisen waren für Sequenz- und Northern-Analysen vorgesehen.

Die Expressionsmuster von 8 ausgewählten cDNA-Klonen wurden in Northern-Analysen mit mRNA von Mausembryonen der Stadien 9, 10, 11 und 12 Tage p.c. überprüft (Abb. 3.2). Vier dieser Gene werden in der Entwicklung der Maus vom Tag 10 p.c. zum Tag 11 p.c. in der Expression deutlich hochreguliert (Klone 1, 46, 49) bzw. initiiert (Klon 10). Die restlichen 4 überprüften Gene werden in diesem Entwicklungszeitraum reprimiert (Klone 41, 50, 53) oder auf konstantem Niveau exprimiert (Klon 33).

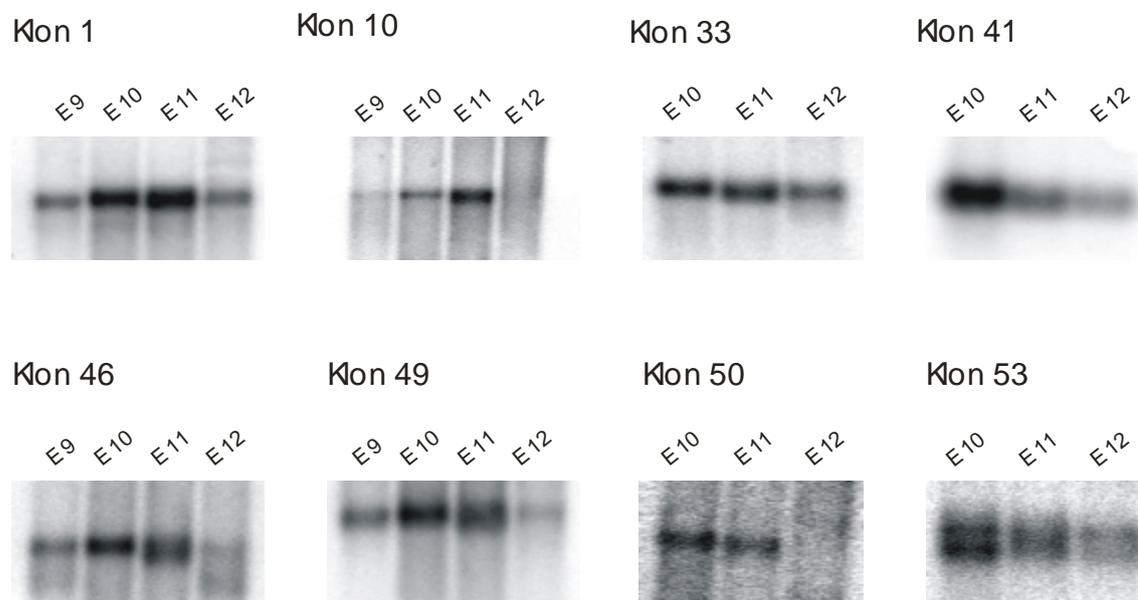


Abb. 3.2: Die Northern-Blots der cDNA-Subtraktion vom Tag 10 p.c. zum Tag 11 p.c. weisen bezüglich der Expression auf eine Induktion für die cDNA-Klone 1, 46, 49, eine Initiation für Klon 10, eine Repression für die Klone 41, 50, 53 sowie ein konstantes Niveau für cDNA-Klon 33 hin.

Im Ergebnis dieser Stichprobe entsprachen 50 % der durch die subtraktive cDNA-Selektion identifizierten Gene dem erwarteten Expressionsmuster. Daher besitzt die verwendete Methode der subtraktiven cDNA-Selektion eine genügend hohe Sensitivität, um differentiell exprimierte Gene in Geweben unterschiedlicher Entwicklungsstadien zu identifizieren. Nach der Evaluierung der Methode sollten differentiell exprimierte Gene im Herzen der SHR identifiziert werden, deren Induktion oder Repression zur Initiation bzw. stufenweisen Progression der Hypertrophie des Herzens beitragen.

3.2 Nachweis des hypertrophen Zustands der SHR

3.2.1 Ermittlung von Blutdruck und Herz-/ Körpergewicht-Quotienten der Ratten

Um nachzuweisen, dass die SHR eine Herzhypertrophie entwickelt, wurden Blutdruck sowie Herz- und Gesamtgewicht bestimmt, aus denen der Herz-Körpergewicht-Quotient (HW/BW) ermittelt wurde. Die Messung des Blutdrucks (Tab. 3.1) der 12 Wochen alten Tiere (je 3 Stück) bestätigte den normotensiven Status der WKY-Ratten (114 mmHg) und den hypertensiven Status der SHR (200 mmHg). Die Erhöhung des HW/BW um ca. 8 % bei der SHR-12 gegenüber der WKY-12 deutet eine bereits beginnende Hypertrophie des Herzens an (Tab. 3.1). Diese lag dann im Alter von 26 Wochen vollständig ausgebildet vor, wie aus der Zunahme des HW/BW um 57 % bei der SHR-26 im Vergleich zur WKY-26 ersichtlich wird.

Tab. 3.1: Systolischer Blutdruck (SBP), Herz- und Körpergewichte (HW bzw. BW) sowie die Herz-/ Körpergewicht-Quotienten (HW/BW) der verwendeten Versuchstiere; n. b., nicht bestimmt

Ratten [Alter in Wochen]	SBP [mm Hg]	BW [g]	HW [g]	HW/BW [$\times 10^{-3}$]
SHR-04	n. b.	68	0,42	6,18
WKY-04	n. b.	68	0,43	6,32
SHR-12	200 \pm 10	238 \pm 2	0,9 \pm 0,1	4,0 \pm 0,28
WKY-12	114 \pm 10	319 \pm 12	1,2 \pm 0,1	3,7 \pm 0,34
SHR-26	203 \pm 22	315 \pm 1	1,4 \pm 0,1	4,4 \pm 0,28
WKY-26	124 \pm 10	375 \pm 12	1,1 \pm 0,1	2,8 \pm 0,14

3.2.2 Phänotypische Beobachtungen bei den Rattenherz-Präparationen

Bei der Präparation der Herzen der SHR ließen sich einige phänotypische Beobachtungen machen, wie sie bei den WKY-Ratten nicht vorkamen. So waren die Lungen der 12 Wochen alten SHR im hypertensiven Stadium relativ hell und zeigten rote Flecken. Eine etablierte Herzhypertrophie lag bei den 26 Wochen alten SHR vor. Im Gegensatz zu den WKY-Ratten kollabierten ihre Herzen nach der Durchtrennung der Aorta nicht, ihre Konsistenz war fest und die Ventrikelwände dick.

3.3 Isolierung von poly(A⁺)-RNA

Wie bereits erwähnt, wurden die besten Ergebnisse durch die direkte Isolierung der poly(A⁺)-RNA aus frischem Gewebe erzielt. Die Qualität und Integrität der isolierten mRNA wurde durch Formaldehyd-Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Die mRNA erschien als Schmier in einem Größenbereich von ca. 8,0 kb bis ca. 0,5 kb, der sich besonders um 2,0 kb anhäufte (Abb. 3.3). Es waren auch ribosomale RNA-Banden zu sehen, was aber nicht mit einer schlechten Ausbeute gleichzusetzen ist. Die in Abb. 3.3 sichtbaren 18S und 28S rRNAs zeigten keinen Einfluss auf die Funktionalität der mRNA und konnten für alle Applikationen eingesetzt werden.

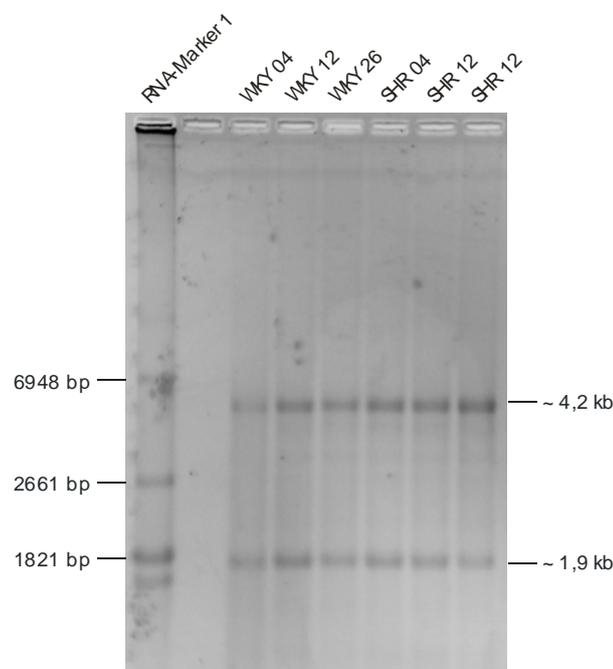


Abb. 3.3: RNA-Gel zur Überprüfung der Integrität der poly(A⁺)-RNA und zur Verwendung für Northern-Hybridisierungen. Ein mRNA-Schmier erstreckt sich von ca. 8,0-0,5 kb. Die Banden bei ca. 4,2 kb bzw. 1,9 kb entsprechen den ribosomalen Banden der 28S- bzw. 18S rRNA.

3.4 cDNA-Subtraktion

Um putative Kandidatengene identifizieren zu können, deren Induktion oder Repression für die Entwicklung der kardiale Hypertrophie verantwortlich gemacht werden können, wurde eine differentielle Genexpressionsanalyse durchgeführt. Mittels der eingangs beschriebenen subtraktiven Suppressions-Hybridisierung wurde nach differentiell exprimierten Genen im Krankheitsverlauf der Hypertrophie in Herzen der SHR gesucht. cDNA-Subtraktionen wurden von SHR-04 nach SHR-12 und von SHR-12 nach SHR-26 durchgeführt (Abb. 2.1). Durch drei zusätzliche cDNA-Subtraktionen zu den jeweils gleichaltrigen WKY, sollte gegen die regelrechte Genexpression der Entwicklung der Tiere abgeglichen werden.

3.4.1 cDNA-Synthese, *Rsa I*-Spaltung und Adapterligation

Aus jeweils 2 µg poly(A⁺)-RNA aus den Rattenherzen wurden ds cDNAs als Tester und Driver synthetisiert. Die cDNAs wurden mit dem Restriktionsenzym *Rsa I* in kürzere Fragmente gespalten. Um die Effizienz von cDNA-Synthese und -Spaltung einschätzen zu können, wurden die synthetisierten cDNAs gelelektrophoretisch überprüft. Dies ergab für die ungeschnittenen cDNAs vor der Restriktionsspaltung einen Schmier von etwa 0,5 kb bis 10 kb (keine Degradierung der RNA) und für die gespaltenen cDNAs dagegen nur noch einen Schmier von 0,1 kb bis 2,0 kb (Ergebnisse nicht gezeigt). An die glatten Enden der gespaltenen Tester-cDNA wurden im darauf folgenden Schritt die Adapter ligiert. Dazu wurde jede Tester-cDNA zweigeteilt und jeweils mit Adapter 1 bzw. Adapter 2R kombiniert. Für eine spätere nicht-subtrahierte Kontrolle bei der PCR-Amplifikation erfolgte an einen kleinen Teil jeder Tester-cDNA die Ligation mit beiden Adaptern. Über ein PCR-Experiment wurde die Ligationseffizienz ermittelt, um sicherzustellen, dass am Ende mindestens 25 % aller cDNAs Adapter an beiden Enden haben. Das Experiment ist so konzipiert, dass mittels gen- und adapter-spezifischer Primer Fragmente amplifiziert werden, die den Bereich zwischen cDNA (GAPDH 3'-Primer) und Adapter (PCR Primer 1) überspannen. Das PCR-Produkt hat eine Größe von ca. 1,2 kb (Abb. 3.4). Als Vergleichswert diente die Amplifikation mit zwei genspezifischen GAPDH-Primern, die eine Produktgröße von ca. 0,5 kb ergab. Wie in Abb. 3.4 zu sehen ist, beträgt die Intensität der Banden der PCR-Produkte unter Verwendung von einem genspezifischen Primer (GAPDH 3'-Primer) und PCR Primer 1 knapp die Hälfte der Bandenintensität der PCR-Produkte, die aus zwei genspezifischen Primern (GAPDH 3'/ GAPDH 5') resultieren. Mit einer geschätzten Ligationseffizienz von 40 % - 50 % kann von einer guten Effizienz bei der nachfolgenden cDNA-Subtraktion ausgegangen werden

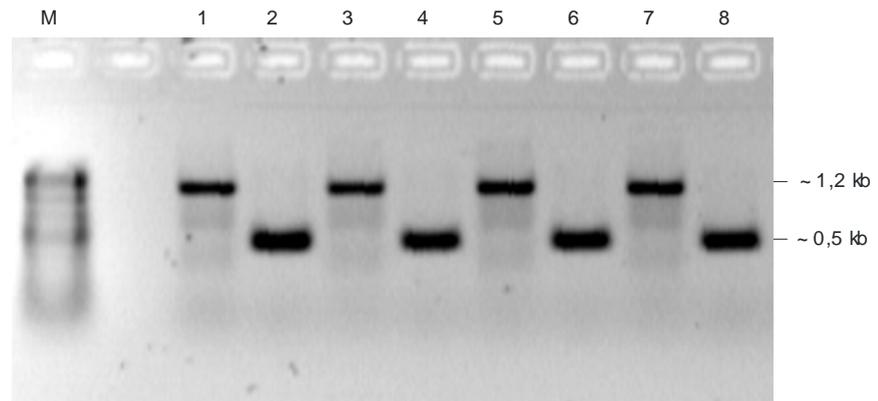


Abb. 3.4: Analyse der Ligationseffizienz der Tester-cDNAs SHR-04 und SHR-12. Jeder Tester wurde zur Hälfte mit Adapter 1 (Tester-1) und die andere Hälfte mit Adapter 2R ligiert (Tester-2). Jeder Tester wurde zum einen mit dem Primerpaar GAPDH 3'/ PCR Primer 1 (Bande bei ~1,2 kb) und zum anderen mit den Primern GAPDH 3'/ GAPDH 5' (Bande bei ~0,5 kb) amplifiziert. 1-2: SHR-04-1 (Adapter 1-ligiert); 3-4: SHR-04-2 (Adapter 2R-ligiert); 5-6: SHR-12-1 (Adapter 1-ligiert); 7-8: SHR-12-2 (Adapter 2R-ligiert); M: Marker M8

3.4.2 PCR-Amplifikation der subtraktiv hybridisierten cDNA

Bei diesem Schritt wurden die differentiell exprimierte cDNAs nach der subtraktiven Hybridisierung selektiv amplifiziert. Zuvor wurden noch die fehlenden Stränge der Adapterenden aufgefüllt, so dass die Bindungsstellen für PCR Primer 1 jetzt vorlagen (siehe Adapter- und Primer-Sequenzen auf Seite 11). Während der ersten Amplifikation kam es zur exponentiellen Vermehrung lediglich der ds cDNAs mit unterschiedlichen Adaptersequenzen an beiden Enden. Die zweite, *nested* PCR, diente dann der weiteren Anreicherung differentiell exprimierter cDNAs und der Verminderung des Hintergrundes. Abb. 3.5 zeigt exemplarisch das zu erwartende Ergebnis der zweiten Amplifikation der zwei cDNA-Subtraktionen von SHR-12 und SHR-26 sowie zwischen WKY-26 und SHR-26. Die deutliche Ausprägung der *Hae* III-gespaltene ϕ X174-Banden (Spur K) als mitgeführte ‚PCR-Kontrolle: subtrahierte cDNA‘ bedeutet, dass die PCR erfolgreich durchgeführt wurde. Der erkennbare Unterschied zwischen den subtrahierten Proben (Spuren 1, 3, 5, 7) und nicht-subtrahierten Proben (Spuren 2, 4, 6, 8) bestätigt das Gelingen der Subtraktionsexperimente. Die mehr oder weniger stark ausgeprägten distinkten Banden im Bereich von ca. 0,2 kb bis 1,3 kb stellen die bei der Subtraktion angereicherten cDNA-Fragmente dar und repräsentieren die potentiell differentiell exprimierte Sequenzen. Die unsubtrahierten Proben, deren Tester-cDNAs bereits vor der Hybridisierung beide Adaptersequenzen trugen, sind im Agarosegel an einem unspezifischen Schmier zu erkennen.

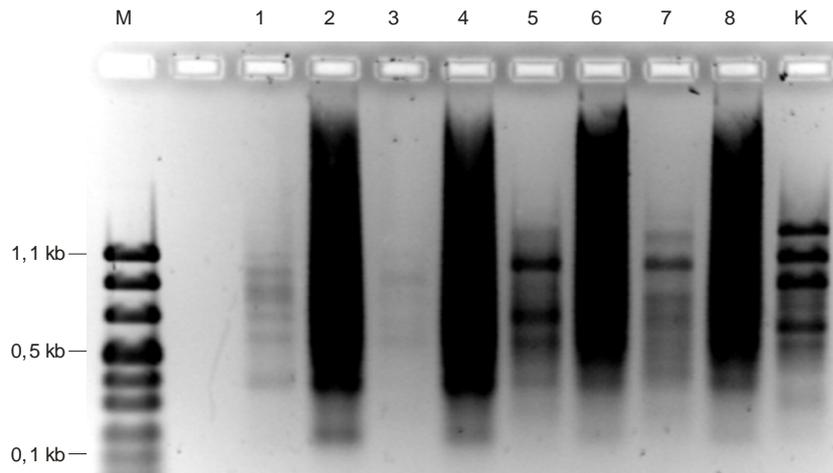


Abb. 3.5: Typisches Ergebnis der 2. Amplifikation eines Subtraktionsexperimentes. Dargestellt ist die cDNA-Subtraktion zwischen SHR-12 und SHR-26 (1-4) sowie zwischen WKY26 und SHR-26 (5-8). 1: SHR-26_fw-sub; 2: SHR-26_fw-unsub; 3: SHR-12_rv-sub; 4: SHR-12_rv-unsub; 5: SHR-26_fw-sub; 6: SHR-26_fw-unsub; 7: WKY-26_rv-sub; 8: WKY-26_rv-unsub; K: „PCR-Kontrolle: subtrahierte cDNA“; M: Marker M8

3.4.3 Klonierung der subtrahierten cDNA-Bibliotheken

Nach der cDNA-Subtraktion wurde das PCR-Produkt der zweiten Amplifikation der subtrahierten Proben in ein T/A-basiertes Klonierungssystem kloniert. Es wurden 96 zufällig gepickte weiße Kolonien in Kultur angezchtet. Der Einbau der cDNA-Inserts der einzelnen Klone wurde durch PCR direkt aus den Kulturen überprüft (Abb. 3.6).

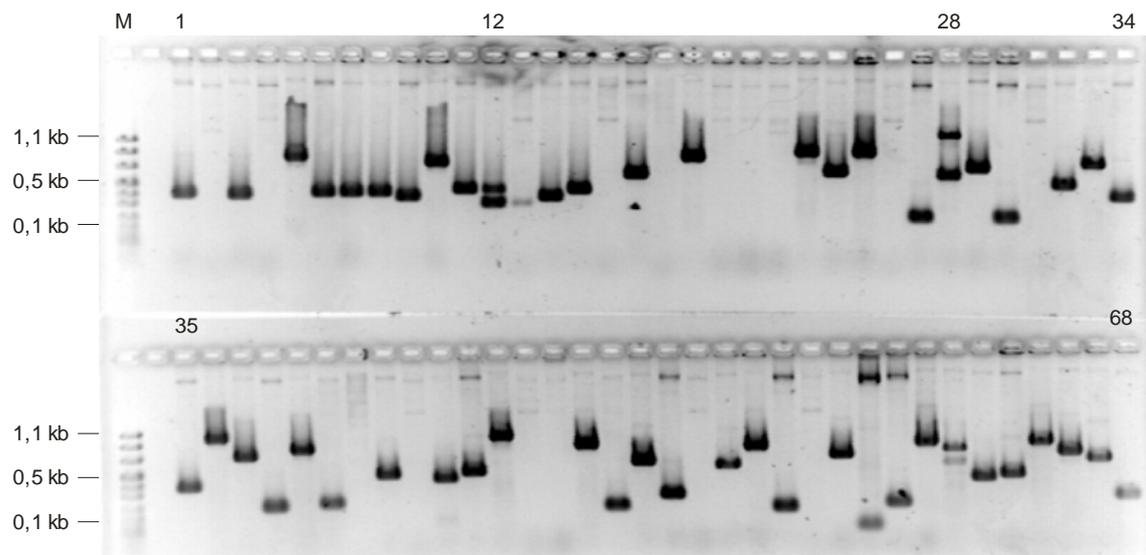


Abb. 3.6: Subtrahierte cDNA-Bibliothek für das Stadium SHR-26 (Auswahl der Klone 1-68). Dargestellt sind die PCR-Produkte der amplifizierten cDNA-Inserts von zufällig gepickten Klonen nach der Klonierung der cDNA-Subtraktion SHR-12 nach SHR-26. Diese cDNA-Fragmente mit einer Größe zwischen 200 bp und 1,2 kb wurden im weiteren Verlauf näher analysiert.

Jedes PCR-Produkt entspricht dem cDNA-Insert. Mit einer Transformationsrate von über 70 % konnte auf eine gute Klonierungseffizienz geschlossen werden. Die Abb. 3.6 zeigt einen Teil der gepickten Kolonien der Subtraktion SHR-12 nach SHR-26. Von den hier abgebildeten 68 cDNA-Klonen besitzen 53 Klone ein cDNA-Insert mit einer Fragmentlänge von ca. 0,2 kb bis 1,2 kb. Diese cDNA-Fragmente repräsentieren die subtrahierten cDNA-Bibliotheken. Im Verlauf der Untersuchungen wurden insgesamt fünf cDNA-Subtraktionen durchgeführt, zuzüglich der rückwärts-subtrahierten Kontrollexperimente für das darauf folgende differentielle Screening. Dabei entstanden unterschiedlich große subtrahierte cDNA-Bibliotheken, über deren Zusammensetzung Tab. 3.2 einen Überblick gibt. Es konnten für die hypertrophe Entwicklung von SHR-04 über SHR-12 nach SHR-26 insgesamt 145 mögliche Kandidaten ermittelt werden.

Tab. 3.2: Übersicht über die Anzahl der Klone der einzelnen cDNA-Bibliotheken, die aus der cDNA-Subtraktion resultierten und für weitere Analysen zur Verfügung standen.

cDNA-Subtraktion	Anzahl gepickter cDNA-Klone
SHR-04 \Leftrightarrow SHR-12	72
SHR-12 \Leftrightarrow SHR-26	73
	Σ : <u>145</u>
WKY-04 \Leftrightarrow SHR-04	81
WKY-12 \Leftrightarrow SHR-12	36
WKY-26 \Leftrightarrow SHR-26	83

3.5 Differentielles Screening

Mit der Methode der cDNA-Subtraktion konnten differentiell exprimierte cDNAs identifiziert und diese sehr stark angereichert werden. Trotzdem ist das Vorhandensein von identischen Sequenzen in den Tester- und Driver-Proben nicht auszuschließen. Neben der Qualität der mRNA-Isolation und der Durchführung der Subtraktion, betrifft das hauptsächlich differentiell exprimierte mRNAs, die nur in sehr geringer Anzahl in den Proben vorliegen. Um diesen falsch-positiven *background* zu eliminieren und dadurch die Effizienz der Northern-Analysen zu erhöhen, wurden die cDNA-Bibliotheken differentiell gescreent (siehe Abschnitt 2.7). Eine Zusammenfassung darüber gibt die Tab. 3.3. Von den 145 Kandidaten für die Ausbildung einer Herzhypertrophie von SHR-04 nach SHR-26 vor dem Screening konnten danach nur noch 56 bestätigt werden.

Tab. 3.3: Insgesamt 103 Klone wurden nach dem differentiellen Screening als differentiell exprimiert eingestuft. Ausgewählte Kandidaten wurden durch Northern-Analysen überprüft.

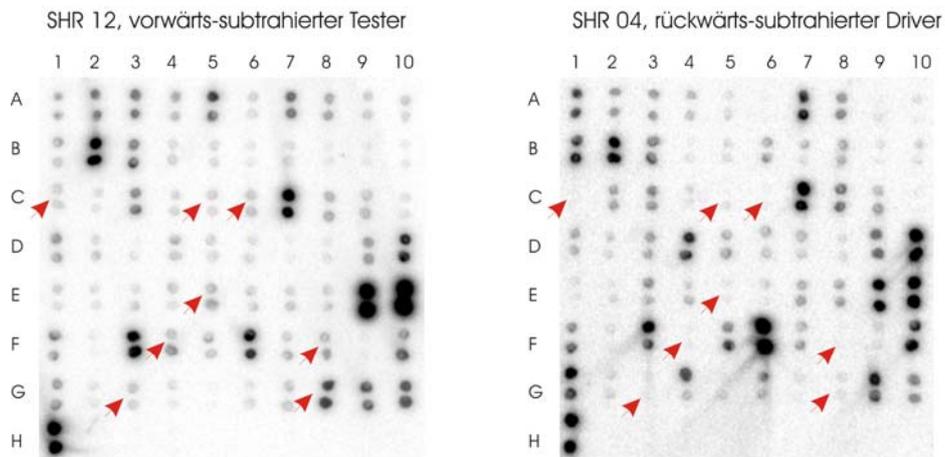
cDNA-Subtraktion	Anzahl differentiell exprimierter cDNA-Klone
SHR-04 \Leftrightarrow SHR-12	22
SHR-12 \Leftrightarrow SHR-26	34
	Σ : <u>56</u>
WKY-04 \Leftrightarrow SHR-04	11
WKY-12 \Leftrightarrow SHR-12	9
WKY-26 \Leftrightarrow SHR-26	27

Für jede cDNA-Subtraktion wurden alle potentiell differentiell exprimierten Klone (die vorwärts-subtrahierte cDNA-Bibliothek, siehe Tab. 3.2) per Hand als Dubletten auf vier identische Nylonmembranen gespottet. Diese vier identischen cDNA-Dot Blots wurden mit ^{32}P -markierten Sonden hybridisiert, die aus der vorwärts-subtrahierten cDNA, der rückwärts-subtrahierten cDNA, dem nicht-subtrahierten Tester und dem nicht-subtrahierten Driver hergestellt worden waren. Die Unterschiede in den Hybridisierungssignalen zwischen den Dot Blots wurden abgeschätzt. Mögliche Interpretationen bei der Auswertung der Hybridisierungssignale sind in der Tab. 2.2 zusammengestellt.

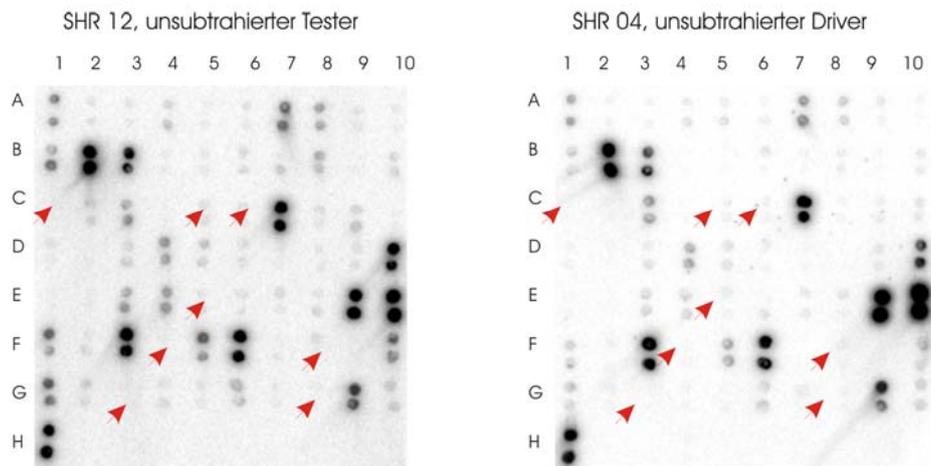
3.5.1 Subtraktion SHR-04 \rightarrow SHR-12

Die Abb. 3.7 zeigt die Dot Blots für die cDNA-Subtraktion von SHR-04 nach SHR-12. Bei diesem differentiellen Screening wurde zusätzlich ein fünfter, identischer Dot Blot verwendet, der mit der vorwärts-subtrahierten cDNA der Kontroll-Subtraktion WKY-12 nach SHR-12 hybridisiert wurde. Dieser Ansatz sollte Aussagen über mögliche Redundanzen der differentiellen Klone der beiden Subtraktionen ermöglichen. Potentiell differentiell exprimierte Klone wären im Vergleich der Dot Blots von vorwärts-subtrahiertem Tester (SHR-12) und rückwärts-subtrahiertem Driver (SHR-04) schlechte Kandidaten, wenn im Dot Blot vom vorwärts-subtrahiertem Tester (SHR-12) der Kontroll-Subtraktion Hybridisierungssignale zu sehen sind. Die Abb. 3.7 verdeutlicht, dass es sich bei den meisten Klonen nicht bzw. nicht eindeutig um differentiell exprimierte cDNAs handelt. Die potentiellen Kandidaten sind durch Pfeile an den Positionen C1 (Klon 26), C5 (Klon 32), C6 (Klon 33), E5 (Klon 62), F4 (Klon 75), F8 (Klon 80), G3 (Klon 85) und G8 (Klon 91) gekennzeichnet. Diese Klone wurden im Ergebnis des differentiellen Screenings mit den herkömmlichen vier Dot Blots gefunden und zeigen kein Hybridisierungssignal im fünften Dot Blot mit der Sonde der Kontroll-Subtraktion.

Screening mit subtrahierten cDNA-Sonden aus der Subtraktion SHR 04 - SHR 12



Screening mit unsubtrahierten cDNA-Sonden aus der Subtraktion SHR 04 - SHR 12



Screening mit subtrahierter cDNA-Sonde aus der Kontroll-Subtraktion WKY 12 - SHR12

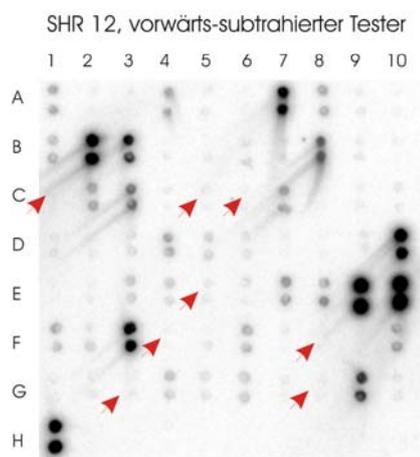


Abb. 3.7: Ergebnisse des differentiellen Screenings der cDNA-Subtraktion SHR-04 \Leftrightarrow SHR-12. Fünf identische Dot Blots mit der vorwärts-subtrahierten cDNA-Bibliothek wurden mit den kennzeichnenden Sonden hybridisiert. Der fünfte Blot, hybridisiert mit der cDNA-Bibliothek der Kontroll-Subtraktion, sollte Aussagen über redundante Klone ermöglichen. Die Pfeile kennzeichnen als differentiell exprimiert eingestufte Klone. Auf jeder Membran entsprechen die Positionen H2 und H3 den Negativ-Hybridisierungskontrollen der cDNAs 1R bzw. 2R.

3.5.2 Subtraktion SHR-12 → SHR-26

In folgender Abb. 3.8 sind die Dot Blots der cDNA-Subtraktion SHR-12 nach SHR-26 dargestellt. Die ausgewählten potentiellen Kandidaten für differentielle Genexpression wurden wieder durch Pfeile hervorgehoben: B6 (Klon 23), B10 (Klon 28), C4 (Klon 33), C10 (Klon 39), D5 (Klon 46), F1 (Klon 66), F5 (Klon 72), G5 (Klon 86), G8 (Klon 90) und G10 (Klon 92).

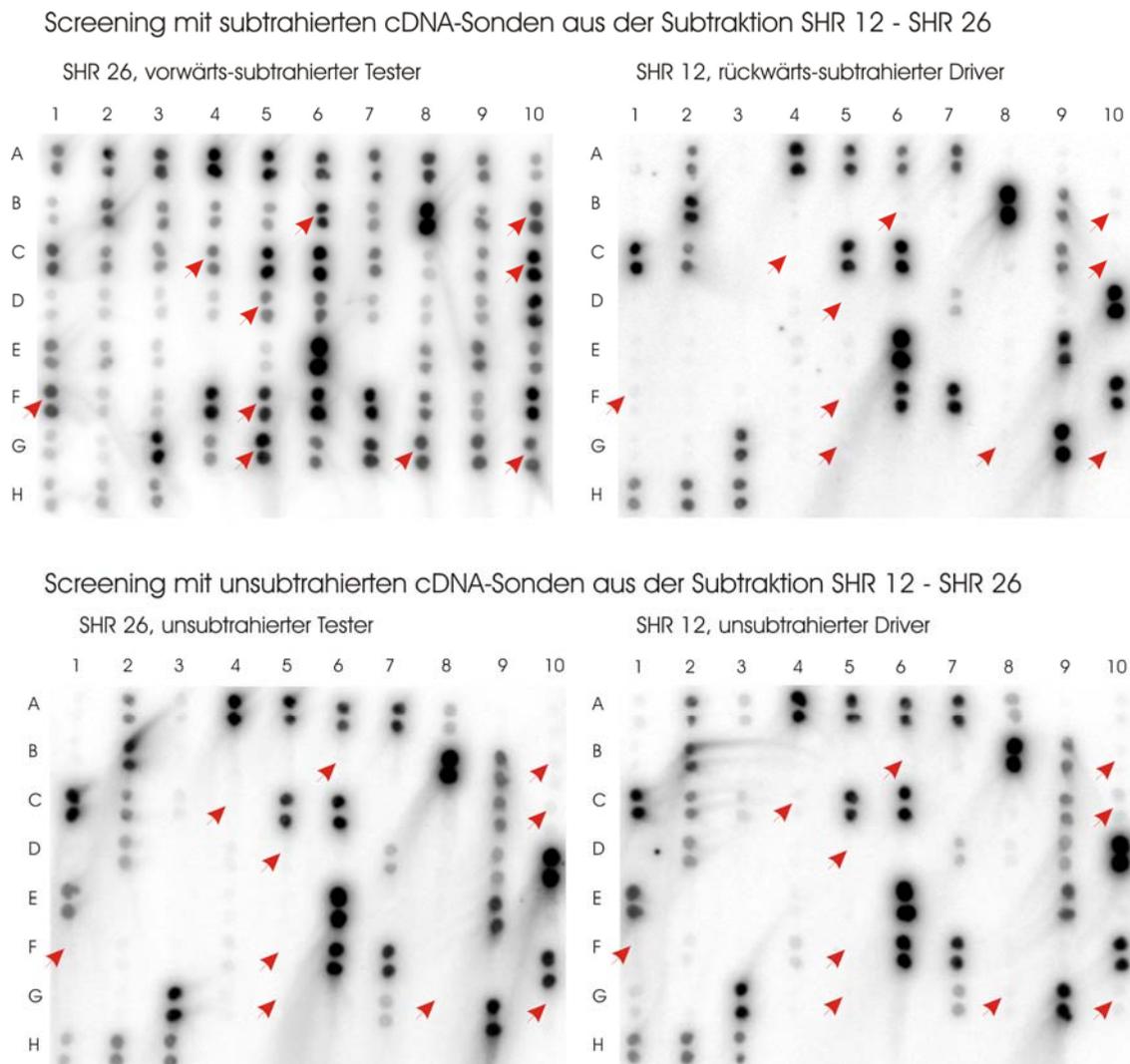


Abb. 3.8: Dot Blots der cDNA-Subtraktion SHR-12 nach SHR-26. Die auf die Membran aufgetragene SHR-26-subtrahierte cDNA-Bibliothek wurde mit den im Bild beschrifteten Sonden hybridisiert. Die durch einen Pfeil markierten cDNA-Klone sind ausgewählte differentiel exprimierte Sequenzen. Auf jeder Membran entsprechen die Positionen H4 und H5 den Negativ-Hybridisierungskontrollen der cDNAs 1R bzw. 2R.

3.6 Northern Blot-Analysen

Nachdem durch das differentielle Screening die Anzahl der möglichen Kandidaten eingegrenzt wurde, sollten die subtrahierten cDNA-Bibliotheken weiteren Untersuchungen unterzogen werden. Es wurden als nächstes die Expressionsmuster einzelner, ausgesuchter Klone durch Northern-Analysen bestimmt, um genauere Hinweise bezüglich ihrer differentiellen Expression zu bekommen. Anhand dieser Ergebnisse wurde eine weitere Selektion der Kandidaten vorgenommen. In Tab. 3.4 wird gezeigt, wie viele Northern-Hybridisierungen für welches Entwicklungsstadium durchgeführt wurden. Von den 56 putativ differentiell exprimierten Genen in der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie, wurden 42 Kandidaten einer Northern-Analyse unterzogen.

Tab. 3.4: Anzahl der durchgeführten Northern-Hybridisierungen

cDNA-Subtraktion	Anzahl durchgeführter Northern-Hybridisierungen
SHR-04 \Leftrightarrow SHR-12	8
SHR-12 \Leftrightarrow SHR-26	34

Auf den Northern Blots wurden zwar die jeweiligen RNA von SHR und WKY aufgetragen, aber für eine Aussage zur differentiellen Genexpression wurde nur der direkte Vergleich zwischen den subtrahierten Stadien (z. B. SHR-04 \rightarrow SHR-12) zugrunde gelegt. Ansonsten wäre eine Auswertung aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse oft nicht möglich gewesen und das Resultat wäre auf die Aussage „es liegt eine Regulation vor“ reduziert worden.

3.6.1 Subtraktion SHR-04 \rightarrow SHR-12

Von den acht untersuchten Klonen ergaben nur die vier in der Tab. 3.5 aufgeführten Klone verwertbare Hybridisierungssignale. Es ist zu sehen, dass Klone mit mehreren Transkripten unterschiedlicher Größe vertreten sind. In Abb. 3.9 sind Ausschnitte der Northern Blots gezeigt. In der Entwicklung von SHR-04 nach SHR-12 lassen sich bei den Klonen 16 und 75 eine Repression und bei den Klonen 32 und 33 eine Induktion erkennen.

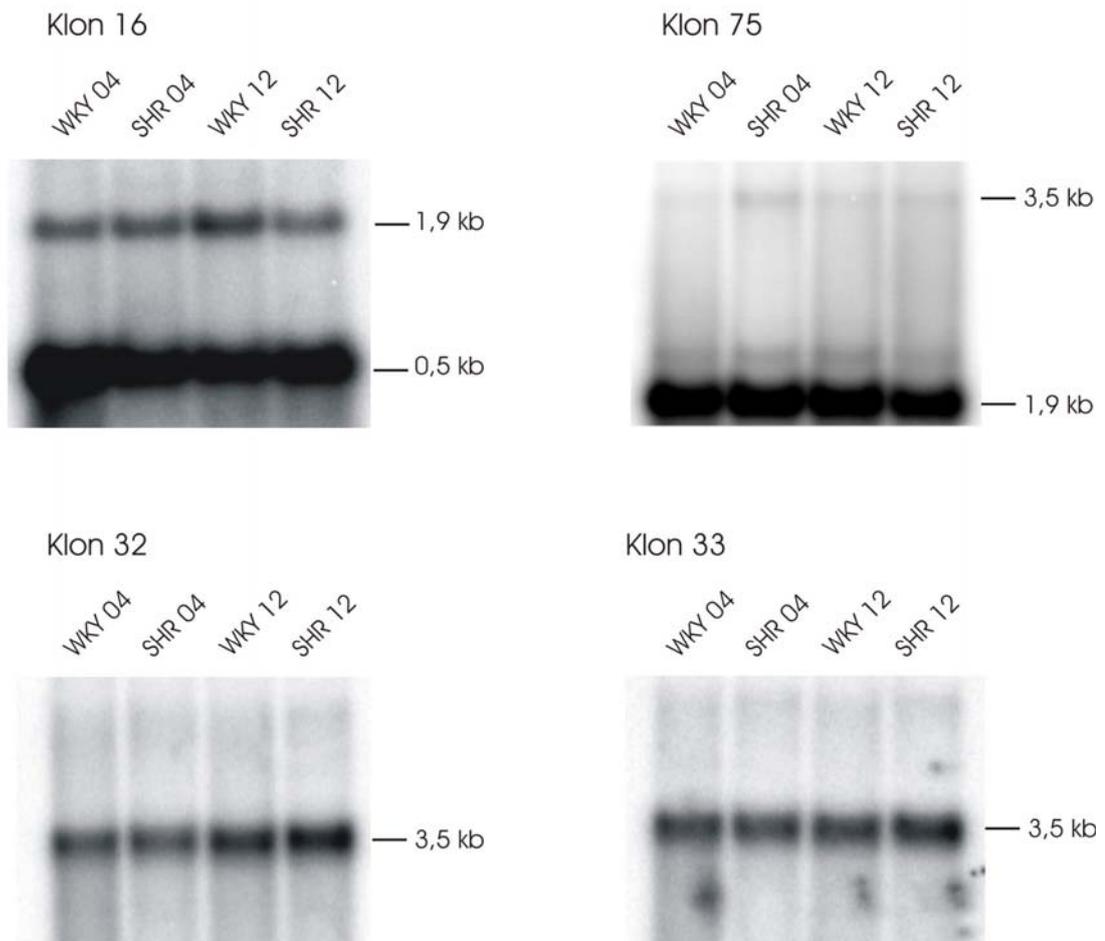


Abb. 3.9: Dargestellt sind vier Northern Blots, die Hinweise auf differentielle Transkripte gaben. Während die Klone 16 und 75 Beispiele für eine Genrepression von SHR-04 nach SHR-12 sind, liegt bei den Klonen 32 und 33 eine Geninduktion vor.

Der Klon 16 ergab im Northern Blot zwei Banden mit einer Größe von ca. 0,5 kb und 1,9 kb. Das erste Transkript bei 0,5 kb lässt keinen Unterschied innerhalb der SHR, aber eine deutliche Abnahme bei den Kontrolltieren von WKY-04 nach WKY-12 erkennen. Das zweite Transkript bei 1,9 kb deutet auf eine leichte Abnahme von SHR-04 nach SHR-12 hin. Dies wird durch eine Zunahme der Signalintensität bei den WKY-12-Kontrolltieren im Vergleich zu den WKY-04 bekräftigt. Bei den hypertensiven SHR-12 liegt also eine deutlich schwächere Expression als bei den normotensiven WKY-12 vor. Beim Klon 75 sind zwei Transkripte bei ca. 1,9 kb und 3,5 kb zu sehen, deren Signale von SHR-04 nach SHR-12 reduziert sind. Das größere Transkript scheint hierbei SHR-spezifisch zu sein. Die Klone 32 und 33 zeigen im Northern Blot Banden bei ca. 3,5 kb, wobei sich die stärkste Signalintensität bei SHR-12 findet. Der Klon 32 weist auch eine leichte Zunahme der Bandenstärke bei WKY-12 im Vergleich zu WKY-04 auf.

Tab. 3.5: Überblick über cDNAs, die in Northern-Analysen unterschiedliche Hybridisierungssignale bei der cDNA-Subtraktion von SHR-04 nach SHR-12 lieferten.

cDNA-Klon		Northern-Signale	
Bezeichnung	Fragmentgröße	Transkriptgröße	Induziert / Reprimiert
16	0,6 kb	1,9 kb	—
		0,5 kb	=
32	0,7 kb	3,5 kb	+
33	0,7 kb	3,5 kb	+
75	0,4 kb	1,9 kb	=
		3,5 kb	—

„+“, induziert; „—“, reprimiert; „=“, kein Unterschied

3.6.2 Subtraktion SHR-12 → SHR-26

Es wurden 34 cDNA-Klone untersucht. Von diesen konnten für die 17 Kandidaten aus Tab. 3.6 von einer differentiellen Genexpression ausgegangen werden, wobei 16 als hoch- und einer als herunterreguliert eingestuft wurden. Weitere Details dieser Northern-Hybridisierungen lassen sich aus der Tab. 3.6 und der Abb. 3.10 entnehmen.

Tab. 3.6: Ergebnisse der Northern-Hybridisierungen von cDNA-Klonen, die als potentielle Kandidaten im weiteren Verlauf ansequenziert wurden.

cDNA-Klon		Northern-Signale	
Bezeichnung	Fragmentgröße	Transkriptgröße	Induziert / Reprimiert
1	0,4 kb	3,8 kb	+
5	0,8 kb	0,4 kb; 1,0 kb	—
12	0,3 kb; 0,4 kb	1,0 kb	++
15	0,4 kb	2,7 kb; 10 kb	++
28	0,6 kb; 1,2 kb	3,5 kb	+
33	0,7 kb	5,8 kb	+
36	1,0 kb	4,0 kb	+
39	0,8 kb	1,0 kb	++
46	0,9 kb	1,5 kb	+
58	0,7 kb	0,9 kb; 4,7 kb	++
65	0,9 kb	1,8 kb	+
66	0,7 kb	2,5 kb; 4,7 kb	++
69	0,8 kb	1,0 kb; 2,7 kb	++
77	0,6 kb	3,0 kb	++
86	0,95 kb	2,5 kb	++
90	0,9 kb	1,9 kb	+
92	0,45 kb	1,9 kb; 2,7 kb, 4,5 kb	++

„+“, induziert; „++“, stark induziert; „—“, reprimiert

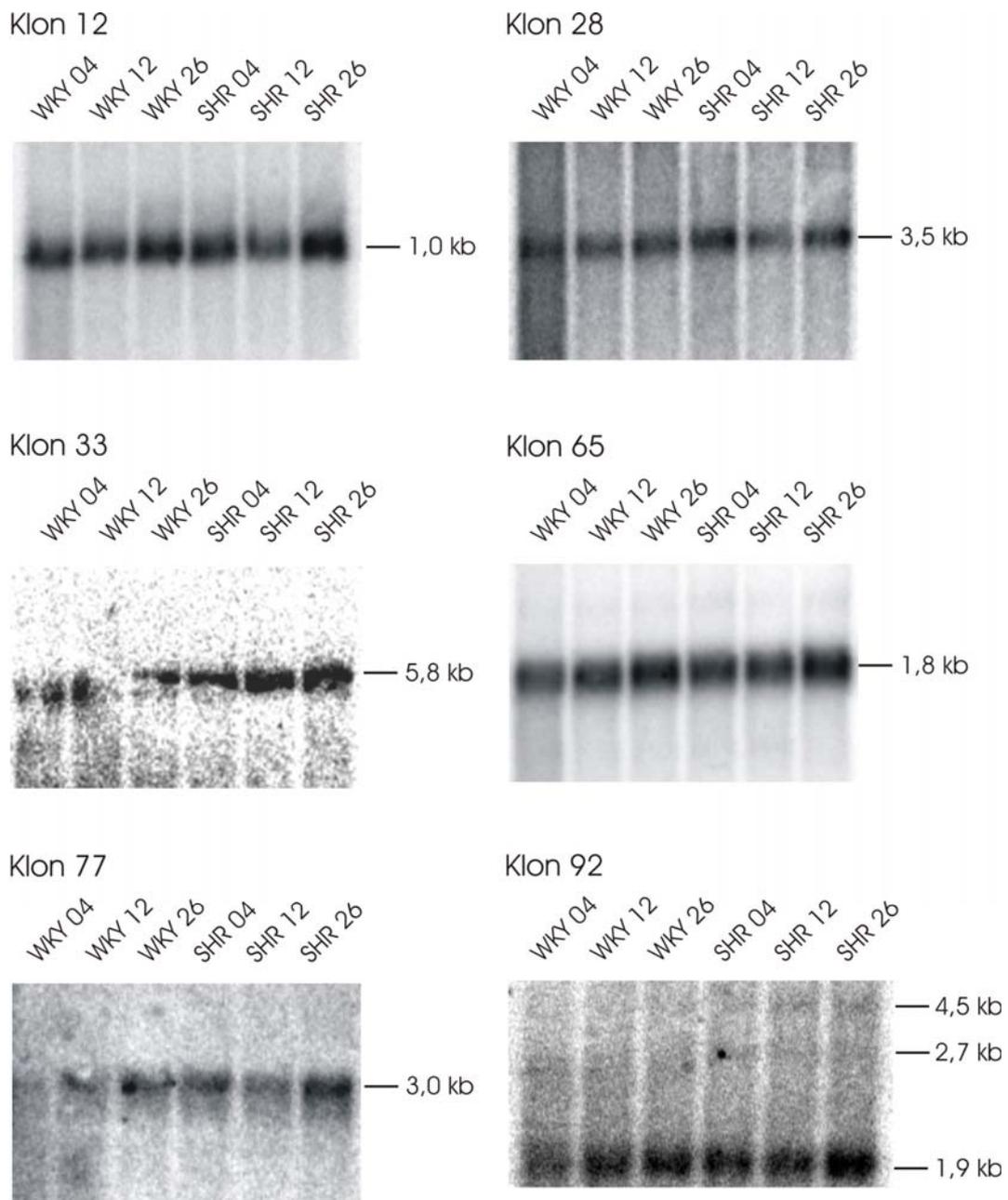


Abb. 3.10: Northern-Hybridisierungen ausgewählter Klone für das Stadium SHR-26, die später für die real-time Quantifizierung verwendet wurden.

Im Northern Blot ergaben die Klone 12, 28, 33, 65, 77 und 92 die in der Abb. 3.10 dargestellten Hybridisierungssignale. Die Blots zeigen eine gemeinsame Eigenschaft der Bandenmuster dieser Hybridisierungen. Alle sechs Northern Blots lassen eine Zunahme der Signalintensität bei WKY-26 und SHR-26 erkennen, wobei aber die Induktion bei SHR-26 stärker ausgeprägt zu sein scheint.

3.6.3 Kontrollhybridisierungen

Um sicherzugehen, dass jede Spur mit der gleichen Menge an poly(A⁺)-RNA beladen wurde, erfolgte eine Kontrollhybridisierung mit dem üblichen Standard β -Actin. Es wurde β -Actin des Menschen aus einem IMAGE-Klon (Nr.: 2518720) des RZPD, Berlin, isoliert. Die Blots wurden „gestrippt“ und mit radioaktiv markierter β -Actin-DNA rehybridisiert. In Abb. 3.11 wird exemplarisch für den Klon 28 der Blot mit der für den Herzmuskel typischen Doppelbande für β -Actin (Banden bei ca. 1,4 kb und 2,4 kb) gezeigt. Die Kontrollhybridisierung mit β -Actin zeigt, dass nahezu gleichen Mengen an mRNA aufgetragen worden sind.

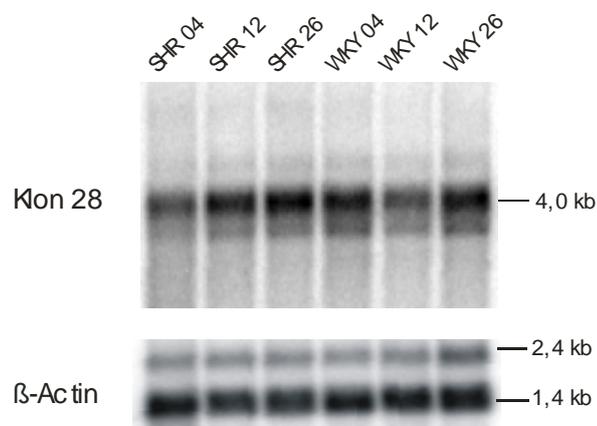


Abb. 3.11: Kontrollhybridisierung der Northern Blots mit β -Actin. Exemplarisch ist sie für den Klon 28 der cDNA-Subtraktion von SHR-12 nach SHR-26 gezeigt.

3.7 Sequenzanalysen

Die cDNA-Klone mit einer Länge von 200 bp - 1200 bp, bei denen es sich um putative Kandidaten für eine differentielle Genexpression handelte, wurden von beiden Seiten ansequenziert und die Sequenzen zwischen den einzelnen Klonen abgeglichen, um Übereinstimmungen untereinander aufzudecken (interne Alignments). Im Anschluss daran wurden umfangreiche *in silico*-Analysen durchgeführt, um Homologien zu Ratte, Maus und Menschen zu ermitteln, wobei die Sequenzen mittels BLAST gegen elektronische Datenbanken abgeglichen wurden. Die gefundenen Homologien wurden in Tab. 3.7 und Tab. 3.8 aufgelistet. Größtenteils ließ sich auf diesem Wege auch die chromosomale Lokalisation ermitteln. Weiterhin wurden zur Identifizierung zusätzlicher humaner Homologien verschiedene EST-Datenbanken durchsucht, wodurch eine Reihe humaner cDNA-Klone gefunden wurden, die in weitergehenden Untersuchungen die Grundlage für die Isolierung der homologen Gene des Menschen bilden sollten.

3.7.1 Subtraktion SHR-04 → SHR-12

Differentiell exprimierte cDNA-Klone in der Hypertrophieentwicklung des Herzens von SHR-04 nach SHR-12 Wochen sind in Tab. 3.7 aufgeführt. Bei den Klonen 32 und 33 stellte es sich durch den internen Sequenzabgleich heraus, dass es sich bei ihnen um dieselbe cDNA handelt. Da anfänglich noch keine Homologien zu Genen bekannt waren, wurden für diese cDNA-Klone keine quantitativen Untersuchungen durchgeführt. Mittlerweile liegen für die unbekanntenen Klone Sequenzhomologien zu bekannten Genen vor, die in der Tabelle eingetragen worden sind.

Tab. 3.7: Sequenzhomologien für Klone in der Entwicklung von SHR-04 nach SHR-12. HSA, *Homo sapiens*; MMU, *Mus musculus*; RNO, *Rattus norvegicus*; Bez., Bezeichnung; Trans., Transkriptgröße; Ident., Identitäten [bp]; (%), Homologie; Chr., chromosomale Lokalisation

cDNA-Klon		Sequenzhomologien		
Bez.	Trans.	zu bekannten Genen	Ident.	Chr.
16	0,5 kb	RNO <i>ATPase synthase subunit 6 mRNA</i>	440 / 477	-
	1,9 kb	1872 bp; AC: AF504920; partial cds	(92 %)	
32-33	3,5 kb	RNO <i>gap junction membrane channel protein alpha 1 (Gja1)</i>	88 / 90	RNO
		3148 bp; AC: NM_012567; mRNA	(97 %)	20q11
75	1,9 kb 3,5 kb	MMU <i>gap junction membrane channel protein alpha 1 (Gja1)</i>	80 / 95	MMU
		3071 bp; AC: NM_010288.2; mRNA	(84 %)	10
		RNO <i>nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain) (Nol3)</i>	351 / 355	RNO
		1876 bp; AC: NM_053516.1; mRNA	(98 %)	19

3.7.2 Subtraktion SHR-12 → SHR-26

Zwei der gepickten Klone (Abschnitt 3.4, Abb. 3.6), deren Sequenzen ermittelt werden sollten, wiesen im Agarosegel Doppelbanden auf, die zuerst einzeln aus dem Gel isoliert werden mussten. Beim internen Sequenzabgleich stellte sich heraus, dass die Bande bei 0,3 kb des Klons 12 (12-1) mit dem Insert des Klons 15 identisch ist und der identische Klon wurde fortan unter der neuen gemeinsamen Bezeichnung Klon 15 geführt. Die Bande bei 0,4 kb des Klons 12 (12-2) blieb von der Bezeichnung her Klon 12. Die den beiden Banden entsprechenden cDNA des Klons 28 wurden in Klon 28-1 (0,6 kb) und Klon 28-2 (1,2 kb) umbenannt. Weiterhin war den Sequenzinformationen zu entnehmen, dass die Klone 39 und 69 ebenfalls die gleiche cDNA repräsentieren und

nun die Bezeichnung Klon 39-69 erhielten. In der Tab. 3.8 sind die Informationen über Sequenzhomologien zu bekannten Genen aufgeführt, die durch den Abgleich der Klonsequenzen der Subtraktion von SHR-12 nach SHR-26 mit elektronischen Datenbanken ermittelt werden konnten.

Tab. 3.8: Sequenzhomologien für Klone der Entwicklung von SHR-12 nach SHR-26. HSA, *Homo sapiens*; MMU, *Mus musculus*; RNO, *Rattus norvegicus*; Bez., Bezeichnung; Trans., Transkriptgröße; Ident., Identitäten [bp]; (%), Homologie; Chr., chromosomale Lokalisation

cDNA-Klon		Sequenzhomologien		
Bez.	Trans.	zu bekannten Genen oder anderen Sequenzen	Ident.	Chr.
1	3,8 kb	RNO <i>similar to muscleblind-like 2 (Mbnl2_predicted) isoform 1</i> 4416 bp; AC: XM_214253; mRNA	355/356 (99 %)	RNO 15
		MMU <i>muscleblind-like 2 (Mbnl2)</i> 2443 bp; AC: NM_175341.2; mRNA	335 / 358 (93 %)	MMU 14
		HSA <i>muscleblind-like 2 (Drosophila) (MBNL2), variant 1</i> 4665 bp; AC: NM_144778.1; mRNA	317 / 359 (88 %)	HSA 13
5	0,4 kb	RNO <i>similar to RIKEN cDNA 5230400G24 (LOC301563)</i> 1835 bp; AC: XM_217448.2; mRNA	707 / 714 (99 %)	RNO 9
	1,0 kb	MMU <i>RIKEN cDNA 5230400G24 gene, mRNA</i> 1920 bp; AC: BC059229.1; complete cds	506 / 528 (95 %)	MMU 1
		HSA <i>GL004 protein (GL004)</i> 2032 bp; AC: NM_020194.4; mRNA	529 / 592 (89 %)	HSA 2
12 (12-2)	1 kb	RNO <i>gamma sarcoglycan (Sgcg)</i> 1523 bp; AC: NM_001006993; mRNA	278 / 280 (99 %)	RNO 15
		MMU <i>sarcoglycan, gamma (Sgcg)</i> 1289 bp; AC: NM_011892.1; mRNA	256 / 280 (91 %)	MMU 14
		Mesocricetus auratus <i>mRNA for gamma-sarcoglycan</i> 1550 bp; AC: D83653.1; complete cds	246 / 280 (87 %)	-
		HSA <i>sarcoglycan, gamma (SGCG)</i> 1630 bp; AC: NM_000231.1; mRNA	234 / 283 (82 %)	HSA 13

15 (12-1)	2,7 kb	RNO <i>suppressor of cytokine signaling 6 (predicted)</i> (<i>Socs6_predicted</i>), mRNA 2362 bp; AC: XM_225667; mRNA	383 / 383 (100 %)	RNO 18
	10 kb	MMU <i>suppressor of cytokine signaling 6 (Socs6)</i> 3213 bp; AC: NM_018821.2; mRNA	368 / 383 (96 %)	MMU 18
		HSA <i>suppressor of cytokine signaling 6 (SOCS6)</i> 2650 bp; AC: NM_004232; mRNA	356 / 383 (92 %)	HSA 18
28-1	3,5 kb	MMU <i>mRNA for monoglyceride lipase (Mgll gene)</i> 3863 bp; AC: NM_011844; mRNA	215 / 245 (87 %)	MMU 6
28-2	3,5 kb	HSA <i>titin (TTN), transcript variant novex-2</i> 82603 bp; AC: NM_133437.1; mRNA	158 / 194 (81 %)	HSA 2q31
33	5,8 kb	MMU <i>predicted: calmodulin binding transcription activator 1 (Camta1)</i> , mRNA 8341 bp; AC: XM_355539.3; mRNA	389 / 422 (92 %)	MMU 4
		HSA <i>calmodulin binding transcription activator 1 (CAMTA1)</i> 8457 bp; AC: NM_015215.1; mRNA	360 / 427 (84 %)	HSA 1
36	4,0 kb	RNO <i>Ba1-643 mRNA</i> 736 bp; AC: AY325226.1; complete cds	233 / 233 (100 %)	-
		MMU <i>cDNA sequence BC005537 (BC005537)</i> 2551 bp; AC: NM_024473.2; mRNA	231 / 233 (99 %)	MMU 13
		HSA <i>chromosome 6 open reading frame 62 (C6orf62)</i> 2444 bp; AC: NM_030939.3; mRNA	229 / 242 (94 %)	HSA 6
39-69	1 kb	RNO <i>ribosomal protein L3 (Rpl3)</i> 1320 bp; AC: NM_198753.1; mRNA	740 / 743 (99 %)	RNO 7
	2,7 kb	MMU <i>ribosomal protein L3 (Rpl3)</i> 1276 bp; AC: NM_013762.1; mRNA	689 / 732 (94 %)	MMU 15
		HSA <i>ribosomal protein L3 (RPL3)</i> 1311 bp; AC: NM_000967.2; mRNA	647 / 718 (90 %)	HSA 22

46	1,5 kb	RNO <i>heterogeneous nuclear ribonucleo-proteins (hnRNP) methyl-transferase-like 2 (S. cerevisiae) (Hrmt112)</i> 1201 bp; AC: NM_024363.1; mRNA	475 / 483 (98 %)	RNO 1
		MMU <i>hnRNP methyltransferase-like2 (S.cerevisiae) (Hrmt112)</i> 1282 bp; AC: NM_019830.1; mRNA	454 / 484 (93 %)	MMU 7
		HSA <i>hnRNP methyltransferase-like 2 (HRMT1L2), variant 3</i> 1262 bp; AC: NM_198318.1; mRNA	381 / 432 (88 %)	HSA 19
58	0,9 kb	RNO <i>acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain (Acadl)</i> 1451 bp; AC: NM_012819.1 ; mRNA	188 / 196 (96 %)	RNO 9
	4,7 kb	MMU <i>acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain (Acadl)</i> 1893 bp; AC: NM_007381.2; mRNA	114 / 123 (92 %)	MMU 1
65	1,8 kb	RNO <i>solute carrier family 35, member F5 (predicted) (Slc35f5_predicted), mRNA</i> 2688 bp; AC: XM_222576 ; mRNA	759/769 (98 %)	RNO 13q11
		MMU <i>solute carrier family 35, member F5 (Slc35f5)</i> 2709 bp; AC: NM_028787.2; mRNA	743 / 800 (92 %)	MMU 1
		HSA <i>solute carrier family 35, member F5 (SLC35F5)</i> 2875 bp; AC: NM_025181.2; mRNA	690 / 804 (85 %)	HSA 2
66	2,5 kb	RNO <i>cadherin 2 (Cdh2)</i> 4350 bp; AC: NM_031333.1; mRNA	535 / 542 (98 %)	RNO 18
	4,7 kb	MMU <i>cadherin 2 (Cdh2)</i> 4321 bp; AC: NM_007664.1; mRNA	509 / 542 (93 %)	MMU 18
		HSA <i>cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal) (CDH2)</i> 4122 bp; AC: NM_001792.2; mRNA	458 / 535 (85 %)	HSA 18
77	3,0 kb	RNO <i>similar to epidermal growth factor receptor substrate 15-like 1 (Eps15-related protein) (Eps15R)</i> 3072 bp; AC: NM_001029921; mRNA	366 / 371 (98 %)	RNO 16
		MMU <i>epidermal growth factor receptor pathway substrate 15-like 1) (Eps15R)</i> 3129 bp; AC: NM_007944.1; mRNA	479 / 515 (93 %)	MMU 8

		HSA <i>epidermal growth factor receptor pathway substrate 15-like 1 (EPS15R)</i> 2774 bp; AC: NM_021235.1; mRNA	441 / 522 (84 %)	HSA 19
86	2,5 kb	RNO 3 <i>BAC CH230-11N5</i> 238007 bp; AC: AC097745.8; complete sequence	891 / 896 (99 %)	RNO 3
		RNO <i>similar to RIKEN cDNA A930015D22 (LOC311358)</i> 1347 bp; XM_230509.2; mRNA	161 / 167 (96 %)	RNO 3
		Mouse DNA sequence, clone RP23-433P19, chromosome 2 197839 bp; AC: AL845466.4; complete sequence	655 / 713 (91 %)	MMU 2
90	1,9 kb	RNO <i>citrate lyase beta like (predicted) Clybl_predicted)</i> 2298 bp; AC: XM_240311; mRNA	712 / 721 (98 %)	RNO 15
		MMU <i>citrate lyase beta like (Clybl)</i> 1210 bp; AC: NM_029556.2; mRNA	683 / 722 (94 %)	MMU 14
		HSA <i>citrate lyase beta like (CLYBL)</i> 2597 bp; AC: NM_138280.2; mRNA	606 / 713 (84 %)	HSA 13
92	1,9; 2,7 4,5 kb	RNO <i>r-goliath protein (Gp)</i> 1463 bp; AC: AY190520.1; mRNA	377 / 380 (99 %)	-
		MMU <i>goliath protein (Gp)</i> 1452 bp; AC: AF171875; mRNA	372 / 380 (97 %)	MMU 11
		HSA <i>goliath protein (GP)</i> 1862 bp; AC: AY083998.1; mRNA	354 / 381 (92 %)	HSA 5

3.8 Bestimmung der relativen Expression durch *real-time* RT-PCR

Nachdem die Randsequenzen von insgesamt 23 cDNA-Klonen ermittelt und umfangreiche *in silico*-Analysen durchgeführt wurden, ging es darum, eine Auswahl der aussichtsreichsten Kandidaten zu treffen. Von den 17 Klonen der cDNA-Subtraktion SHR-12 → SHR-26 (Tab. 3.8) wurden die Sequenzinformationen benutzt, um von 7 Genen den durch die Northern-Analysen ermittelten Status einer differentiellen Expression mittels quantitativer *real-time* PCR zu bestätigen. Bei der Selektion der Kandidaten war von Interesse, ob die Genbeschreibungen auf Signaltransduktion hinwiesen (Klone 33, 77 und 92), ob sie bereits in der Literatur im Zusammenhang mit Herzhypertrophie beschrieben wurden (Klone 12 und 28-2) und ob es sich um ein bisher unbekanntes Gen (Klon 65) handelte. Für alle *real-time* Experimente wurden mehrere, unabhängige cDNA-Synthesen durchgeführt. Für jede reverse Transkription wurde die gleiche Menge an mRNA eingesetzt, deren Konzentration spektrophotometrisch gemessen wurde, sodass die Normalisierung der Proben gegen die optische Dichte erfolgte. Für jede zu untersuchende Probe wurden mindestens drei verschiedene PCR-Ansätze amplifiziert (Dreifachbestimmungen). Wie im Abschnitt 3.8.1 behandelt, wurden die Rohdaten des Rotor-Gene 2000-Cyclers überprüft, und durch die Software die relative Expression (bezogen auf WKY-04) der untersuchten Gene ermittelt. Aus diesen Daten wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet. Die Daten von drei unabhängigen Experimenten bildeten ein Endergebnis, wobei von jedem Experiment Dreifachmessungen durchgeführt wurden. Die relative Expression wurde gegen die Entwicklungsstadien der Ratten (4, 12, 26 Wochen) aufgetragen. Die grafische Darstellung erfolgte in Form von Balkendiagrammen.

3.8.1 Evaluierung der *real-time* PCR anhand einer GAPDH-Verdünnungsreihe

Um die Methode der Quantifizierung mittels *real-time* PCR und die Datenanalyse zu etablieren, wurde eine Verdünnungsreihe des GAPDH-Gens getestet. Die einzelnen Verdünnungsstufen sind der Tab. 3.9 zu entnehmen. Der Kurvenverlauf ist in Abb. 3.12 gezeigt. Die Proben mit Transkripten der größten Kopienzahl (Verdünnung 1:1) erreichen die exponentielle Phase der Amplifikation bereits nach ca. 12 Zyklen, die mit der niedrigsten (1:250-Verdünnung) erst nach ca. 22 Zyklen.

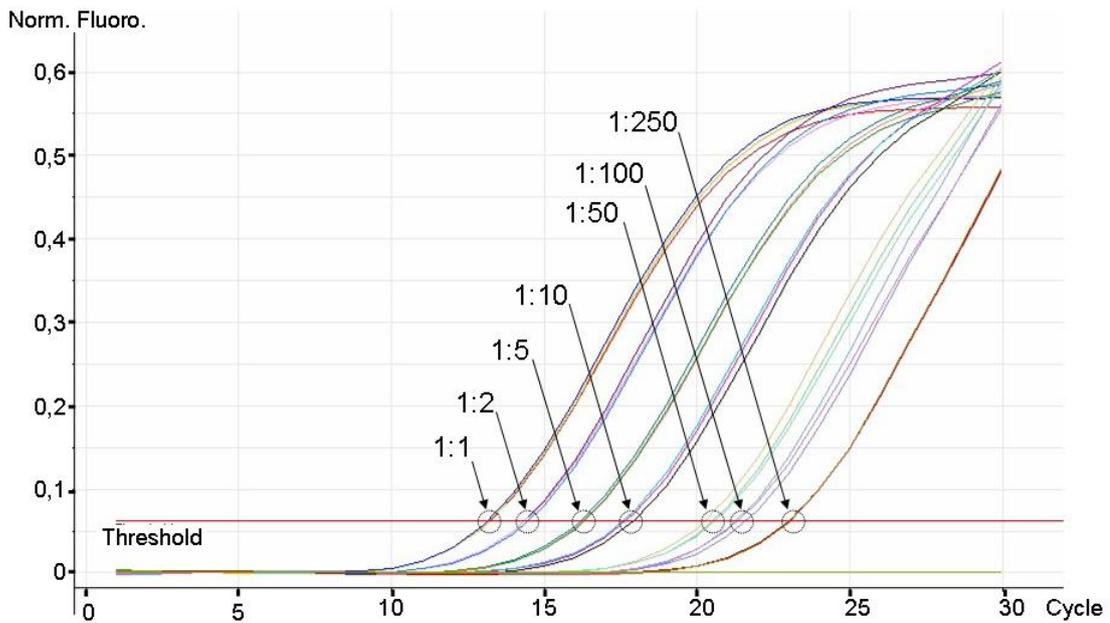


Abb. 3.12: Typischer Kurvenverlauf der real-time RT-PCR, anhand einer Verdünnungsreihe von GAPDH mit sieben Verdünnungsstufen von 1:1 bis 1:250. Die C_T -Werte der cDNA-Verdünnungen sind durch Kreise markiert.

Exemplarisch für alle Quantifizierungen sind in der Tab. 3.9 die Ergebnisse der GAPDH-Verdünnungsreihe aufgelistet, die von der Analysesoftware generiert wurden. Anhand der Rohdaten *take off* und Amplifikationseffizienz wurde zuerst überprüft, ob alle Proben ordnungsgemäß amplifiziert wurden. Die Amplifikationseffizienzen sollten zwischen 1,7 - 2,0 liegen, um die Bedingungen für die Anwendbarkeit des zugrunde liegenden mathematischen Modells zu gewährleisten. Anhand des Vergleichs der einzelnen *take off*-Werte können Ausreißer erkannt und berücksichtigt werden. Weiterhin erfordert die Software die Auswahl einer Kontrolle. Hierbei wird eine einzelne Probe als Referenzprobe ausgewählt und erhält den Wert 1, auf den die Expressionen aller anderen Proben bezogen werden. Für den Versuch mit GAPDH wurde die Probe Nr. 2 der 1:1-Verdünnung (Tab. 3.9) als Kontrolle gewählt, da dies die vorliegende Konzentrationsabnahme der Verdünnungsstufen am besten widerspiegelte.

Tab. 3.9: *Quantifizierungsergebnisse einer GAPDH-Verdünnungsreihe. Probe 2 wurde als interne Referenz auf 1 gesetzt. Aus den take off-Werten und Amplifikationseffizienzen errechnen sich die relativen Konzentrationen. Die Durchschnittsamplifikation beträgt hier $1,83 \pm 0,08$.*

Nr.	Bezeichnung	take off	Amplifikation	Relative Konzentration
1	1:1	11,9	1,81	1,06E+00
2		12	2,23	1,00E+00
3		12	1,69	1,00E+00
4	1:2	13,3	1,98	4,56E-01
5		13,2	2,19	4,84E-01
6		13,4	1,82	4,29E-01
7	1:5	15,1	1,71	1,54E-01
8		15,2	1,8	1,45E-01
9		15,1	1,86	1,54E-01
10	1:10	16,7	1,91	5,84E-02
11		16,9	1,79	5,18E-02
12		16,5	1,79	6,59E-02
13	1:50	19,2	1,94	1,29E-02
14		19,3	1,72	1,21E-02
15		19,5	1,88	1,08E-02
16	1:100	20,2	1,9	7,05E-03
17		20,4	1,73	6,24E-03
18		20,1	1,82	7,49E-03
19	1:250	21,9	1,96	2,52E-03
20		21,9	1,82	2,52E-03
21		21,9	1,84	2,52E-03

Die relativen Expressionen der GAPDH-Verdünnungen sind in Abb. 3.13 gegen die einzelnen Stufen aufgetragen und entsprechen der Abnahme der GAPDH-Transkripte.

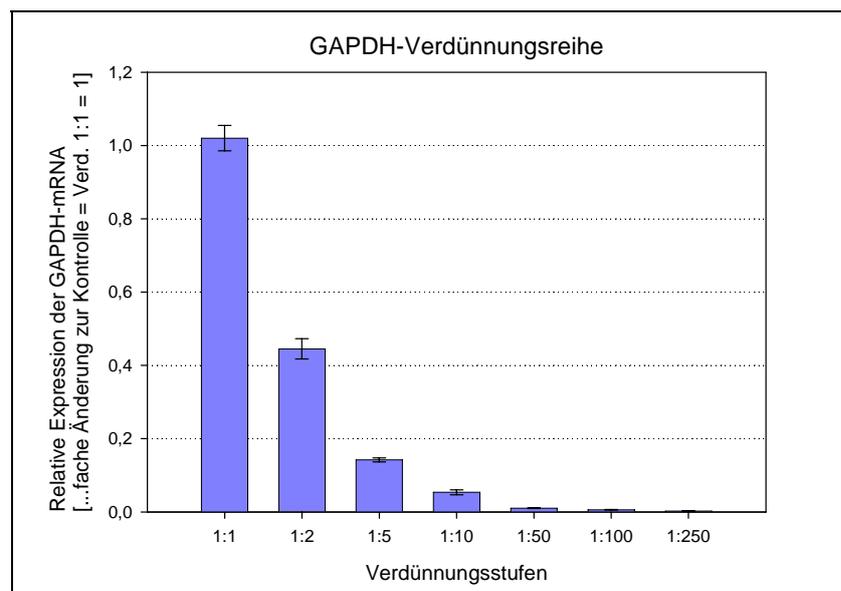


Abb. 3.13: *Komparative Quantifizierung der GAPDH-Verdünnungsreihe. 1:1-Verdünnung=Kontrolle=1*

3.8.2 Test der mRNA auf Kontamination mit genomischer DNA

Die RNA kann variable Mengen an genomischer DNA enthalten, wobei die spektrophotometrische Konzentrationsmessung der RNA jedoch keine Rückschlüsse über deren Existenz zulässt. Durch DNase-Behandlung der RNA könnte diesem Problem nur teilweise begegnet werden. Deshalb wurde der mögliche Einfluss solcher Kontaminationen überprüft. In den ersten Versuchen (Abb. 3.14, B) wurden jeweils parallel mRNA und cDNA mit Primern für β -Actin und GAPDH amplifiziert und Banden bei 200 bp bzw. 450 bp erzielt. Auch die mRNA-Probe des GAPDH zeigte eine Bande bei 450 bp und lässt auf genomische DNA in der mRNA schließen. Die Coamplifikation von genomischer DNA kann durch geeignete, Intron-überspannende Kontrollensequenzen verhindert werden, wodurch in den Proben vorhandene genomische DNA keine PCR-Produkte erzeugen wird (Lion, 2001). Es wurden neue Primer getestet (Abb. 3.14, A), die auf verschiedenen Exons liegen und nur den cDNA-Anteil amplifizieren sollten (β -Actin: 0,5 kb; GAPDH: 0,44 kb), jedoch keine genomische DNA (β -Actin: 1kb; GAPDH: 1,1 kb). Bei β -Actin (bACT-1) ist eine schwache Bande für genomische DNA in der RNA-Spur erkennbar, die bei GAPDH-1 fehlt, wofür aber eine Bande in der RNA-Spur auf cDNA hinweist, die sich durch die Existenz von GAPDH-Pseudogenen erklären lässt.

Mit weiteren Experimenten sollte der Einfluss von DNA auf die Quantifizierung untersucht werden. Während bei Verwendung unverdünnter mRNA Amplifikationsprodukte nachgewiesen werden konnten (Abb. 3.14 und nicht gezeigte *real-time* PCR-Ergebnisse), lässt sich der Einfluss genomischer DNA vernachlässigen, wenn die mRNA in der gleichen Verdünnung vorlag, wie sie für die cDNA bei den *real-time* PCR-Experimenten verwendet wurde, da keine Amplifikation stattfand.

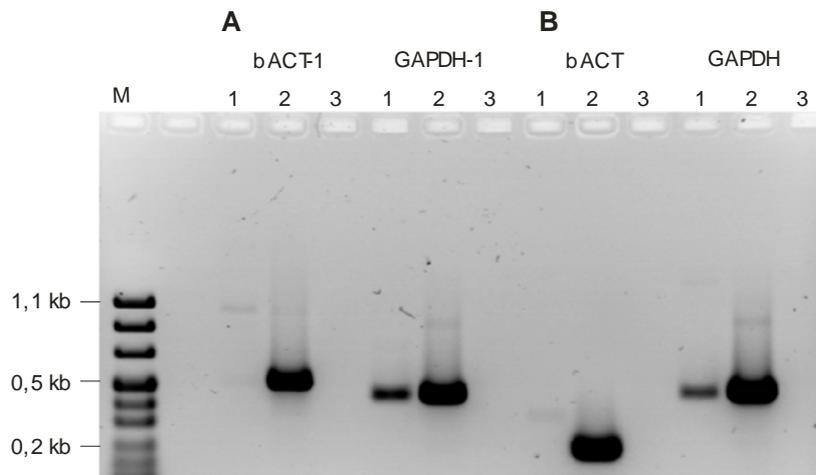
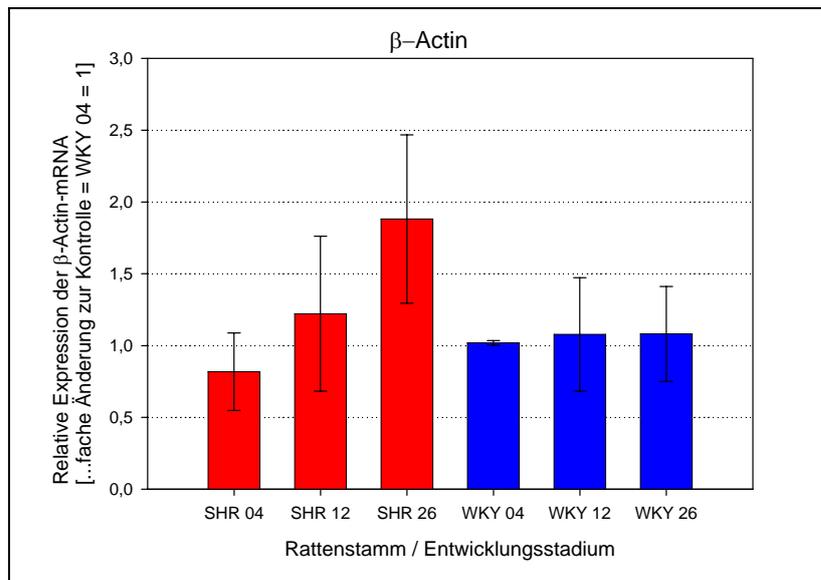


Abb. 3.14: Test auf genomische DNA in der mRNA. PCR-Produkte, die bei der Amplifikation von mRNA (Spur 1) bzw. cDNA (Spur 2) mit β -Actin- und GAPDH-Primern entstanden sind. Zur Überprüfung auf Pseudogene (B), wurden neue, Exon-überspannende Primer getestet (A). Auch bei den neuen Primern (GAPDH-1, A) ist eine 450 bp-Bande zu sehen. Spur 3: NK

3.8.3 Überprüfung von *housekeeping*-Genen als mögliche interne Kontrollgene

Zur Verifizierung gleicher Ausgangsmengen an mRNA und für die Datenanalyse sollte ein geeignetes Referenzgen gefunden werden, das über den untersuchten Entwicklungszeitraum der Ratten von 4 bis 26 Wochen konstant exprimiert wird. Die Abb. 3.15 zeigt die relative Expression bezogen auf die Kontrollgruppe WKY-04 der Gene β -Actin und GAPDH in den einzelnen Entwicklungsstadien der Ratte. Aufgrund der deutlichen Expressionsschwankungen sind β -Actin und GAPDH als Referenzgene ungeeignet.

A)



B)

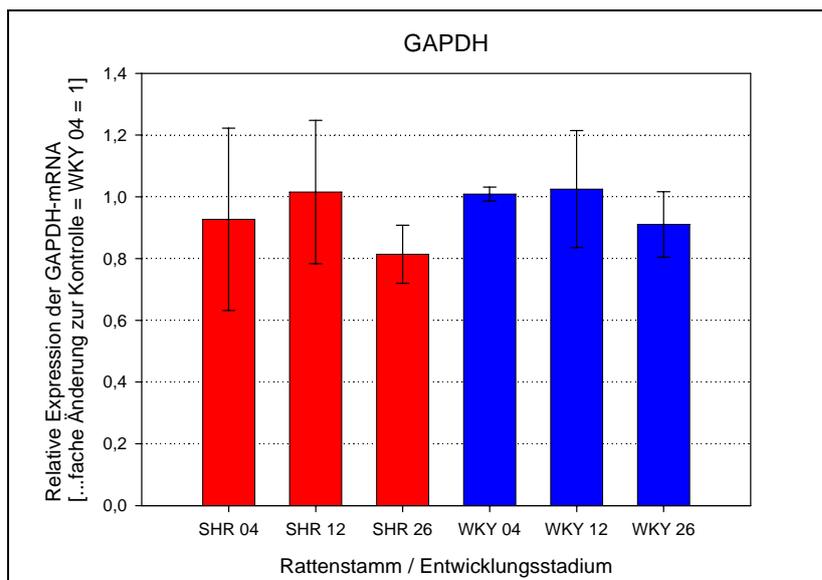


Abb. 3.15: Grafische Darstellung der Ergebnisse der real-time PCR von β -Actin (A) und GAPDH (B). Die MW \pm STABW der relativen Expression sind gegen die einzelnen Ratten / Stadien aufgetragen (WKY-04 = Kontrolle = 1).

3.8.4 Relative Quantifizierung von Kandidaten für differentielle Genexpression

In diesem Abschnitt zur relativen Quantifizierung der Genexpression wurden nur Kandidatengene der cDNA-Subtraktion SHR-12 \rightarrow SHR-26 untersucht. Zu der im Abschnitt 3.8.1 besprochenen Datenanalyse eines jeden Experiments gehörte auch die Überprüfung der Schmelzkurven, die für jedes Amplifikationsprodukt aufgrund seiner speziellen Schmelztemperatur charakteristisch ist. So können unerwünschte Nebenprodukte anhand ihrer abweichenden Schmelztemperaturen identifiziert werden. Das stellt eine sehr komfortable Alternative zur herkömmlichen Gelelektrophorese dar.

In Abb. 3.16 sind beispielhaft die Schmelzkurven einer *real-time* PCR für das Gen γ -Sarcoglycan abgebildet. Alle Kurven sind nahezu identisch und weisen einen gemeinsamen großen Peak bei 86,7°C auf, der den Schmelzpunkt darstellt. Um zu vermeiden, dass eventuelle, unspezifische Produkte erfasst werden, erfolgt die Detektion des Fluorophors SYBR-Green I in jedem Zyklus erst bei 85°C.

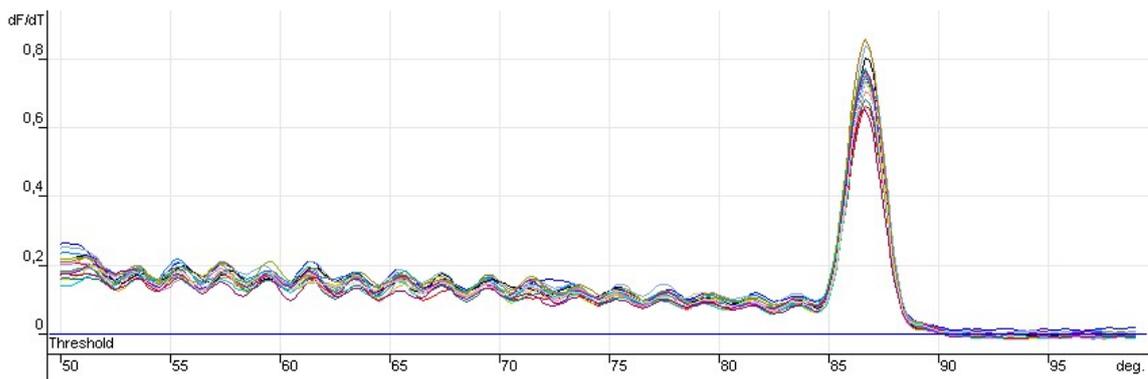


Abb. 3.16: Die Schmelzkurven-Analyse der PCR-Produkte für das Gen γ -Sarcoglycan (jeweils Dreifachbestimmung für SHR-04, SHR-12, SHR-26, WKY-04, WKY-12 und WKY-26) weist einen gemeinsamen Schmelzpunkt bei 86,7°C auf.

Wie schon zu Beginn des Abschnitts 3.8 erwähnt, wurden die Proben auf ihre optische Dichte normalisiert. Es wurden mehrere unabhängige Experimente durchgeführt, wobei für jede Probe mindestens eine Dreifachbestimmung erfolgte. Aus den Ergebnissen der relativen Genexpression wurden dann die entsprechenden Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet. In den folgenden Diagrammen wurden die mRNA-Expression der einzelnen Gene relativ zur Kontrolle WKY-04 = 1 aufgetragen.

Klon 12: *gamma sarcoglycan* (Sgcg)

Insgesamt wurden für die quantitative Expressionsanalyse des Gens γ -Sarcoglycan (Klon 12) pro Alter und Stamm fünf voneinander unabhängige *real-time* PCR-Analysen durchgeführt. Die als Mittelwerte zusammengefassten Ergebnisse dieser Experimente sind in Abb. 3.17 als Vergleich der relativen Expression in der Entwicklung von SHR-04 über SHR-12 nach SHR-26 und den entsprechenden Stadien der WKY-Kontrollen gezeigt. Bei der Betrachtung der Gruppe der SHR wird aus der grafischen Darstellung ein signifikanter Anstieg der Expression von γ -Sarcoglycan deutlich, wobei die Transkriptmenge bei SHR-26 fast das Doppelte des Ausgangswertes von SHR-04 erreicht. Demgegenüber ist in der Kontrollgruppe der WKY-Tiere ein zwar signifikanter Anstieg der Expression zu beobachten, der zum Anstieg bei den SHR-Tieren aber deutlich geringer ausfällt. Beim Vergleich zwischen SHR und WKY fällt eine um etwa 20 % reduzierte Expressionsrate im Stadium SHR-04 gegenüber dem entsprechenden Stadium WKY-04 auf, wohingegen die Expression bei SHR-26 auch gegenüber der Kontrolle WKY-26 signifikant erhöht ist.

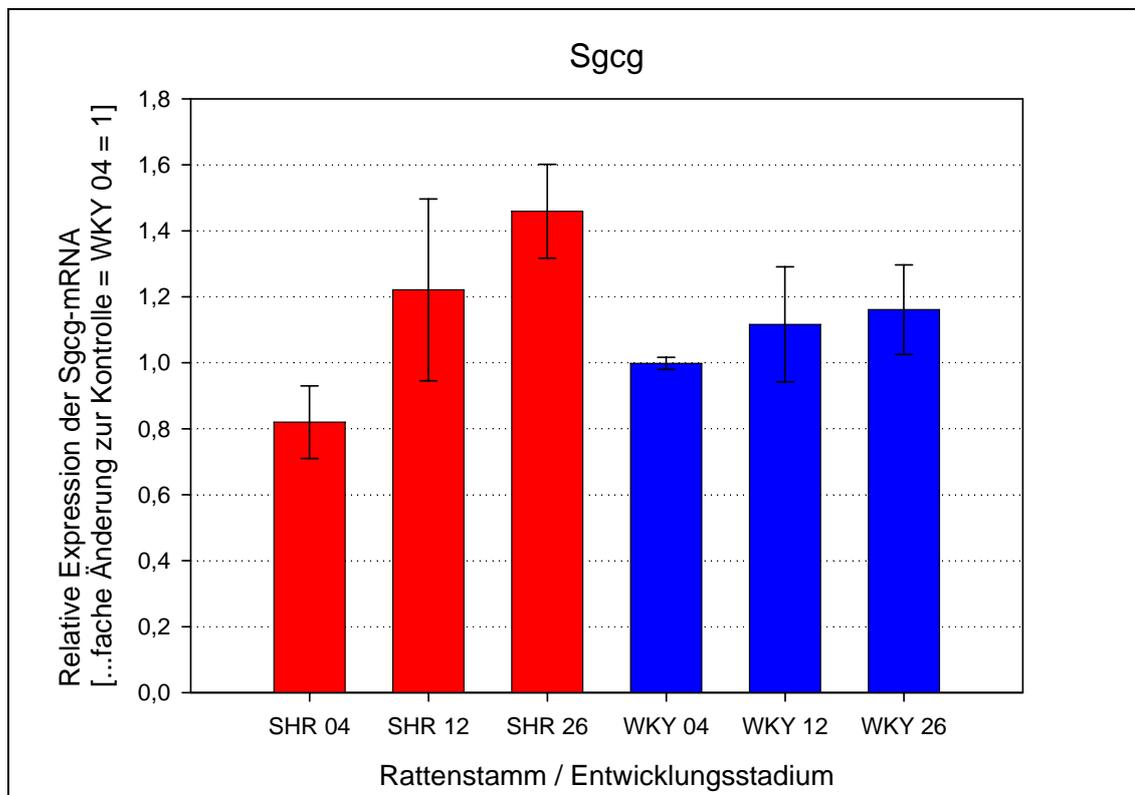


Abb. 3.17: Klon 12 (Sgcg): Grafische Darstellung der Ergebnisse mehrerer *real-time* PCR. Die relative Expression bezogen auf die Kontrolle WKY-04 = 1 ist als MW \pm STABW gegen die drei verschiedenen Entwicklungsstadien von SHR bzw. WKY aufgetragen.

Klon 28-2: titin, transcript variant novex-2 (Ttn)

Ähnlich wie die Ergebnisse der Quantifizierung von γ -Sarcoglycan, zeugen auch die Expressionsanalysen für das Titin-Gen in Abb. 3.18 in der Gruppe der SHR von einem kontinuierlichen Anstieg der Expression. Von den drei unabhängigen Experimenten konnten für die Auswertung nur die Ergebnisse von zwei Versuchen zugrunde gelegt werden, da bei einem Experiment die Amplifikationseffizienzen eines Großteils der PCR-Reaktionen außerhalb des zulässigen Bereiches lagen. Dargestellt wurde die relative Expression der SHR und WKY in den entsprechenden Stadien. Wie im Diagramm gezeigt, erfolgt bei den SHR bereits während der Entwicklung zur Hypertonie von SHR-04 nach SHR-12 eine Verdopplung der Transkriptmenge. Auch im darauf folgenden Zeitraum der Etablierung einer Herzhypertrophie kommt es zu einer signifikanten Zunahme der Expression dieser Titin-Isoform. Der Vergleich zwischen SHR-04 und der WKY-04-Kontrollgruppe lässt eine signifikante, um mehr als 50 % reduzierte Expression der SHR-04 gegenüber den WKY-Tieren erkennen. Innerhalb des WKY-Stammes ergibt sich zwischen den drei Altersgruppen kein signifikanter Unterschied der Titin-Expression.

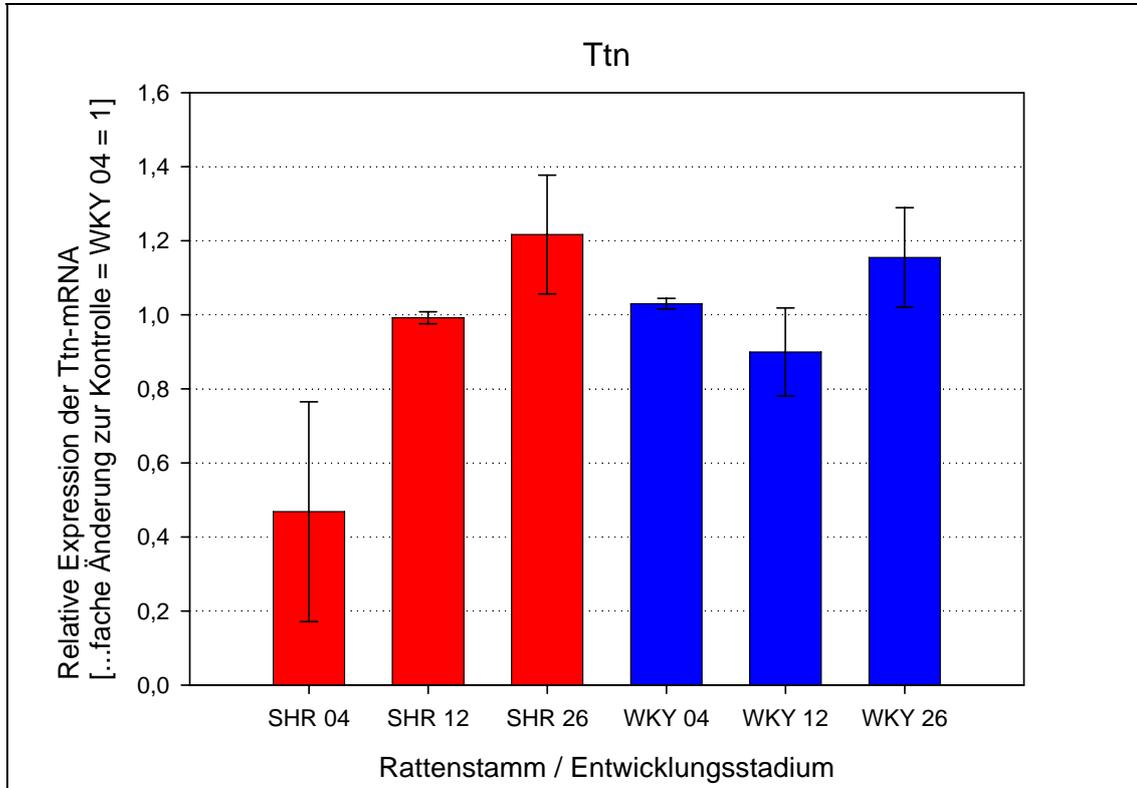


Abb. 3.18: Klon 28-2 (Ttn): Grafische Darstellung der Ergebnisse mehrerer real-time PCR. Die relative Expression bezogen auf die Kontrolle WKY-04 = 1 ist als MW \pm STABW gegen die drei verschiedenen Entwicklungsstadien von SHR bzw. WKY aufgetragen.

Klon 33: *calmodulin binding transcription activator 1* (Camta1)

Die Ergebnisse der quantitativen Expressionsanalysen für das Gen *Camta1* werden in Abb. 3.19 gezeigt. Im Diagramm ist die relative Expression der 4, 12 und 26 Wochen alten SHR und der gleichaltrigen WKY-Kontrolltiere dargestellt. Bei der Betrachtung der SHR-Gruppe fällt eine nahezu konstante Expression bei den SHR-04 und SHR-12 auf. Im Stadium der etablierten Myokardhypertrophie bei den SHR-26 steigt die Expression von *Camta1* dann signifikant um 45 % an. Dieser Anstieg ist auch signifikant gegenüber der entsprechenden Kontrollgruppe WKY-26. Im Vergleich zwischen SHR-04 und WKY-04 sowie innerhalb der Kontrollgruppe zwischen WKY-04 und WKY-26 lassen sich keine signifikanten Unterschiede erkennen.

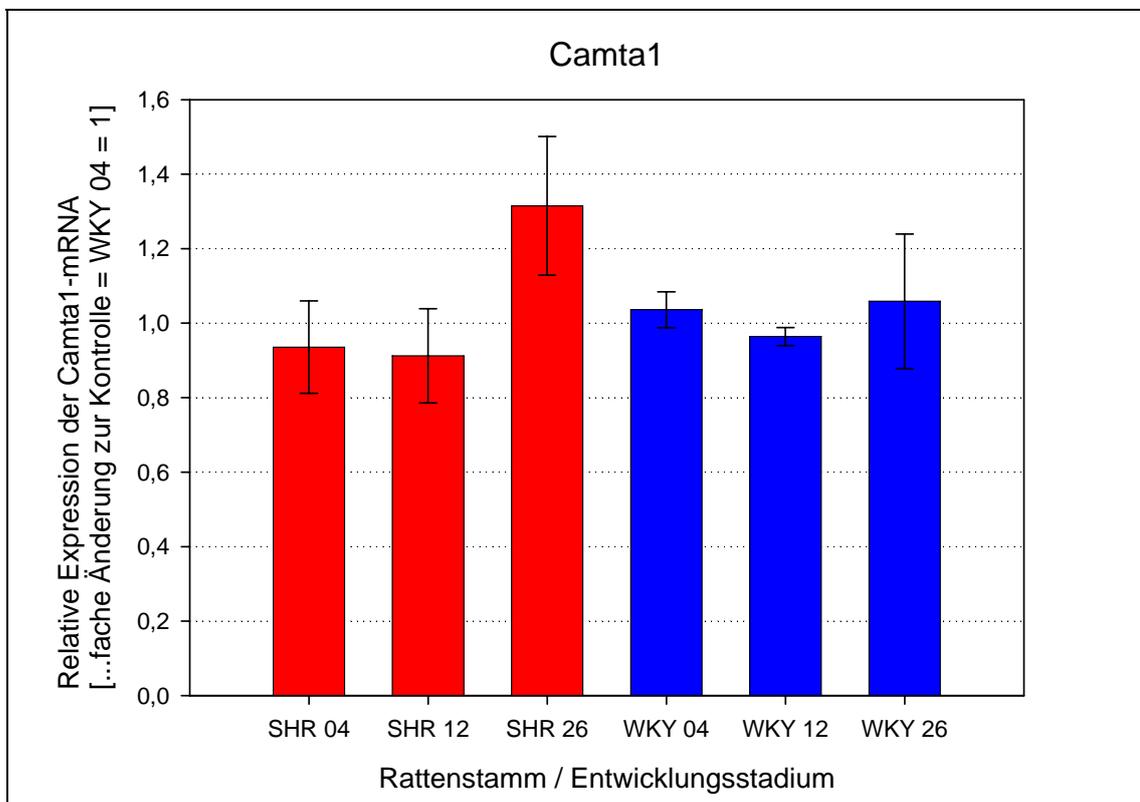


Abb. 3.19: Klon 33 (*Camta1*): Grafische Darstellung der Ergebnisse mehrerer *real-time PCR*. Die relative Expression bezogen auf die Kontrolle WKY-04 = 1 ist als $MW \pm STABW$ gegen die drei verschiedenen Entwicklungsstadien von SHR bzw. WKY aufgetragen.

Klon 65: *solute carrier family 35, member F5 (Slc35f5)*

In der Abb. 3.20 wird die relative Expression des Gens *Slc35f5* gezeigt. Während das *Slc35f5*-Gen in allen drei Entwicklungsstadien der WKY-Kontrollgruppe nahezu konstant exprimiert wird, lässt sich in der Gruppe der SHR eine drastische Hochregulation erkennen. Die anfängliche Expression der SHR-04 ist verglichen mit den WKY-04 um ca. 80 % signifikant reduziert. Diese Transkriptmenge erhöht sich während der Entwicklung von SHR-04 nach SHR-12 um ungefähr das 5-fache und hat im Alter von 12 Wochen bei den SHR das Expressionsniveau der WKY-Kontrollen erreicht. Nach einem Zeitraum von 14 Wochen steigt die Expression des *Slc35f5*-Gens bei den SHR-26 weiter um ungefähr 20 % signifikant an.

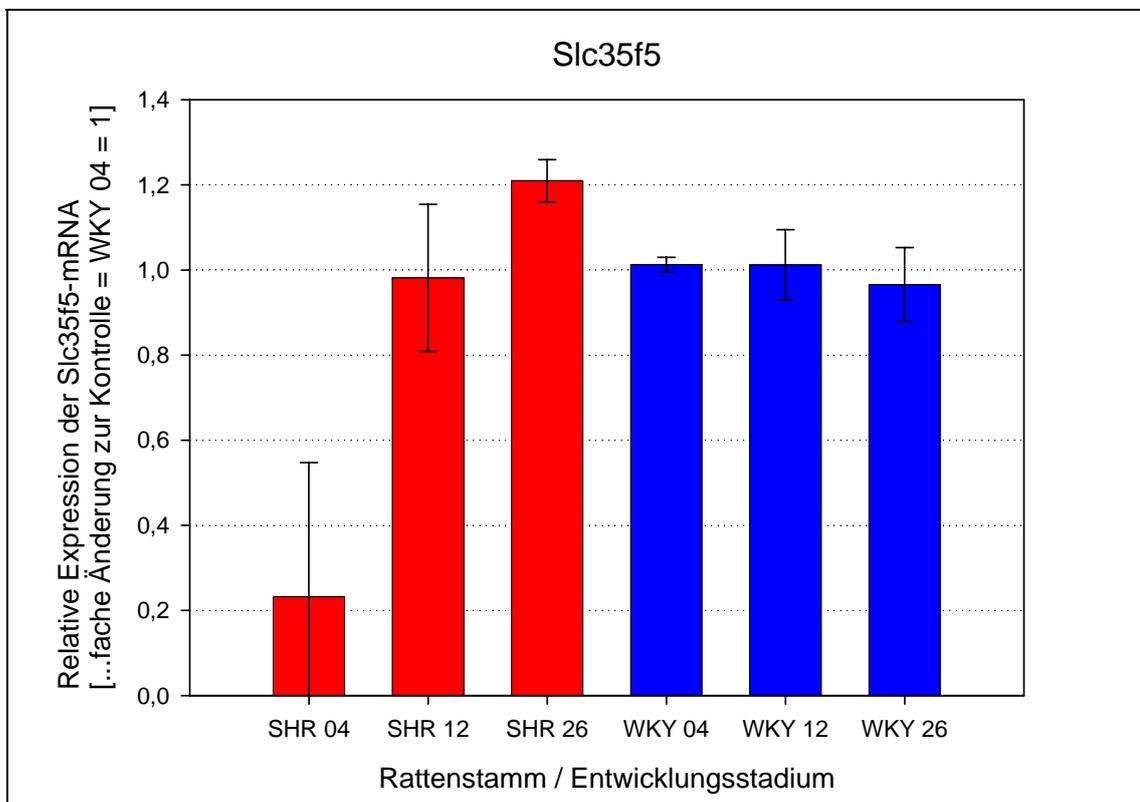


Abb. 3.20: Klon 65 (*Slc35f5*): Grafische Darstellung der Ergebnisse mehrerer real-time PCR. Die relative Expression bezogen auf die Kontrolle WKY-04 = 1 ist als $MW \pm STABW$ gegen die drei verschiedenen Entwicklungsstadien von SHR bzw. WKY aufgetragen.

Klon 92: goliath protein (Gp)

Als letztes der quantitativ untersuchten Gene sind hier die Ergebnisse der Expressionsanalysen für das Goliath-Protein dargestellt. Im Diagramm der Abb. 3.21 ist wieder die relative Expression der drei Stadien der SHR und der dazugehörigen WKY-Kontrollen aufgetragen. Die Expression der Gruppe der SHR und der Gruppe der WKY weisen ein gemeinsames Muster auf. Die 4 Wochen und 12 Wochen alten Tiere sowohl der SHR als auch der WKY exprimieren das Gen auf annähernd gleichem Niveau. Ein Anstieg der Expression erfolgt bei den 26 Wochen alten Ratten, wobei der Unterschied zwischen SHR-12 und SHR-26 signifikant und zwischen WKY-12 und WKY-26 nicht signifikant ist. Der Expressionsunterschied des Goliath-Proteins zwischen SHR-26 und WKY-26 ist nicht signifikant.

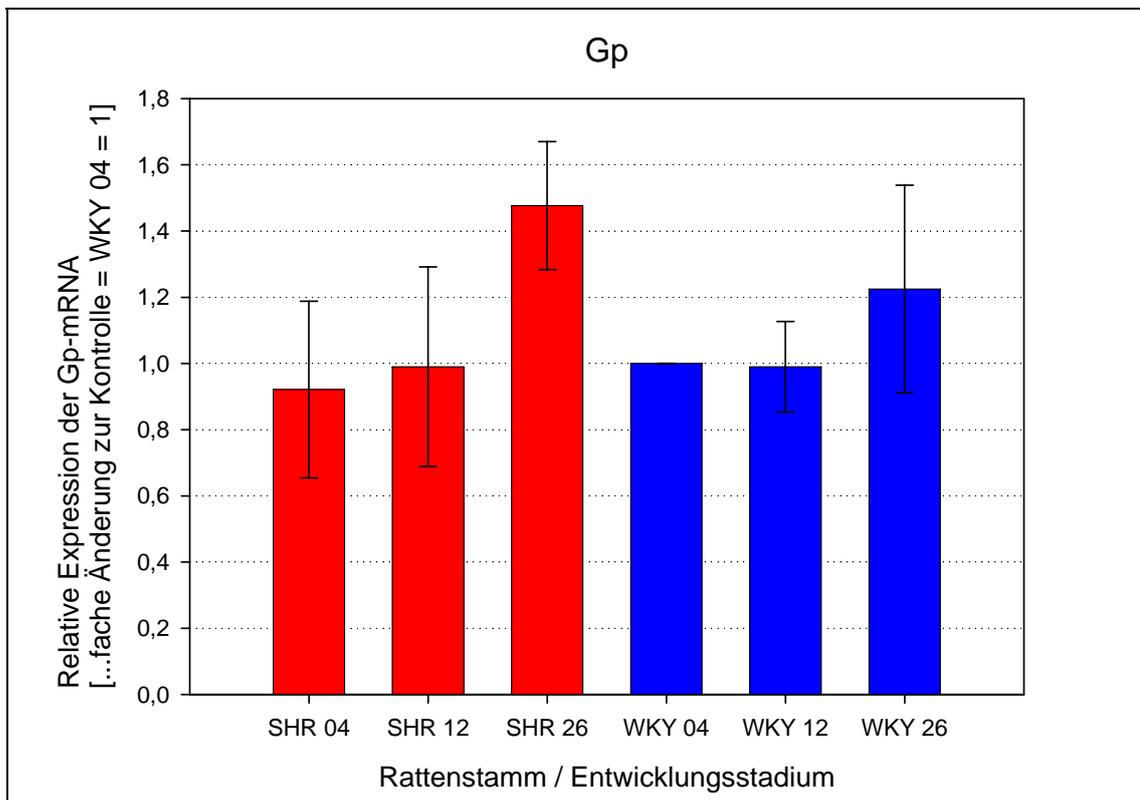


Abb. 3.21: Klon 92 (Gp): Grafische Darstellung der Ergebnisse mehrerer real-time PCR. Die relative Expression bezogen auf die Kontrolle WKY-04 = 1 ist als $MW \pm STABW$ gegen die drei verschiedenen Entwicklungsstadien von SHR bzw. WKY aufgetragen.

Klon 77: similar to epidermal growth factor receptor substrate 15-like 1 (Eps15R)

Methodisch gesehen unterschied sich der Klon 77 im Vergleich zu den anderen quantitativ untersuchten cDNA-Klonen dahingehend, dass bei ihm mittels *real-time* RT-PCR nur dann Amplifikationsprodukte erhalten werden konnten, wenn die vorausgehende reverse Transkription anstatt mit dem normalerweise benutzten poly(dT) cDNA Synthese Primer, mit einem für Klon 77 spezifischen Primer durchgeführt wurde.

Die Ergebnisse der quantitativen Expressionsanalysen für das Eps15r-Gen des Klons 77 sind in Abb. 3.22 gezeigt. Das Gen für Eps15r ist ein Beispiel für ein Gen, dessen Quantifizierung auf keinerlei Regulation während der Entwicklung zur Myokardhypertrophie schließen lässt. Weder in der Gruppe der SHR, noch bei den WKY-Kontrolltieren lässt sich zwischen den einzelnen Entwicklungsstadien ein signifikanter Unterschied in der Genexpression feststellen.

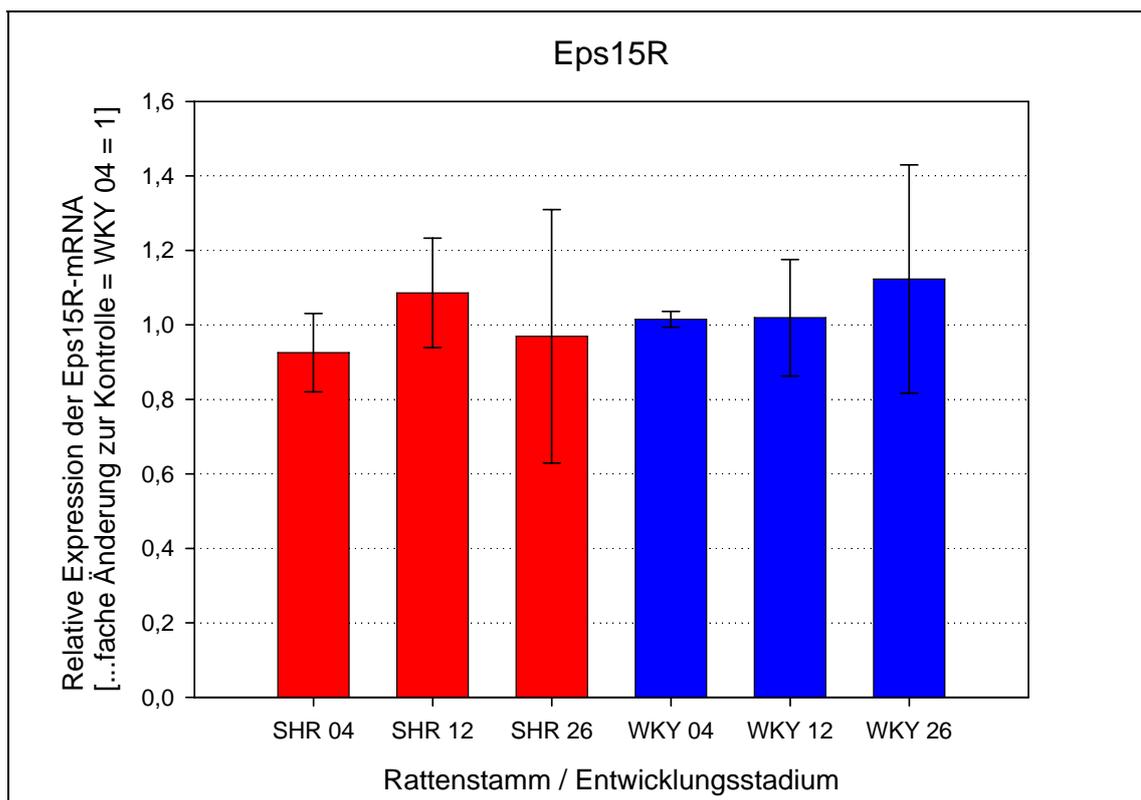


Abb. 3.22: Klon 77 (*Eps15r*): Grafische Darstellung der Ergebnisse mehrerer *real-time* PCR. Die relative Expression bezogen auf die Kontrolle WKY-04 = 1 ist als MW ± STABW gegen die drei verschiedenen Entwicklungsstadien von SHR bzw. WKY aufgetragen.

4 Diskussion

4.1 cDNA-Subtraktion

Diese Arbeit hatte die Identifizierung differentiell exprimierter Gene in der Entwicklung der Myokardhypertrophie bei der Ratte zum Ziel. Es kam die Methode der subtraktiven cDNA-Selektion (Diatchenko *et al.*, 1996) mit mRNA aus Herzen von normotensiven (4 Wochen alt), hypertensiven (12 Wochen alt) und hypertrophen (26 Wochen alt) SHR-Ratten zur Anwendung. Diese Technik, bestehend aus subtraktiver cDNA-Hybridisierung und der so genannten *Suppression PCR* resultierte in einer herzspezifischen, subtrahierten cDNA-Bibliothek, die den Ausgangspunkt für die Suche nach möglicherweise ursächlich mit der Ausbildung dieses Krankheitsbildes zusammenhängenden Kandidatengen darstellte. Diese Methode erlaubte das Auffinden differentiell exprimierter Gene in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Es wurden die Herzen von SHR aus drei verschiedenen Stadien der Hypertrophieentwicklung als Vergleichsgewebe benutzt und diese gegen die regelrechte Genexpression in der Herzentwicklung von WKY-Kontrolltieren in Beziehung gesetzt.

4.2 Northern Blot-Analysen

Die Northern-Analysen zeigen in den meisten Fällen, dass die cDNA-Klone mit der Tester- und der Driver-RNA hybridisieren. Zum einen ließe sich das bei unterschiedlichen Transkriptgrößen durch alternativ gespleißte Formen erklären. Andererseits könnten diese Gene Mitglieder von Multigenfamilien sein, wenn mehrere verschiedene Transkripte gefunden werden mit einer oder mehreren Banden spezifisch nur bei der Tester-RNA. Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass Expressionsunterschiede bezogen auf die Stärke des Hybridisierungssignals zumindest direkt zwischen den Partnern einer cDNA-Subtraktion zu sehen sein sollten. Bei der Subtraktion SHR-04 → SHR-12 lassen sich sowohl Induktion als auch Repression von Genen erwarten, wogegen bei der Subtraktion SHR-12 → SHR-26 aufgrund der oft beschriebenen Reinduktion fetaler Genprogramme (Parker, 1995; Frey *et al.*, 2003) bei der Ausbildung der Herzhypertrophie wahrscheinlich eher mit einer Induktion von Genen gerechnet werden kann. Das wäre auch eine Erklärung für die auffällig schwachen Banden im Stadium SHR-12, die in fast allen Blots vorgefunden wurden. Dass gleiche RNA-Mengen aufgetragen wurden, zeigen die Kontrollhybridisierungen mit β -Actin.

4.3 Relative Quantifizierung durch *real-time* RT-PCR

4.3.1 Suche nach geeigneten Referenzgenen

Aufgrund der großen Genauigkeit, des umfassenden dynamischen Bereichs und der Sensitivität entwickelte sich die quantitative *real-time* PCR in den vergangenen Jahren zu der am meisten angewandten Methode für die Quantifizierung von mRNA-Transkripten (Bustin, 2002). Der Vorteil der sehr genauen quantitativen *real-time* PCR liegt in der präzisen Bestimmung der in der Reaktion vorhandenen amplifizierbaren Templatenukleinsäuren. Dieser Vorteil stand aber einer genauen Transkriptionsanalyse zugleich als ein zentrales Problem gegenüber, wenn von variierenden Templatemenen in verschiedenen Proben ausgegangen wird. Ein geeignetes Verfahren zur Lösung dieses Problems ist die Amplifikation der mRNA eines zweiten *housekeeping*-Gens, welches als Referenz benutzt wird. Idealerweise sollte die Expression dieses Referenzgens im Untersuchungszeitraum keinen Schwankungen unterworfen sein. Die Quantifizierung eines geeigneten Referenzgens erlaubt die Normalisierung von Unterschieden in den Mengen der zu amplifizierenden RNA oder cDNA in den einzelnen Proben. Diese Unterschiede können entstehen durch unterschiedliche Mengen an Ausgangsmaterial oder dessen Qualität und durch Unterschiede in der RNA-Präparation und cDNA-Synthese, wenn das Referenzgen den gleichen Präparationsschritten wie das Zielgen unterliegt (Radonic *et al.*, 2004). Im Allgemeinen sind Variablen während der cDNA-Synthese durch die Sensitivität und potentielle Degradierung der RNA bedingt. Deshalb müssen variierende Probenqualitäten durch die Coamplifikation eines internen Standards korrigiert werden (Lupberger *et al.*, 2002).

Die Auswahl des Referenzgens für die hier durchgeführten Untersuchungen orientierte sich an der in der Literatur publizierten allgemein üblichen Vorgehensweise. So benutzten im Jahr 1999 von den in *high impact*-Journalen veröffentlichten RNA-Transkriptionsanalysen über 90 % nur ein Referenzgen, wobei meistens die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), das β -Actin (ACTB) sowie die 18S und 28S rRNA verwendet wurden (Suzuki *et al.*, 2000).

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden Testläufe der quantitativen *real-time* PCR mit β -Actin durchgeführt. Die dabei erzielten Ergebnisse (Abb. 3.15, A) genügen aber nicht den Erfordernissen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit an die experimentelle Durchführung einer als signifikant einzuordnenden quantitativen Expressionsanalyse gestellt wurden. Das Gen war zwar in der Kontrollgruppe nahezu konstant exprimiert, unterlag aber gerade bei den SHR einer sehr starken Regulation. So war β -Actin in der Gruppe der SHR-26 im Vergleich zur SHR-04-Gruppe ungefähr doppelt so stark exprimiert (Abb. 3.15, A). Daraufhin wurden die gleichen Experimente mit GAPDH

wiederholt, um zu sehen, ob dieses *housekeeping*-Gen als Referenzgen in Frage kommen könnte. Laut Literatur (siehe oben) sollte GAPDH in jedem Altersstadium gleich exprimiert sein. Wie aber in der entsprechenden Abb. 3.15 (B) zu sehen ist, dürfte es bei SHR-26 und WKY-26 herabreguliert sein. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Entwicklungsstadien der Rattenstämme waren zwar nicht so deutlich wie bei β -Actin, führten aber in den vorliegenden Untersuchungen zum Ausschluss von GAPDH als Kontrollgen. Im Anschluss daran wurde nach alternativen Kontrollgenen gesucht. Dabei ist festzustellen, dass mittlerweile in mehreren Publikationen aufgrund von Expressionsschwankungen die prinzipielle Verwendung von β -Actin und GAPDH in Frage gestellt wurde (Zhong *et al.*, 1999; Schmittgen *et al.*, 2000; Warrington *et al.*, 2000; Hamalainen *et al.*, 2001; Deindl *et al.*, 2002), was in Übereinstimmung mit den hier vorliegenden Ergebnissen steht.

Ein weiteres Problem kam beim GAPDH dazu, wie schon bei der Abb. 3.14 erläutert. In vielen Fällen wird die Verwendung von Standard-*housekeeping*-Transkripten, wie β -Actin und GAPDH, dadurch verkompliziert, dass die kontaminierende genomische DNA in der mRNA für Pseudogene kodiert. Für das verwendete Kontrollgen sollte deshalb sichergestellt sein, dass kein Pseudogen im zu untersuchenden Genom vorliegt, wodurch in einem solchen Fall genomische DNA und cDNA vergleichbar große Amplifikationsprodukte ergeben würden. RT-PCR-Ergebnisse, bei denen Kontrollgene mit Pseudogenen im untersuchten Genom verwendet werden, müssen somit als fraglich betrachtet werden. Für das menschliche Genom sind das Vorkommen von Pseudogenen u. a. für β -Actin und GAPDH bereits beschrieben (Lion, 2001).

Des Weiteren wurde vielfach darauf hingewiesen, dass die verwendeten Kontrollgene nicht viel stärker exprimiert sein sollten als das zu untersuchende Gen. Denn in kleinen oder degradierten Proben könnte die Menge an spezifischer Zielsequenz unter dem Limit der PCR-Detektion liegen, während das Kontrollgen ein positives Amplifikationssignal zeigt, was zu falsch-positiven Ergebnissen führen würde. Manche der häufig benutzten Kontrollgene, wie β -Actin und GAPDH werden auf einem viel höheren Niveau exprimiert als andere Gene (Lion, 2001).

Da in dieser Arbeit poly(A⁺)-RNA zur Anwendung kam und die cDNA-Synthese mit oligo(dT)-Primern durchgeführt wurde, kam auch die 18S rRNA nicht als Referenzgen in Betracht. 18S rRNA wird oft als Referenz benutzt und als eine bevorzugte Kontrolle beschrieben (Thellin *et al.*, 1999; Schmittgen *et al.*, 2000; Goidin *et al.*, 2001; Bond *et al.*, 2002). Ribosomale RNA kann nicht als Referenzgen benutzt werden, wenn nur eine oligo(dT)-geprimte reverse Transkription durchgeführt oder nur mRNA aus den Geweben isoliert wurde, da die rRNA keinen poly(A)-Schwanz enthält (Radonic *et al.*, 2004).

4.3.2 Neue und konventionelle Verfahren der quantitativen Datenanalyse

Die Methoden der Datenanalyse der *real-time* PCR können in absolute und relative eingeteilt werden. Die absolute Quantifizierung schließt die Generierung einer Standardkurve ein, die auf einer bekannten Kopienanzahl basiert. Dagegen werden beim relativen Verfahren die Veränderungen im Expressionsniveau relativ zu einer Serie anderer experimenteller Proben, typischerweise der experimentellen Kontrolle, bestimmt (Livak, 1997; Winer *et al.*, 1999). Es handelt sich hierbei um die bereits angesprochenen Referenzgene. Aufgrund der Expressionsschwankungen einzelner Referenzgene, sollte mehr als ein Referenzgen in Transkriptanalysen verwendet werden, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten (Bustin, 2002; Vandesompele *et al.*, 2002).

Während die Bestimmung der exakten Kopienanzahl von der Erfahrung abhängt, ist die Erzeugung von stabilen und zuverlässigen Standards meist zeitaufwendig und erfordert eine präzise Quantifizierung (Pfaffl, 2001). Darüber hinaus vergrößert die Verwendung von fertigen, kommerziell erhältlichen Nukleinsäuren, wie Plasmiden, beträchtlich das Risiko von Kontaminationen. Deshalb ist für die meisten Forschungsanwendungen ein relatives Verfahren der Quantifizierung vorteilhafter, da es die experimentellen Proben direkt mit den Kontrollen vergleicht (Peirson *et al.*, 2003). Originalmethoden der relativen Quantifizierung beruhen auf der Annahme einer idealen Amplifikationseffizienz mit einer Verdopplung der Produkte in jedem Zyklus, was die Berechnung eines Faktors (Verhältnisses) für die Expressionsunterschiede nach der so genannten $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode erlaubt (Livak, 1997; Livak *et al.*, 2001). Dieses Verfahren wurde verfeinert, um die Amplifikationseffizienz von Zielgenen und internem Kontrollgenen mit einzuschließen, als wäre sie von einer cDNA-Standardkurve berechnet (Pfaffl, 2001). Eine alternative Methode die keine Standardkurve benötigt, berechnet die Amplifikationseffizienz vom aktuellen Anstieg der Amplifikationskurve (Liu *et al.*, 2002b). Das Hauptproblem, das diesem Verfahren gegenübersteht, liegt in der Änderung der Amplifikationseffizienz während der PCR (nachlassende Effizienz in den späteren Zyklen), da die Amplifikationsprodukte um eine DNA-Polymerase-Bindung konkurrieren (Kainz, 2000).

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde eine Form der relativen Quantifizierung verwendet, die, wie bereits in Abschnitt 2.11.4 beschrieben, als *Comparative Quantitation* in der Rotor-Gene Analysesoftware 4.6 integriert ist. Hier wird von allen Proben aus den einzelnen Amplifikationseffizienzen die Durchschnittsamplifikation mit Fehlerkoeffizient berechnet. Mit Hilfe dieser Werte können dann einzelne Proben anhand ihres relativen *take off*-Punktes verglichen werden (Herrmann [Corbett Research], 2002, unveröffentlicht). Hierbei wird die Kontrolle auf den Wert 1 gesetzt, und die relativen Unterschiede in der Expression zu dieser Kontrolle werden angegeben. Unter dem Terminus *Relative Quantification* wurde dieses mathematische Modell in ähnlicher Form von Pfaffl (2001) publiziert.

Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, ein geeignetes Referenzgen zu finden, um es als Kontrolle für die relative Quantifizierung einzusetzen. Aus diesem Grund wurde die Expression der vier Wochen alten WKY-Ratten als Bezugspunkt gewählt. Bei jeder Genquantifizierung erhielt die Gruppe der WKY-04 als interne Kontrolle den Wert 1 zugeordnet. Auf diesen Basiswert wurden die Quantifizierungsergebnisse der anderen Untersuchungsgruppen bezogen und als relative Expression der einzelnen Gene bezogen auf WKY-04 = 1 angegeben, wie es z. B. in Abb. 3.17 dargestellt ist.

4.4 Charakterisierung von Kandidatengen aus *real-time* RT-PCR

Im folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit identifizierten, differentiell exprimierten Gene aus der Tab. 3.7 und der Tab. 3.8 mittels *in silico*-Analysen und Literaturrecherchen näher charakterisiert. Der Schwerpunkt lag dabei auf bereits bekannten Zusammenhängen mit der Myokardhypertrophie oder Kardiomyopathien.

4.4.1 *Gamma sarcoglycan* (Sgcg)

Die Analyse der cDNA des Klon 12 schlagen ihn als Kandidatengen bei der Entwicklung einer myokardialen Hypertrophie vor. Der Klon 12 resultierte aus der cDNA-Subtraktion von SHR-12 nach SHR-26. Northern Blot-Analysen mit mRNAs aus den genannten Entwicklungsstadien von SHR bzw. WKY und cDNA des Klon 12 als Sonde zeigten eine Induktion des Klon 12 bei der SHR verglichen mit WKY während der Entwicklung zur Herzhypertrophie. *In silico* Analysen mit den Randsequenzen des Klon 12 zeigten eine Homologie von 99 % zum Sgcg der Ratte, 91 % zum Sgcg der Maus, 87 % zum Sgcg des Hamster und 82 % zum menschlichen SGCG.

Vier verschiedene Sarcoglycan-Gene (α , β , γ , δ) kodieren für 4 glycosylierte, transmembrane Proteine (siehe Abb. 4.1), die einen tetrameren Komplex bilden (Finsterer, 2004). Verbunden mit Sarcospan bildet dieser Komplex zusammen mit den beiden Dystroglycanen und anderen Komponenten den so genannten Dystrophin-Glycoprotein-Komplex (DGC). Die Assoziation von Dystrophin mit Dystroglycan wird durch den Sarcoglycankomplex stabilisiert, was letztendlich das Cytoskelett der Muskelzelle festigt. Es wird angenommen, dass der DGC die Muskelzelle vor kontraktionsbedingten Schädigungen schützen kann. Mutationen in einem von vier Sarcoglycan-Genen resultieren im vollständigen oder teilweisen Verlust des DGC und führen zum Krankheitsbild der autosomal-rezessiven Muskeldystrophie (Gliedergürtel-Dystrophie, LGMD) (Towbin, 1998; Bowles *et al.*, 2000; Heydemann *et al.*, 2001; Finsterer, 2004). Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass 30 % der Patienten mit Sarcoglycanopathien Abnormitäten im EKG oder der Echokardiographie aufweisen (Finsterer, 2004).

So wurde von zwei jung gestorbenen Patienten mit LGMD berichtet, die aus einer Sarcoglycan-Defizienz aufgrund von Mutationen im β -Sarcoglycan-Gen resultierte. Untersuchungen ergaben eine Reduktion aller Sarcoglycane im Herz- und Skelettmuskel und eine inkorrekte Lokalisation von α - und γ -Sarcoglycan im Herzen. Dies ist nur ein Beispiel, wie eine Mutation in einem einzelnen Sarcoglycan-Gen den gesamten Sarcoglycan-Komplex stören kann (Barresi *et al.*, 2000). Zu ähnlichen Erkenntnissen gelangten auch Untersuchungen an Mäusen, denen das δ - bzw. das γ -Sarcoglycan-Gen fehlte (Hack *et al.*, 2000).

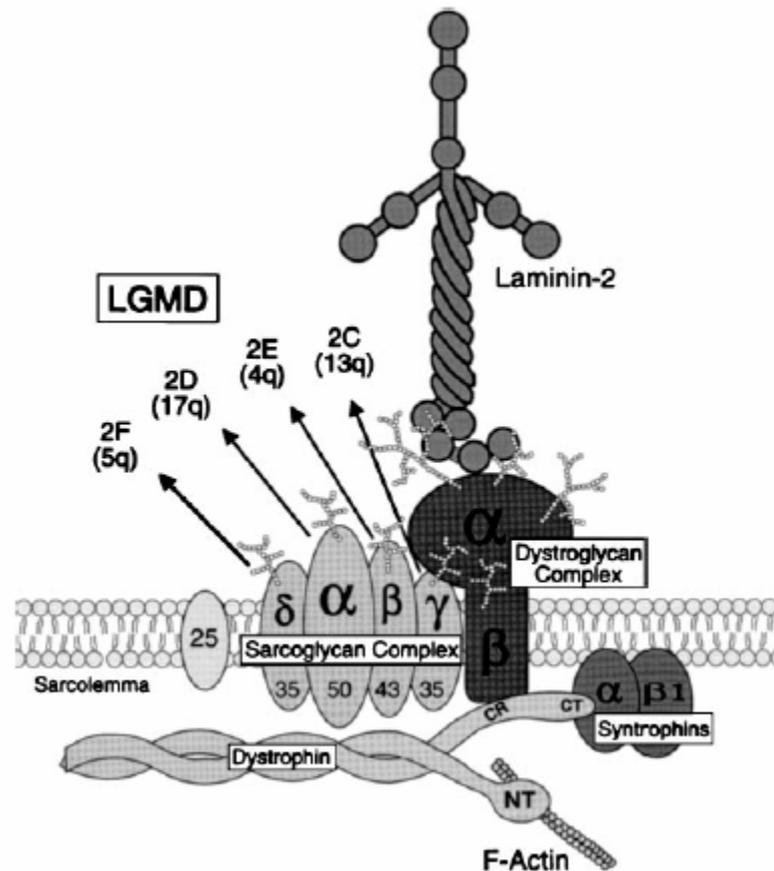


Abb. 4.1: Schematisches Modell des Dystrophin-Glycoprotein-Komplexes (Jung *et al.*, 1996)

Das Gen für γ -Sarcoglycan (Sgcg) kodiert für ein Dystrophin-assoziiertes Glycoprotein (DAGP) mit einer Größe von 35 kDa. Beim Menschen liegt das SGCG-Gen auf Chromosom 13q12 (Noguchi *et al.*, 1995). Mutationen in diesem Gen führen zum Krankheitsbild der Gliedergürtel-Dystrophie Typ 2C (LGMD2C) (Finsterer, 2004). Diese Dystrophie ist charakterisiert durch Atrophien im Beckengürtel, im Schultergürtel und Wadenhypertrophie. Betroffen sind auch die Ohren (Hörminderung) und das Herz.

Wie bereits erwähnt, ergab der Sequenzabgleich des in der vorliegenden Arbeit identifizierten cDNA-Klons 12 mit elektronischen Datenbanken eine 99 %-ige Homologie zum Gen *Sgcg* der Ratte. Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR wurde ein um 20 % reduziertes Expressionsniveau bei der SHR-04 im Vergleich zur WKY-04 gefunden. In diesem Stadium sind noch keinerlei hypertrophe Phänotypen des Herzens charakterisierbar, die Tiere sind normotensiv. Diese Daten deuten möglicherweise eine molekulare Veränderung im Genexpressionsniveau der SHR bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt an, zu dem noch keine phänotypischen Veränderungen ersichtlich sind. Zusätzlich kann dieser Expressionsunterschied auf eine Rolle bei der Entwicklung dieses Krankheitsbildes hinweisen. Diese Annahme wird durch Studien unterstützt, die zeigen, dass eine *Sgcg*-Defizienz mit Anomalien der Herzfunktion verbunden sind (Finsterer, 2004).

Real-time PCR-Analysen der cDNA des Klons 12 in SHR und WKY identifizierten eine Geninduktion während der Entwicklung einer Herzhypertrophie. Die Expression des putativen *Sgcg* in den Herzen der SHR-26 war fast zweifach erhöht im Vergleich zu den normotensiven SHR-04. Auf der einen Seite könnte das durch die Oberflächenvergrößerung der hypertrophen Herzmuskelfasern erklärt werden, die aufgrund der vergrößerten Zellmembran einen entsprechend größeren Anteil an Transmembranproteinen haben könnten. Von der anderen Seite könnte das mit der möglichen Schutzfunktion des Dystrophin-Glycoprotein-Komplex (DGC) zusammenhängen, der das Herz vor Kontraktionsschäden bewahren soll. Das Risiko einer solchen Schädigung sollte bei hypertrophen Herzen im Vergleich zu normalen Herzen durch einen erhöhten Blutdruck wesentlich größer sein.

Interessanterweise führt die Überexpression von *Sgcg* in transgenen Mäusen, die ein *Sgcg*-Transgen in ihr Genom integriert haben zu einer Muskeldystrophie mit stark reduzierter Muskelmasse (Zhu *et al.*, 2001). Das könnte damit erklärt werden, dass für den Aufbau eines funktionierenden DGC alle vier Sarcoglycane notwendig sind. Es ist davon auszugehen, dass die Veränderung der Expression nur eines einzigen Sarcoglycans im Komplex ausreichend ist, um die Expression des ganzen Komplexes zu verändern. Das heißt, die Reduktion eines Sarcoglycans könnte die Expression der anderen Sarcoglycane reduzieren und umgekehrt. Diese Annahme wird durch den gefundenen Anstieg der Transkriptionsrate der α - und β -Sarcoglycan-Gene in transgenen *Sgcg*-Mäusen (Zhu *et al.*, 2001) und durch ein vermindertes Expressionsniveau von α -, β -, δ -Sarcoglycan in *Sgcg knock out* Mäusen (Hack *et al.*, 2000) unterstützt. Im Falle einer sehr starken Unter- bzw. Überexpression eines oder mehrerer Sarcoglycane würde der gesamte Komplex gestört werden, so dass manche Elemente der DGCs niedriger bzw. höher exprimiert vorliegen, was in einem inaktiven DGC resultiert. Darüber hinaus konnte in einer Studie unter Verwendung eines heterologen Zellsystems mit Ovarienzellen des Chinesischen Hamsters gezeigt werden,

dass sich ein Sarcoglycan-Komplex nur formieren konnte, wenn alle vier Wildtyp-cDNAs der Sarcoglycane cotransfiziert wurden (Holt *et al.*, 1998). Aus diesem Grund widersprechen die Ergebnisse der mit Muskeldystrophie assoziierten Überexpression von Sgcg in transgenen Mäusen nicht den vorliegenden Beobachtungen einer erhöhten Sgcg-Expression in der SHR.

Zusammengefasst geben die in der vorliegenden Arbeit erlangten Ergebnisse einen Hinweis darauf, dass Sgcg schon im Herz der normotensiven SHR-04 reduziert exprimiert wird im Vergleich zu den WKY-04-Kontrolltieren. Das deutet auf vorhandene molekulare Veränderungen bereits im nicht-hypertrophen Herz in einer frühen Entwicklungsphase hin. Überdies kommt es während der Entwicklung zur myokardialen Hypertrophie zu einem Anstieg der Expression von Sgcg, was im Zusammenhang mit einer Schutzfunktion des DGCs gesehen werden könnte. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen und in der Literatur beschriebenen Daten weisen dem Sgcg eine potentielle Bedeutung bei der Entwicklung der Herzhypertrophie zu.

4.4.2 *Titin, transcript variant Novex-2 (Ttn)*

Das cDNA Subtraktionsscreening von SHR-12 nach SHR-26 identifizierte auch den Klon 28, welcher 2 verschiedene cDNA-Fragmente enthielt, die als Klon 28-1 und 28-2 bezeichnet wurden. Die Sequenzanalyse der cDNA 28-2 ergab eine Homologie von 81 % zur Transkriptvariante Novex-2 des humanen Titins (TTN). Daten für die Novex-2 Isoform im Rattengenom sind momentan noch nicht vorhanden. Durch Quantifizierung mittels *real-time* RT-PCR wurde gefunden, dass die Entwicklung der Herzhypertrophie mit einem Anstieg der Expression dieses Transkripts assoziiert ist.

Im menschlichen Genom ist das TTN-Gen auf Chromosom 2q31 lokalisiert und besteht aus beachtlichen 363 Exonen (Granzier *et al.*, 2004). Mutationen in verschiedenen Exonen von TTN führen zu den im Folgenden aufgeführten drei bekannten vererbaren Muskelerkrankungen. Analog zu den Mutationen der Sarcoglycane, führen die Mutationen des TTN zum Krankheitsbild der autosomal-rezessiven Form der LGMD Typ 2J (Finsterer, 2004). Außerdem sind Mutationen im TTN-Gen u. a. für die familiäre hypertrophe Kardiomyopathie verantwortlich, einer autosomal dominanten Krankheit, die durch unerklärliche linksventrikuläre Hypertrophie (in Abwesenheit einer Hypertonie) und eine untypische Anordnung der Myocyten charakterisiert ist (Ramirez *et al.*, 2004). Überdies sind Mutationen im TTN-Gen auch mit der dilatierten Kardiomyopathie assoziiert (Granzier *et al.*, 2004)

Das TTN-Gen kodiert für ein ca. 3-3,7 MDa großes filamentöses Protein der quergestreiften Muskulatur, das einerseits die Elastizität des Sarkomers kontrolliert und andererseits über Bindungsstellen für Muskel-assoziierte Proteine als Adhäsionsvorlage

für den Zusammenbau der kontraktile Einheiten in der Muskelzelle dient (Freiburg *et al.*, 2000). Die Polypeptidkette wird in ein N-terminales I-Band und ein C-terminales A-Band unterteilt (Abb. 4.2, B) und erstreckt sich mit einer Länge von ca. 1 μm von der Z- bis zur M-Linienregion über die Hälfte des Sarkomers (Tskhovrebova *et al.*, 2003). Die I-Bandregion stellt die elastische Komponente des Sarkomers dar und reagiert auf Dehnung durch eine myofibrilliäre passive Spannung.

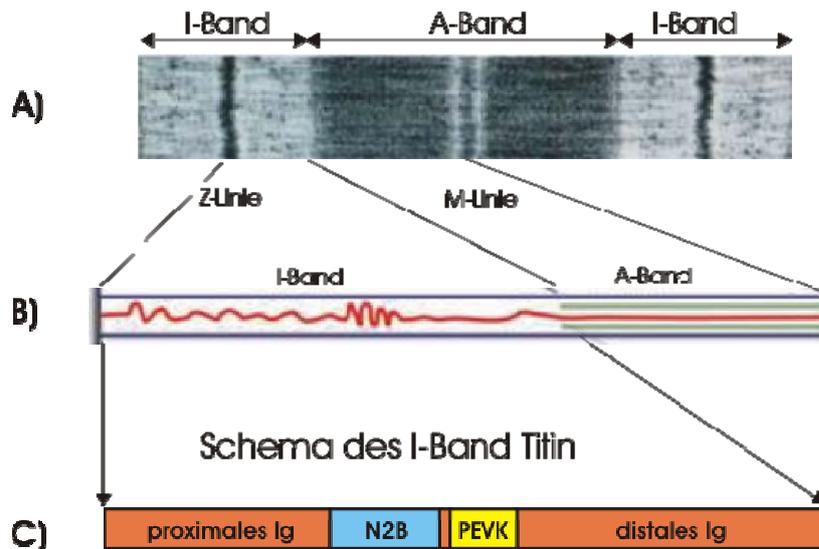


Abb. 4.2: **A,B)** Struktur und Lokalisation von Ttn im Muskelsarkomer. Ttn ist ein langes und dünnes Protein mit einer Größe von 3,0 - 3,7 Mda, erstreckt sich über die Hälfte eines Sarkomers (rote Linie in **B**) und verbindet die A-Bandregion mit der I-Bandregion. Der I-Band-Bestandteil wurde als funktionell elastische Region identifiziert. **C)** Die I-Bande von Ttn wird durch ihre vier charakteristischen Abschnitte festgelegt: Die proximale und distale Ig-Domänen (Immunglobulin-Domänen), die unikale N2B-Sequenz und die PEVK-Region.⁴

Drei verschiedene Sequenzelemente sind für die Dehnbarkeit der I-Bandregion von Ttn verantwortlich, die als seriell verbundenes Federsystem wirken (Freiburg *et al.*, 2000), (Abb. 4.2, C): 1. zwei Regionen von Tandem-Immunglobulin-Domänen (Ig), 2. eine PEVK-Region, die reich an Prolin (P), Glutamat (E), Valin (V) und Lysin (K) ist und 3. die so genannte N2B-Sequenz des kardialen Ttn. Die Variabilität in der I-Bandregion wird durch Unterschiede in der Elastizität der verschiedenen Ttn-Isoformen verursacht.

Es sind bisher viele Ttn-Varianten identifiziert worden. In diesem Zusammenhang ist die Transkriptvariante N2B als die im Herzmuskel vorherrschende Isoform zu nennen. Sie enthält im Vergleich zu der im Skelettmuskel überwiegender Isoform N2A eine

⁴ Abb. modifiziert entnommen von http://www.columbia.edu/cu/biology/faculty/fernandez/FernandezLabWebsite/learn_proteins/titin.htm

verkürzte PEVK-Region. Die in dieser Arbeit als Kandidat für die Herzhypertrophie-Entwicklung identifizierte Isoform Novex-2 ist im Herz- und Skelettmuskel vertreten und ist außer einer typischen Abfolge von 192 Aminosäuren in der I-Bandregion nahezu identisch mit der Hauptform N2B im Herz (Ramirez *et al.*, 2004).

Analog zur cDNA des Klons 12 wurde ein zweifach erniedrigtes Expressionsniveau des cDNA-Klons 28-2 bei der SHR-04 im Vergleich zur WKY-04 gefunden. Das liefert einen Hinweis darauf, dass die Herzmuskelfasern der SHR-04 zu diesem Zeitpunkt bereits einem pathologischen Veränderungsprozess unterworfen sind im Vergleich zu den Herzen der WKY in dieser Entwicklungsphase. Zusammen mit den Expressionsdaten des Klons 12 (Sgcg) deuten diese Daten auf funktionelle bzw. strukturelle Unterschiede in den Herzen von 4 Wochen alten SHR-04 und WKY-04 hin. Auf der anderen Seite wurde für Ttn bereits gezeigt, dass selbst kleine Veränderungen in der Expression seiner Transkripte im Zusammenhang mit Herzanomalien stehen. Zum Beispiel ist bei Patienten mit Herzversagen im Endstadium, das aus einer nicht-ischämischen dilatierten Kardiomyopathie resultierte, das Verhältnis der N2BA-Isoform zur N2B-Isoform im Vergleich zum gesunden Herz ($0,56 \pm 0,06$) signifikant erhöht ($0,97 \pm 0,07$) (Nagueh *et al.*, 2004). Patienten mit einem hohen Verhältnis der N2BA:N2B-Expression sind durch eine signifikant reduzierte passive Muskelsteifheit gekennzeichnet. Analog dazu sind die Herzen von Hunden mit Tachykardie-induzierter dilatierte Kardiomyopathie durch Veränderungen dieses Verhältnisses im Vergleich zu gesunden Tieren charakterisiert (Wu *et al.*, 2002). Deshalb können Veränderungen der Verhältnisse der Ttn-Isoformen im Herz in Verbindung gebracht werden mit Anomalien der Herzfunktion. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass sich das Verhältnis der Ttn-Isoformen im Herz auch in der frühen Entwicklung verändert (Opitz *et al.*, 2004). Das zeigt die Bedeutung eines bestimmten Expressionsmusters der Ttn-Isoformen für die Entwicklung. Deshalb könnte ein zweifach niedrigeres Expressionsniveau der Isoform Novex-2 bei der SHR-04, wie es in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde, auf eine fehlerhafte Entwicklung der Herzen hinweisen. Da die Ttn-Isoformen für die Elastizität der Muskelfasern verantwortlich sind, kann eine Veränderung des Novex-2 Niveaus bei der SHR-04 ein Hinweis auf Veränderungen der Elastizität der Muskelfasern geben, was in der Folge die pathologische Entwicklung des Herzens beeinflusst.

Überdies konnte in einer neueren Studie von Lange und Kollegen gezeigt werden, dass Ttn durch seine Kinasedomäne die Genexpression der *immediate-early genes*, wie z. B. c-fos, kontrollieren kann (Lange *et al.*, 2005). Diese Gene spielen eine zentrale Rolle bei der Antwort des Muskels auf hypertrophe Stimuli (einschließlich des mechanischen Stresses). Zusätzlich beschäftigte sich eine weitere Untersuchung mit der MARP-Familie (*muscle ankyrin repeat proteins*), deren Mitglieder mit ihren Ankyrin-*repeats* Bindungsstellen für Ttn enthalten und mit anderen Komponenten einen

Signalkomplex bilden. Die Autoren gehen davon aus, dass die MARPs durch Dehnung reguliert werden und dass somit die Ttn-N2A-basierten Stresssignale mit einer MARP-basierten Regulation der Muskelgenexpression verbunden werden (Miller *et al.*, 2003). Diese Funktion des Ttn bei der Signalübertragung zur Steuerung der Genexpression im Muskel würde zusätzlich auf die Bedeutung eines erniedrigten Expressionsniveau des Ttn bei der SHR-04 hinweisen, da es als Signal für die Entwicklung der Herzhypertrophie möglicherweise eine Rolle spielt.

Die Expressionsanalyse der cDNA des Klon 28-2 durch *real-time* PCR ergab zusätzlich eine Induktion während der Herzhypertrophie-Entwicklung. Das zeigte sich in einem dreifach erhöhten Niveau der cDNA des Klons 28-2 bei der SHR-26 im Vergleich zu SHR-04. Interessanterweise wurde für das SHR/WKY-Modellsystem eine Veränderung des Expressionsmusters der Ttn-Isoformen N2BA und N2B bereits von Warren und Kollegen herausgefunden (Warren *et al.*, 2003). Sie konnten nachweisen, dass der Anteil des N2BA-Ttn in den Linksherzventrikeln der Ratten mit Hypertrophie kleiner als bei den normotensiven WKY war. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass vermindertes N2BA- und vermehrtes N2B-Ttn als Antwort auf die Drucküberlast eine höhere passive Spannung bei Dehnung zur Folge haben und so die Herzleistung verbessern würde.

Collins und Kollegen berichteten anhand von Untersuchungen am Meerschweinchen-Modell, dass die Herzhypertrophie mit einem erhöhten Ttn-Niveau assoziiert ist (Collins *et al.*, 1996), wohingegen es in der späten Phase der Herzinsuffizienz zu einem Verlust von Ttn kam (Collins *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999b). Auch ein *whole-genome* Verfahren unter Verwendung von *expressed sequence tags* (ESTs) zur Charakterisierung der Gentranskription und Identifizierung neuer Gene, die in der kardialen Hypertrophie überexprimiert sind, fand unter anderem auch Ttn als potentiell Kandidatengen (Hwang *et al.*, 2000). Aus den genannten Daten kann gefolgert werden, dass die Veränderung der Expression der Ttn-Isoformen mit Myokardhypertrophie assoziiert ist. Der gefundene Anstieg der Novex-2-Expression steht im Einklang mit den genannten vorangegangenen Studien über Ttn und weist ihm eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung des hypertrophen Krankheitsbildes zu.

Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Daten, dass die Ttn-Isoform Novex-2, analog zum Gen *Sgcg*, in der SHR-04 im Vergleich zur WKY-04 reduziert ist. Das weist auf Abnormalitäten der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen bereits in den nicht-hypertrophen Herzen der SHR-04 im Vergleich zur gleichaltrigen Kontrolle hin. Darüber hinaus machen der Anstieg der Novex-2-Expression während der Entwicklung der Herzhypertrophie und die große Rolle der Ttn-Isoformen bei kardialen Funktionsstörungen das Gen Novex-2 zu einem aussichtsreichen Kandidaten für die weitere Forschung im Zusammenhang mit Herzhypertrophie.

4.4.3 *Calmodulin-binding transcription activator (Camta1)*

Unter Verwendung eines cDNA-Subtraktionscreenings von SHR-12 nach SHR-26 wurde Klon 33 gefunden. Die Northern Blot-Analyse mit cDNA vom Klon 33 als Sonde und mRNA der drei genannten Entwicklungsstadien von SHR und WKY identifizierten eine mit Herzhypertrophie assoziierte Induktion der Genexpression. Diese Daten wurden mittels *real-time* PCR-Analysen bestätigt. Sequenzanalysen der klonierten cDNA des Klon 33 wiesen eine 92 %-ige Homologie zum Gen *Camta1* (*Calmodulin-binding transcription activator 1*) der Maus und eine 84 %-ige Homologie zum menschlichen CAMTA1 auf. Für das Rattengenom ist *Camta 1* vorhergesagt.

Die CAMTA-Proteine gehören zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die als typische Merkmale u. a. Calmodulin-bindende Domänen (IQ-Motive), Ankyrin-*repeats* und eine CG-1-Domäne enthalten (Bouche *et al.*, 2002). Beim Menschen wurden zwei CAMTA-Proteine identifiziert, CAMTA1 und CAMTA2. Das ca. 6,6 kb große Gen des CAMTA1 befindet sich beim Menschen auf Chromosom 1p36.23, während *Camta1* bei der Maus und bei der Ratte auf Chromosom 4E2 bzw. 5q36 lokalisiert ist. Die Aminosäurehomologie von CAMTA1 zwischen Maus und Mensch beträgt 94,1 % (Katoh, 2003). Zurzeit ist die Funktion der Calmodulin-Bindung an CAMTA1 noch unbekannt, die im Cytosol und/ oder im Zellkern stattfinden kann.

Die grundlegende Funktion des Ca^{2+} in der Kardiomyocyte ist es, Erregungsabläufe und Kontraktion miteinander zu verbinden (Frey *et al.*, 2000). Die Veränderung der Ca^{2+} -Konzentration resultiert in der Aktivierung mehrerer Signalübertragungswege, die dann die Transkriptionsaktivität von Genen verändert (Zhang *et al.*, 2004). Viele Aktionen des Ca^{2+} werden durch seine Interaktion mit dem Bindungspartner von CAMTA-Proteinen, dem Calmodulin, vermittelt. Das Calmodulin dient als intrazellulärer Sensor für Ca^{2+} -Ionen und aktiviert selektiv bestimmte *downstream* gelegene Signalübertragungswege als Antwort auf lokale Veränderungen der Ca^{2+} -Konzentration. Es gibt gesicherte Beweise, dass Calmodulin mit der Entwicklung von Herzhypertrophie assoziiert ist (Gruver *et al.*, 1993; Colomer *et al.*, 2000). Während Calmodulin-transgene Mäuse durch kardiale Hypertrophie charakterisiert sind, können Calmodulin-Mutanten, die zwar Ca^{2+} , aber nicht *downstream* gelegene Ziele binden können, nicht mit Herzhypertrophie in Zusammenhang gebracht werden. Außerdem ist Calmodulin verantwortlich für die Aktivierung der Phosphatase Calcineurin und die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase II Isoform δ (CaMKII δ) (Ikura *et al.*, 2002; Wilkins *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004). Erhöhte Aktivitäten beider Enzyme sind mit Herzhypertrophie assoziiert, was durch die Aktivierung der Expression verschiedener Gene durch Phosphorylierung/ Dephosphorylierung von Transkriptionsfaktoren erklärt wird. Jedoch konnte für das Calmodulin selbst bisher keine Bindung von Transkriptionsfaktoren gezeigt werden, die bei der Herzhypertrophie eine Rolle spielen könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei der SHR-26 eine Induktion der Expression des putativen Camta1-Gens beobachtet. Das weist darauf hin, dass eine Erhöhung der Camta1-Expression spezifisch für die Herzhypertrophie ist. Dies ergäbe folgenden Gedankenansatz. Zum einen kann Camta1 möglicherweise mit Calmodulin interagieren. Zum anderen kann eine erhöhte Expression des putativen Camta1 in der SHR mit Herzhypertrophie in Verbindung gebracht werden. Es ließe sich also vermuten, dass Camta1 in die Kontrolle der Transkription von Genen involviert ist, die an der Ausbildung einer Myokardhypertrophie beteiligt sein könnten. Diese Kontrolle könnte direkt über Calmodulin ohne zusätzlichen Mediator erfolgen. So unterstützen die Daten dieser Arbeit die Theorie des Entdeckers der CAMTA-Proteine, welcher annimmt, dass die CAMTAs wahrscheinlich auf Ca^{2+} -Signale durch die direkte Bindung von Calmodulin reagieren (Bouche *et al.*, 2002). Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Daten einen möglichen Zusammenhang der CAMTA-Proteine mit Herzhypertrophie und einen möglichen neuen Weg der Genkontrolle durch Calmodulin.

4.4.4 *Solute carrier family 35, member F5 (Slc35f5)*

Die cDNA-Subtraktion von SHR-12 nach SHR-26 führte auch zum Klon 65. Northern Blot-Analysen der cDNA des Klon 65 identifizierten eine erhöhte transkriptionelle Aktivität bei der SHR im Vergleich zur WKY. Dieses Ergebnis konnte durch Experimente mit *real-time* PCR bestätigt werden. *In silico* Analysen der Sequenz des Klons 65 ergaben Homologien von 98 % zum Slc35f5 der Ratte, 92 % zum Slc35f5 der Maus und 85 % zum humanen SLC35F5. Das Slc35f5-Gen kodiert für einen Nukleotidzucker-Transporter, der im Golgi-Apparat und/ oder im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist (Ishida *et al.*, 2004). Diese Transporter transportieren Nukleotidzucker vom Cytosol in die Lumen derjenigen Organellen, in denen die meiste Glykokonjugat-Synthese stattfindet. Kürzlich erschienene Studien demonstrieren, dass die Mitglieder dieser Familie in die Metastasierung von Tumoren, zelluläre Immunität, Organogenese sowie Morphogenese involviert sind.

In der vorliegenden Untersuchung wurde eine Induktion der Expression des putativen Slc35f5 während der Entwicklung zur Herzhypertrophie in der SHR gefunden. Über das Gen Slc35f5 sind lediglich die Lokalisation und eine vorhergesagte Struktur des Gens bekannt. Im menschlichen Genom ist das Gen auf Chromosom 2q14.1, im Genom der Ratte auf Chromosome 13q11 und im Genom der Maus auf dem Chromosom 1E2.3 lokalisiert. Im Herz der SHR-04 ist die Expression des Slc35f5 im Vergleich zum WKY-04-Herz um das vierfache erniedrigt. Diese Befunde der vorliegenden Arbeit unterstreichen auch die zu Sgcg und Ttn erzielten Ergebnisse in der Weise, dass sich die Genexpression im Herz der SHR-04 bereits wesentlich von der der WKY-04

unterscheidet. Überdies erhöht sich die Expression des Slc35f5 während der Entwicklung zur Herzhypertrophie um das fünffache. Aufgrund der starken Hochregulation des Slc35f5 bei der SHR, nicht aber bei den WKY-Kontrolltieren, scheint es mit großer Wahrscheinlichkeit an der Ausbildung eines hypertrophen Krankheitsverlaufs beteiligt zu sein. Interessanterweise wird die Region 2q14 des menschlichen Chromosoms in der Literatur mit Bluthochdruck in Verbindung gebracht (Stoll *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2002; von Wöhrn *et al.*, 2003). Auf der anderen Seite sind QTLs in dieser Region des Chromosom 2 mit der dilatierten Kardiomyopathie assoziiert (Jung *et al.*, 1999). Außerdem konnte in der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Slc35f5 im Vergleich zu anderen Organen bei Ratte und Mensch hauptsächlich im Herz exprimiert wird (Bonath, 2003). Aufgrund der Kolo-kalisation mit QTLs und den von Bonath (2003) durchgeführten Northern-Analysen kann angenommen werden, dass es sich beim Slc35f5 um ein Herz-spezifisches Gen handelt, welches mit Bluthochdruck und dilatierte Kardiomyopathie assoziiert ist. Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass in der vorliegenden Arbeit wahrscheinlich erstmalig ein möglicher Zusammenhang zwischen der Expression des Transmembranproteins Slc35f5 und der Herzhypertrophie hergestellt werden konnte.

4.4.5 *Goliath protein (Gp)*

Klon 92 ist ebenfalls ein Resultat der cDNA-Subtraktion von SHR-12 nach SHR-26. Die Northern Blot-Analyse identifizierte eine erhöhte Expression der cDNA des Klons 92 in der SHR im Vergleich zur WKY. Die Sequenzanalyse der klonierten cDNA offenbarte eine 99 %-ige Homologie zur mRNA des Goliath-Protein der Ratte (Gp), eine 98 %-ige Homologie zur mRNA des Gp der Maus und eine 92 %-ige Homologie zur mRNA des humanen GP. Bei der Maus ist das Gen auf Chromosom 11B1.2 lokalisiert und beim Menschen auf Chromosom 5q35.3.

Das Gp-Gen in Maus, Mensch und Ratte ist dem Zinkfingerprotein G1 (Goliath-Protein) in *Drosophila* ähnlich (Bouchard *et al.*, 1993). In *Drosophila* wird G1 während der embryonalen Entwicklung im Mesoderm exprimiert, das später die inneren Strukturen, wie z. B. die Muskulatur, ausbildet. Ausgehend von diesen Daten wird angenommen, dass es sich beim Gp um einen Transkriptionsfaktor handelt, der die Genexpression während der Mesodermstrukturierung reguliert. Die Expression des Maus Gp erwies sich in myeloblastischen Zellen nach Interleukin 3 (IL3)-Entzug als hochreguliert (Baker *et al.*, 2000). Das führte zu der Annahme, dass das Gen die durch den Entzug von Wachstumsfaktoren induzierte Apoptose von Rückenmark-Vorläuferzellen regulieren könnte. Auch von der Ratte konnte das homologe Gen identifiziert werden (Guais *et al.*, 2004). Die Ratten-mRNA (1,85 kb) wird translatiert

in ein ubiquitär vorkommendes Hauptprotein von 28 kDa und drei kleinere Isoformen (50, 46, 36 kDa), die hauptsächlich in Herz, Leber, Lunge und Magen exprimiert werden. Guais *et al.* konnten bei ihren Untersuchungen an Hoden die Goliath-Beteiligung an der Apoptose nicht bestätigen. Aufgrund der mitochondrialen Lokalisation vermuten sie eine Rolle in der Energieproduktion oder bei der Geißelbewegung für die Mobilität der Spermien.

Die quantitative Expressionsanalyse durch *real-time* PCR zeigte, dass SHR-04, SHR-12, WKY-04 and WKY-12 durch ein ähnliches Expressionsniveau des putativen Gp charakterisiert sind, wohingegen bei SHR-26 und WKY-26 eine erhöhte Genexpression zu beobachten ist. Bei der SHR-26 beträgt die Erhöhung der Expression 50 % im Vergleich zu WKY-04, bei der WKY-26 lediglich 20 %. Diese Daten deuten auf einen Anstieg der Expression dieses Gens bei der hypertrophen SHR-26 im Vergleich zur normotensiven WKY-26 hin und weisen dem Gp möglicherweise eine Rolle bei der Herzhypertrophie zu. Das wird auch durch die mitochondriale Lokalisation des Gp bekräftigt, denn bekanntermaßen steht der mitochondriale Metabolismus in engem Zusammenhang mit Herzkrankheiten, inklusive der Herzhypertrophie (Huss *et al.*, 2005). Jedoch ist der Unterschied zwischen der Expression von SHR-26 und WKY-26 wegen der hohen Standardabweichung der *real-time* Ergebnisse nicht signifikant. Aufgrund dieser Tatsache kann das Gp-Gen im Moment ohne weitere Überprüfung nicht als Kandidatengen für die Herzhypertrophie vorgeschlagen werden.

4.4.6 Epidermal growth factor receptor substrate (Eps15r)

Klon 77, der als Ergebnis aus der cDNA-Subtraktion SHR-12 nach SHR-26 hervorging, zeigte im Northern Blot eine stark erhöhte Genexpression in der SHR im Vergleich zur WKY. Die Sequenzanalyse der klonierten cDNA des Klons 77 identifizierte eine Homologie von 98 % zum Eps15r der Ratte, das auf dem Chromosom 16p14 lokalisiert ist. Die Homologie zum Eps15r der Maus auf Chromosom 8 beträgt 93 %, die des EPS15R des Menschen auf Chromosom 19p13.11 beträgt 84 %.

Für das Gen Eps15r konnte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der *real-time* PCR keine differentielle Genexpression nachgewiesen werden. So konnte mittels der durchgeführten *real-time* Experimente die im Northern Blot beobachtete Erhöhung der Genexpression des putativen Eps15r nicht bestätigt werden. Da die *real-time* PCR eine sehr sensitive Quantifizierungsmethode ist, muss davon ausgegangen werden, dass Eps15r nicht mit Herzhypertrophie in Verbindung gebracht werden kann.

4.4.7 *Beta actin (Actb)*

Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen kann β -Actin in der Entwicklung der SHR als differentiell exprimiert angesehen werden (Abb. 3.15, A). Diese Ergebnisse bestätigen die der zuvor durchgeführten Northern-Analysen, bei denen das als Kontrollhybridisierung verwendete β -Actin bei SHR-26 erhöhte Signalintensitäten zeigte (siehe Abb. 3.11). Das würde auch der erhöhten Proteinbiosynthese bei der Herzhypertrophie entsprechen. Publikationen über durchgeführte Genexpressionsprofile im Zusammenhang mit der Myokardhypertrophie scheinen diese Annahme zu stützen (Hwang *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2002). Dabei ist auch eine Cohybridisierung mit kardialem und Skelett- α -Actin nicht auszuschließen, da es sich bei den Actin-Genen um eine Familie hoch konservierter Proteine handelt (Nudel *et al.*, 1983). Speziell für die SHR wurde herausgefunden, dass die hypertrophe Entwicklung des Herzens mit erhöhten Transkriptmengen für kardiales und Skelett- α -Actin assoziiert ist (Dalton *et al.*, 2000).

4.5 Charakterisierung weiterer Kandidatengene aus Northern Blots

Nicht alle der aufgrund von Sequenzhomologien gefundenen Gene aus Tab. 3.7 und Tab. 3.8 konnten im Verlauf dieser Arbeit quantitativ untersucht werden. Durch die im Folgenden beschriebenen Zusammenhänge mit Kardiomyopathien und Signalkaskaden könnten diese putativen Kandidatengene bei der pathologischen Veränderung des Herzens eine Rolle spielen. Aufgrund der Vorbefunde und Literaturangaben erscheint eine weitere Charakterisierung dieser Gene, z. B. durch quantitative *real-time* PCR, sinnvoll.

4.5.1 *Gap junction membrane channel protein alpha 1 (Gja1)*

Die cDNA-Subtraktion von SHR-04 nach SHR-12 führte zu den Klonen 32 und 33. Beide Klone waren im Northern Blot durch ein 3,5 kb großes Transkript charakterisiert. Sequenzanalysen zeigten, dass Klon 32 und Klon 33 ein nahezu identisches Insert enthalten. Diese cDNA weist eine Homologie von 97 % zum Gja1 der Ratte auf Chromosom 20q11 und eine von 84 % zum Gja1 der Maus auf Chromosom 10 auf. Die cDNA dieser Klone hat Homologie zu einer mRNA-Region von Gja1, welche im menschlichen GJA1 nicht vorhanden ist. Das Gja1-Gen kodiert für ein *gap junction*-Protein, das funktionell an der Zell-Zell-Kommunikation beteiligt ist. *Gap junction*-Proteine werden auch als Connexine bezeichnet und bilden eine Multigenfamilie von polytypischen Membrankanalproteinen (Yeager, 1998). Deren Aufbau aus vier hydrophoben Transmembrandomänen mit den N- und C-Termini auf der cytoplasmatischen Membranoberfläche soll die Abb. 4.3 b schematisch verdeutlichen. Das Hauptprotein der *gap junction* im Herz ist das 43 kDa große Connexin alpha 1, das auch als

Connexin 43 (Cx43) bezeichnet wird (Yeager, 1998; Saffitz *et al.*, 2004). Sechs Cx43 oligomerisieren zu einem Halbkanal (Connexon). Der interzelluläre Kanal wird durch Kopplung zweier entsprechender Connexonen gebildet (siehe Abb. 4.3 a).

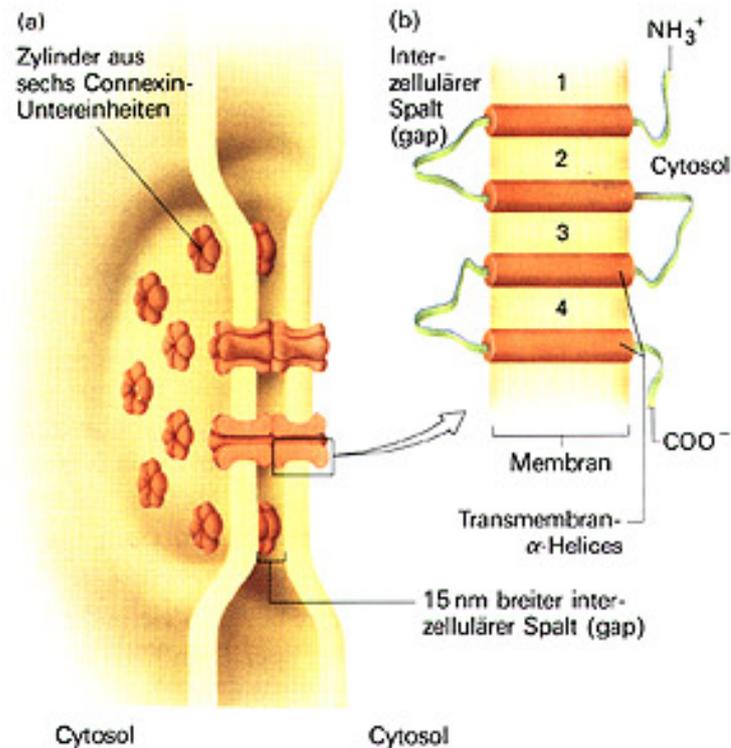


Abb. 4.3: Schematische Darstellung von gap junctions⁵

Die Kanäle des Cx43 sind in *gap junction*-Bereichen konzentriert, die wiederum in der Interkalationsscheibe lokalisiert sind (siehe Abb. 4.3 a). Die vorwiegende Bedeutung des Cx43 im Myokard liegt darin, die Weiterleitung des Aktionspotentials zwischen den Zellen zu vermitteln, um die Herzkontraktion zu synchronisieren. Herzmuskelzellen sind keine Syncytien, sondern einzelne Zellen mit Kern, die an den Enden durch Interkalationsscheiben verbunden sind, die eine Zelle an die nächste heften. Eine Umgestaltung der Interkalationsscheiben wird mit Kardiomyopathien (Ferreira-Cornwell *et al.*, 2002) und der kompensierten linksventrikulären Hypertrophie (Wang *et al.*, 1999a) in Verbindung gebracht. Ein Umbau der *gap junction*-Organisation und Veränderungen der Cx43-Expression sind typische Merkmale menschlicher Herzerkrankungen, die meist mit arrhythmischen Tendenzen einhergehen (Saffitz *et al.*, 2004; Schulz *et al.*, 2004).

⁵ Abb. entnommen von <http://www.drd.de/helmich/bio/neu/reihe1/ur15/allg/elektr.html>

Die Northern Blot-Analysen der vorliegenden Arbeit für die Klone 32 und 33 identifizierten eine erhöhte Expression des Cx43-Gens in der SHR-12 im Vergleich zur SHR-04, WKY-04 und WKY-12. Das weist darauf hin, dass die Entwicklungsphase der Herzhypertrophie mit einem Anstieg der Cx43-Expression assoziiert ist. Diese Daten entsprechen derer anderer Cx43-Studien. Kostin und Kollegen zeigten, dass die frühen Stadien der Herzhypertrophie bei Patienten durch ein erhöhtes Cx43-Niveau charakterisiert sind (Kostin *et al.*, 2004). Darüber hinaus bestätigen Untersuchungen am Meerschweinchen diese Beobachtungen (Formigli *et al.*, 2003). Jedoch ist die chronische Hypertrophie des Herzens mit einem erniedrigten Cx43-Expressionsniveau verbunden (Severs, 2001; Liu *et al.*, 2002a; Kostin *et al.*, 2003), und es wurde eine Verminderung von Cx43 in der Endphase der Herzinsuffizienz gefunden (Dhein *et al.*, 2002). Der Anstieg des Cx43 wird als kompensatorische Antwort der Kardiomyocyten auf das frühe Stadium einer ventrikulären Volumenüberlast gewertet.

Untersuchungen zum direkten Einfluss von mechanischer Belastung (pulsierende Dehnungen) der Kardiomyocyten auf die Cx43-Expression ergaben ebenfalls einen signifikanten Anstieg des Cx43-Niveaus als Folge des akuten Stimulus (Wang *et al.*, 2000; Zhuang *et al.*, 2000). So wird die Entwicklung einer akuten hypertrophen Antwort des Myokards durch mechanische Belastung durch eine Hochregulation der Cx43-Proteinexpression begleitet, die sich aber mit Fortschreiten der Hypertrophie in eine Reduktion der myokardialen Cx43-Expression umkehrte (Formigli *et al.*, 2003; Kostin *et al.*, 2004).

Da das Herz der SHR-12 im Gegensatz zu SHR-04 und den normotensiven Kontrollen durch erhöhten Blutdruck (Hypertonie) gekennzeichnet ist und folglich zu einer zunehmenden mechanischen Belastung der Myokardzellen führt, ist es durchaus möglich, dass das erhöhte Cx43-Niveau ein Resultat der etablierten Hypertonie in der SHR-12 darstellt. Von der anderen Seite kann diese veränderte Expression in der SHR-12 auch von einer chemischen Stimulation herrühren, die während der Hypertrophieentwicklung stattfindet. Studien zur *gap junction*-Umgestaltung als Antwort auf chemische Mediatoren der ventrikulären Hypertrophie haben gezeigt, dass verschiedene Wege der Signalübertragung, die u. a. Mediatoren wie Endothelin-1, Angiotensin-II und TGF- β einschließen, eine Erhöhung der Cx43-Expression auslösten (Dhein *et al.*, 2002; Saffitz *et al.*, 2004). Deswegen kann das erhöhte Expressionsniveau des Cx43 im Herz der SHR-12 mit einer erhöhten mechanischen Belastung und/ oder Veränderungen in der Signalübertragung in Verbindung gebracht werden. Zusammengefasst stimmen die in der Literatur veröffentlichten Daten zur Cx43-Expressionen in der frühen Phase der Herzhypertrophie mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein, in der eine Zunahme der Cx43-Expression während der Entwicklung einer Myokardhypertrophie in der SHR gefunden wurde.

4.5.2 *Cadherin 2, type 1, N-cadherin (Cdh2)*

Die cDNA-Subtraktion von SHR-12 nach SHR-26 generierte den Klon 66, der die cDNA mit einer Homologie von 98 % zum Cdh2 der Ratte, von 93 % zum Cdh2 der Maus und von 85 % zum menschlichen CDH2 enthielt. Das Cdh2-Gen, das im Genom von Ratte, Maus und Mensch auf Chromosom 18 lokalisiert ist, kodiert für ein klassisches Cadherin der Cadherin-Superfamilie. Das menschliche CDH2 besteht aus 16 Exons, die eine Länge von 72 kb überspannen. Das kodierte Protein ist ein Ca^{2+} -abhängiges Zell-Zell-Adhäsionsglycoprotein, bestehend aus fünf extrazellulären Cadherin-*repeats*, einer Transmembranregion und einem hoch konservierten cytoplasmatischen Schwanz. Studien zur Rolle des CDH2s bei Krankheiten, die die Zelladhäsion betreffen, identifizierten 8 Sequenzpolymorphismen (Harada *et al.*, 2002). Sowohl Cdh2 als auch Cx43 sind mit an der Verbindung der Kardiomyocyten untereinander beteiligt und sind beide in der Interkalationsscheibe der Zellen lokalisiert (Saffitz *et al.*, 2004). Während Cx43 mit der Übertragung elektrischer Signale assoziiert ist (Schulz *et al.*, 2004), scheint das Cdh2 in die Orientierung der Kardiomyocyten infolge mechanischer Dehnung verwickelt zu sein (Matsuda *et al.*, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Northern Blot-Analyse eine Induktion des putativen Cdh2 im Herz der SHR während der Herzhypertrophie-Entwicklung beobachtet (Daten nicht gezeigt). Deshalb wäre es denkbar, dass die Cdh2-Induktion in die Entwicklung der Herzhypertrophie involviert ist. Interessanterweise bewirken pulsierende Dehnungen und querverrichtete Belastungen durch Dehnung bei kultivierten Myocyten eine Hochregulation von Cdh2 und Cx43 (Zhuang *et al.*, 2000; Gopalan *et al.*, 2003). So wäre es folglich möglich, dass ein erhöhter Blutdruck im Zusammenhang mit einer sich entwickelnden Herzhypertrophie einen Anstieg der Cdh2-Expression im SHR-Herz stimulieren kann. Die vorliegende Untersuchung gibt also einen Hinweis auf den Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expression der putativen Gene Cdh2 und Cx43 und der Entwicklung einer Herzhypertrophie. Erklärbar wäre dies durch eine in gewisser Weise von einander abhängigen Funktion der beiden kodierten Proteine.

Von Interesse in diesem Zusammenhang scheint auch zu sein, dass *knock out* Mäuse für Cdh2 durch ein erniedrigtes Expressionsniveau von Cx43 gekennzeichnet sind (Kostetskii *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005). Außerdem traten beim Aufbau von Zell-Zell-Kontakten durch Kardiomyocyten in Kultur die *gap junctions* mit Cx43 nur im Anschluss an *adhesion junctions* auf (Hertig *et al.*, 1996a; Hertig *et al.*, 1996b; Kostin *et al.*, 1999; Reinecke *et al.*, 1999). Akar und Kollegen konnten bei nicht vorhandener Colokalisierung von Cx43 und Cdh2 einen Zusammenhang zum Herzversagen aufzeigen (Akar *et al.*, 2004), und die Inaktivierung der beiden Gene in *knock out* Mäusen führte zu Herzarrhythmien (Gutstein *et al.*, 2001; Kostetskii *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005). Somit kann von einer engen funktionellen Verknüpfung der *gap*- und

adhesion junctions ausgegangen werden, und auch der parallele Anstieg der Genexpression von Cx43 und Cdh2 während der Herzhypertrophie-Entwicklung ließe sich erklären. Zusammengenommen kann der in der vorliegenden Arbeit bei der SHR beobachtete Anstieg der Cdh2-Expression die gemeinsame Bedeutung von Cdh2 und Cx43 im hypertrophierenden Herz bekräftigen.

4.5.3 Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long chain (Acadl)

Für den Klon 58, der aus der cDNA-Subtraktion SHR-12 nach SHR-26 resultierte, konnte eine 96 %-ige Homologie zum Acadl-Gen, der langkettigen Acyl-Coenzym A-Dehydrogenase, der Ratte auf Chromosom 9q32 und eine 92 %-ige Homologie zum Acadl-Gen der Maus auf Chromosom 1, 27,3 cM, gefunden werden. Das von diesem Gen kodierte Protein gehört zur Familie mitochondrialer Acyl-CoA-Dehydrogenasen, die u. a. am Fettsäuremetabolismus beteiligt sind und ist eines von vier Enzymen, die den initialen Schritt der β -Oxidation geradkettiger Fettsäuren (Acadl: langkettige C8-C18 Fettsäuren) katalysieren (Sambandam *et al.*, 2002). Defekte in diesem Gen sind die Ursache der Krankheit ACADL-Defizienz auf dem humanen Chromosom 2q34-q35, die zur nichtketonen Hypoglykämie führt.

In der vorliegenden Arbeit konnte im Northern Blot (Daten nicht gezeigt) eine Induktion der Expression des putativen Acadl-Gens im Herz der SHR während der Entwicklung der Herzhypertrophie von SHR-12 nach SHR-26 beobachtet werden. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass bei der Herzhypertrophie und der Herzinsuffizienz das myokardiale Hauptenergiesubstrat von den Fettsäuren zur Glukose wechselt und es zu einer dramatischen Herunterregulation der Fettsäure-verwertenden Enzyme kommt. Für die humane ACADL wurde eine reduzierte mRNA-Expression im hypertrophierten Herzen gefunden (Sambandam *et al.*, 2002). Die Expression von Enzymen der Fettsäureoxidation war bei Menschen mit dilatierter Kardiomyopathie herunterreguliert (Sack *et al.*, 1998). Beim chronisch hypertrophierten Herz erfolgt die metabolische Regulation auf transkriptioneller Ebene: das Herz wechselt zum fetalen Genprogramm, das Glukose gegenüber Fettsäuren bevorzugt (Sack *et al.*, 2000; Taegtmeier, 2002). Es wird angenommen, dass nukleäres PPAR α (*peroxisome proliferator-activated receptor α*) eine Schlüsselrolle beim Substratwechsel im Herz übernimmt. PPAR α gehört zu einer Familie von Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktoren und ist bei der Herzhypertrophie deaktiviert und herunterreguliert. Davon betroffen sind auch die Enzyme des Fettsäuremetabolismus, wie z. B. Acadl, die von PPAR α kontrolliert werden (Young *et al.*, 2001). Deshalb ist die chronische Hypertrophie mit einer verringerten Expression von Acadl and PPAR α assoziiert. Für die Entwicklung der Herzhypertrophie in der SHR ist auch bekannt, dass in der Aorta

und den mesenterischen Arterien eine erhöhte Expression von PPAR α vorliegt (Diep *et al.*, 2001). Bei dem Anstieg der PPAR α -Expression wird eine kompensatorische Rolle während der Umgestaltung der Blutgefäße in der SHR vermutet. Eine ähnliche Bedeutung könnte dem PPAR α im Herz bei der Entwicklung der Herzhypertrophie zukommen, was sich in einer erhöhten Expression von PPAR α mit folgendem Anstieg der Acadl-Expression widerspiegeln sollte.

Ein zusätzlicher Beleg für den Zusammenhang zwischen Acadl und Myokardhypertrophie ist die chromosomale Colokalisation dieses Gens mit drei QTLs, die mit Bluthochdruck assoziiert sind:

- QTL 34 für Bluthochdruck, Kreuzung von Salz-resistenten und Salz-sensitiven Ratten, assoziiert mit Bluthochdruck (Moreno *et al.*, 2003)
- QTL 185 für Bluthochdruck, Kreuzung von Brown Norway und Dahl Salz-sensitiven Ratten, assoziiert mit Bluthochdruck (Rapp *et al.*, 1998)
- QTL 53 für Bluthochdruck, Kreuzung von Dahl Salz-sensitiven Ratten mit SHR, assoziiert mit Bluthochdruck und Herzgewicht (Garrett *et al.*, 2000)

Da die Entwicklung der Herzhypertrophie mit einer Erhöhung des Blutdrucks verbunden ist und das Gen Acadl in einer chromosomalen Region lokalisiert ist, die mit Bluthochdruck assoziiert ist, wäre eine Induktion dieses Gens während der Herzhypertrophie-Entwicklung durchaus denkbar. Auch die PPAR α -abhängige Regulation der Acadl-Transkription spricht für diese Annahme.

4.5.4 Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain) (Nol3)

Klon 75 ging aus der cDNA-Subtraktion von SHR-04 nach SHR-12 hervor und hat eine 98 %-ige Homologie zum Gen Nol3 der Ratte, das auf Chromosom 19q11 lokalisiert ist. Bei dem Genprodukt von Nol3 der Ratte handelt es sich um ein Apoptose-regulierendes Protein, das fast ausschließlich nur in myogenen Zellen exprimiert wird. Nol3 wird auch als *apoptose repressor with caspase recruitment domain* (ARC) bezeichnet, der sowohl die Aktivierung einiger Initiator-Caspasen als auch Caspase-unabhängige Ereignisse, die mit Apoptose in Beziehung stehen, blockiert (Neuss *et al.*, 2001).

Die Northern Blot-Analyse der vorliegenden Arbeit identifizierte eine Reduktion der ARC-Expression von SHR-04 nach SHR-12. Welche Rolle ARC bei der Herzfunktion spielt, wurde durch Chatterjee und Kollegen gezeigt (Chatterjee *et al.*, 2003). Daher ist bekannt, dass durch akute Ischämie und ventrikuläre Umgestaltung verursachte Apoptose ein Vorbote der Herzinsuffizienz ist. Im Hasenmodell mit Ischämie wurde eine Testgruppe über Gentransfer mit Adenovirus-ARC behandelt. Verglichen mit den Adenovirus-Null-Kontrollen konnte bei der ARC-Gruppe eine höhere Auswurfleistung

nach 4 und 6 Wochen sowie ein besserer Erhalt der linksventrikulären Geometrie mit weniger ventrikulärer Dilatation und Wandverdünnung beobachtet werden (Chatterjee *et al.*, 2003). Außerdem stieg während der Herzhypertrophie-Entwicklung von SHR-16 nach SHR-30 das Niveau der Apoptose ungefähr um das achtfache an (Diez *et al.*, 1997). Deshalb ist anzunehmen, dass die Aktivität von Apoptose-unterdrückenden Mechanismen während der Herzhypertrophie-Entwicklung reduziert ist. Zusammengefasst ließe sich die Tatsache, dass die Myokardhypertrophie mit Apoptose assoziiert ist, möglicherweise auch durch die reduzierte Expression des Apoptose-Repressors mit CARD-Domäne (ARC) erklären, wie sie in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde.

4.5.5 *Muscleblind-like 2 (Mbnl2)*

Das subtraktive cDNA-Screening von SHR-12 nach SHR-26 identifizierte den Klon 1, der folgende Sequenzhomologien aufwies: eine 99 %-ige Homologie zum Gen *Mbnl2* der Ratte (Chromosom 15q24), eine 93 %-ige Homologie zum murinen *Mbnl2* (Chromosom 14E4) und eine 88 %-ige Homologie zum humanen *MBNL2*, das auf Chromosom 13q32.1 lokalisiert ist. Das humane *MBNL2*-Gen auf Chromosom 13 kodiert für ein Zinkfinger-Protein, das dem *muscleblind B protein* von *Drosophila melanogaster* entspricht, bei der es für die Differentiation der Photorezeptoren benötigt wird. Die Funktion des Produkts des menschlichen Gens ist noch nicht geklärt. Das embryonale *muscleblind* (*mb1*) von *Drosophila* ist ein Zellkernprotein, das in der späten Phase der Embryonalentwicklung u. a. im somatischen Muskel exprimiert wird (Artero *et al.*, 1998). Das humane Protein *CHCR* mit Homologie zu *MBNL* ist mit der degenerativen Muskelerkrankung Myotone Dystrophie und der Antagonisierung der Muskeldifferentiation assoziiert (Squillace *et al.*, 2002).

Die Northern Blot-Analyse identifizierte eine Induktion des Transkripts des putativen *Mbnl2* während der Entwicklung zur Herzhypertrophie von SHR-12 nach SHR-26. Dieses Ergebnis wird durch QTL-Analysen unterstützt, da die Lokalisation des *Mbnl2* im Rattengenom mit zwei QTLs assoziiert ist, die im Zusammenhang mit Bluthochdruck stehen: QTL 190 für Blutdruck und QTL 7 für Nierengewicht (Moreno *et al.*, 2003). Da die Entwicklung der Herzhypertrophie mit einer Erhöhung des Blutdrucks einhergeht, könnte *Mbnl2* während dieser Entwicklung induziert werden, wie es die vorliegenden Ergebnisse vermuten lassen. Jedoch lässt sich der Einfluss, den eine erhöhte Expression solcher RNA-bindender Proteine wie *MBNL2* im hypertrophierten Herzen haben könnte, lässt sich momentan noch nicht abschätzen.

4.5.6 *Ribosomal protein L3 (Rpl3)*

Die cDNA-Subtraktion von SHR-12 nach SHR-26 resultierte auch in den cDNA-Klonen 36 und 69. Beide dieser Klone sind durch ein 0,8 kb großes Insert charakterisiert. Die Sequenzanalyse dieser Klone ergab, dass beide eine Homologie von 99 % zum Rpl3 der Ratte auf Chromosom 7q34 aufweisen. Die Homologie zum Rpl3 der Maus auf Chromosom 15E1 betrug 94 % und zum RPL3 des Menschen auf Chromosom 22q13 beträgt 90 %. Das Rpl3-Gen kodiert für ein ribosomales Protein der 60S Untereinheit, das zur L3P-Familie gehört und im Cytoplasma lokalisiert ist (Uechi *et al.*, 2001). Wie für Gene von ribosomalen Proteinen typisch, sind mehrere prozessierte Pseudogene im Genom verteilt. In letzter Zeit sind ribosomale Mutationen und deren Rolle bei menschlichen Krankheiten, z. B. Diamond-Blackfan-Anämie, vermehrt von Interesse und es konnten bereits konkrete Verbindungen zwischen beiden nachgewiesen werden. Beobachtungen lassen auch auf extraribosomale Funktionen schließen. Es besteht die Möglichkeit, dass Mutationen ribosomaler Proteine verschiedene Zellfunktionen stören könnten, ohne sich auf die Translation auszuwirken.

Die Northern Blot-Analyse identifizierte eine Induktion der putativen Rpl3-Expression in der SHR während der Entwicklung der Herzhypertrophie von SHR-12 nach SHR-26. Im Rattengenom ist die Lokalisation dieses Genes mit sechs QTLs assoziiert (www.ratmap.org). In diesem Zusammenhang von Interesse könnte QTL 27 sein, der spezifisch für das Herzgewicht ist, durch Kreuzung von SHR und Lewis-Ratten gefunden wurde und durch den Phänotyp hypertropher Linksherzventrikel und erhöhten Blutdruck charakterisiert wurde (Tsujiita *et al.*, 2000). Ein anderer QTL ist der für das Herzgewicht spezifische QTL 1, der durch die Kreuzung von Salz-resistenten (SR) mit Salz-sensitiven (SS) Ratten gefunden wurde und mit der Erhöhung des Herzgewichts sowie des systolischen Blutdrucks assoziiert ist (Cicila *et al.*, 1997). Darüber hinaus deuten ein Genexpressions-Profil zur chronischen, hypertrophen Phase der Herzinsuffizienz (Hoshijima *et al.*, 2002) und zur Herzhypertrophie (Hwang *et al.*, 2000) auf eine Hochregulation des Rpl3-Genes hin. Mehrere Gene ribosomaler Proteine wiesen auch bei der hypertrophen und dilatierten Kardiomyopathie eine veränderte Expression auf (Hwang *et al.*, 2002). So kann anhand der Daten der vorliegenden Arbeit, den QTL-Informationen und den veröffentlichten Genexpressionscreenings von einem Zusammenhang zwischen der Entwicklung einer Herzhypertrophie und der Induktion der Rpl3-Expression ausgegangen werden.

4.5.7 *hnRNP methyltransferase-like 2 (Hrmt112)*

Der Klon 46 wurde durch die cDNA-Subtraktion von SHR-12 nach SHR-26 erhalten. Die Sequenzanalyse dieses Klons zeigte folgende Homologien: 98 % zum Gen Hrmt112

der Ratte, das auf Chromosom 1q22 lokalisiert ist, 93 % zum murinen *Hrmt112* auf Chromosom 7 23.1 cM und 88 % zum humanen *HRMT1L2* auf Chromosom 19q13.3. Die heterogene nukleäre Ribonukleoprotein (hnRNP) Methyltransferase-gleich 2 (*HRMT1L2*) ist auch als Protein Arginin-Methyltransferase 1 (*PRMT1*) bekannt. *PRMTs* regulieren das Processing und die Reifung von mRNA durch die Veränderung der Aktivität nukleärer, RNA-bindender Proteine (hnRNPs) durch Methylierung (Pawlak *et al.*, 2000; Scorilas *et al.*, 2000). *HRMT1L2* des Menschen auf Chromosom 19q13.3 besitzt drei Isoformen mit unterschiedlicher Verteilung in den Geweben, wobei im Herz die Formen 1 und 2 vorherrschend sind (Scorilas *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit identifizierten die Northern Blot-Analysen die Induktion des putativen *Hrmt112* während der Entwicklung der Herzhypertrophie bei der SHR im Vergleich zur WKY. Die Suche nach bekannten QTLs in der Region der *Hrmt112* des Rattengenoms identifizierte 4 QTLs (www.ratmap.org):

- QTL 16 für Herzgewicht, Kreuzung von Dahl Salz-sensitiven Ratten mit SHR, assoziiert mit erhöhtem Blutdruck und Herzgewicht (Garrett *et al.*, 2003)
- QTL 96 für Blutdruck, Kreuzung von Sabra Bluthochdruck-anfällige Ratten mit Sabra Bluthochdruck-resistenten Ratten, assoziiert mit erhöhtem Blutdruck (Yagil *et al.*, 1998)
- QTL 171 für Blutdruck, Kreuzung von Brown Norway Ratten mit Dahl Salz-sensitiven Ratten, assoziiert mit erhöhtem Blutdruck (Moreno *et al.*, 2003)
- QTL 154 für Blutdruck, gefunden durch Kreuzung von SHRSP/IzmxWKY/Izm mit SHRSP/Izm Ratten, assoziiert mit erniedrigtem Blutdruck (Kato *et al.*, 2003)

Somit ist unter Verwendung der genannten QTL-Daten ein möglicher Zusammenhang zwischen *Hrmt112* und Bluthochdruck/ Herzhypertrophie herzustellen. Da die Herzhypertrophie-Entwicklung in der SHR mit erhöhtem Blutdruck verbunden ist, wäre auch eine transkriptionelle Induktion der *Hrmt112* denkbar. Zusammengefasst wird die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Induktion der *Hrmt112*-Expression während der Herzhypertrophie-Entwicklung in der SHR durch QTL-Daten und die regulatorische Funktion des kodierten Proteins gestützt.

4.5.8 *Suppressor of cytokine signaling 6 (Socs6)*

Das cDNA-Subtraktionsscreening von SHR-12 nach SHR-26 resultierte unter anderem auch in den Klonen 12-1 und 15, die eine 100 %-ige Homologie zum vorausgesagten Gen *Socs6* der Ratte, eine 96 %-ige Homologie zum *Socs6* der Maus und eine 92 %-ige Homologie zum humanen *SOCS6* aufweisen. Das *SOCS6*-Gen liegt bei Mensch, Maus und Ratte auf Chromosom 18. Das entsprechende Protein enthält eine SH2-Domäne und

eine CIS-homologe Domäne und gehört deshalb zur Familie der Cytokin-induzierten STAT-Inhibitoren (CIS, *cytokin-inducible SH2 protein*; STAT, *signal transducer and activator of transcription*), die auch als Suppressoren des Cytokin-Signalwegs (SOCS) bezeichnet werden. Für das Socs6-Protein wird eine Funktion als E3-Ubiquitin-Ligase vermutet, die ihre Zielproteine an seine SH2-Domäne bindet und sie so einer Ubiquitinierung und proteasomalen Degradation zuführt (Krebs *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Arbeit zeigten Northern Blot-Analysen eine Erhöhung der Expression des putativen Socs6 in der SHR während der Herzhypertrophie-Entwicklung. Li und Kollegen fanden in Socs6 überexprimierenden Mäusen einen schnellen Anstieg der Socs6-mRNA, der durch Insulin bedingt war (Li *et al.*, 2004). Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass Socs6 eine Rolle bei der Insulin-Signalübertragung spielen könnte. Die frühen adaptiven Veränderungen bei der Hypertrophie schließen eine erhöhte Abhängigkeit von Glukose für den Energiemetabolismus mit ein (Friehs *et al.*, 1999). Jedoch ist die Glukoseaufnahme im späten Stadium der Hypertrophie erniedrigt, wenn ventrikuläre Dilatation und Herzstörungen bereits ausgeprägt sind.

Nuutila konnte für Bluthochdruck-Patienten zeigen, dass sie im Vergleich zu gesunden Patienten durch Insulinbehandlung eine erhöhte Glukoseaufnahme hatten (Nuutila *et al.*, 1995). Jedoch konnten für SHR-12 und SHR-40 keine Unterschiede in der Glukoseaufnahme festgestellt werden im Vergleich zu den gleichaltrigen Kontrolltieren WKY-12 und WKY-40 (Natalucci *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu berichteten mehrere Studien über Insulinresistenz in der SHR (Mondon *et al.*, 1988; Gaboury *et al.*, 1991; Hulman *et al.*, 1993; Rao, 1993). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die Studiendaten von Nuutila, da die Induktion von Socs6 während der Herzhypertrophie-Entwicklung auf ein erhöhtes Niveau des Insulinsignalweges hinweisen könnte, in dessen Folge die Glukoseaufnahme ansteigt.

4.5.9 Citrate lyase beta like (Clybl)

Die cDNA-Subtraktion von SHR-12 nach SHR-26 resultierte auch im Klon 90, der folgende Sequenzhomologien aufweist: 98 % zum vorausgesagten Clybl der Ratte auf Chromosom 15q25; 94 % zum Clybl der Maus auf Chromosom 14E5; 84 % zum humanen CLYBL auf Chromosom 13q32.3. Die Northern Blot-Analyse ergab eine Induktion der transkriptionellen Expression des putativen Clybl während der Entwicklung einer Herzhypertrophie bei der SHR im Vergleich zur WKY.

Beim Clybl handelt es sich um ein relativ neues und bei Eukaryonten wenig bekanntes Gen, das Ähnlichkeit mit einem Enzym der anaeroben Citrat-Fermentation aufweist und von dem nur in einigen Bakterien berichtet wurde (Morikawa *et al.*, 2001). Das Gen

wurde zuerst bei der Maus und beim Menschen beschrieben und weist zwischen beiden Spezies eine sehr große Homologie auf. Clybl wird bei der Maus stärker in Herz, Leber und Niere exprimiert. Eine Induktion des anaeroben Stoffwechselweges der Citrat-Fermentation wäre auch unter den hypoxischen Bedingungen der Herzhypertrophie denkbar, wofür es in der Literatur keine Hinweise gibt. Deshalb könnte die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Induktion der Clybl-Expression während der Entwicklung der Herzhypertrophie in der SHR ein erster Ansatzpunkt sein, um die Funktion dieses bisher unbekanntes Proteins zu klären.

4.5.10 *Monoglyceride lipase (Mgll)*

Wie bereits in Abschnitt 3.7.2 dargestellt, konnte durch die cDNA-Subtraktion von SHR-12 nach SHR-26 Klon 28 identifiziert werden, der zwei verschiedene cDNAs enthielt. Eine dieser cDNAs (28-2) hat eine 81 %-ige Homologie zu Titin (TTN), Transkriptvariante Novex-2. Die andere cDNA (28-1) hat eine Homologie von 87 % zum Gen Mgll der Maus auf Chromosom 6D1 und eine 99 %-ige Homologie zum Mgll der Ratte auf Chromosom 4q34. Die Northern-Hybridisierung des Klon 28 mit mRNAs von SHR und WKY ergab nur eine Bande mit einer Größe von 3,5 kb. Die Größe der mRNA von Novex-2 im Rattengenom beträgt 82 kb, die von Mgll 912 bp. Da das Transkript von Novex-2 zu groß ist und seine Isolation und Identifikation spezielle Bedingungen erfordert, kann davon ausgegangen werden, dass das Hybridisierungssignal bei 3,5 kb dem Klon 28-1 zuzuordnen ist.

Die Monoglycerid-Lipase (Mgll), ein Enzym des Lipidmetabolismus, katalysiert zusammen mit der Hormon-sensitiven Lipase die Hydrolyse intrazellulärer Triglyceridspeicher von Adipocytten und anderer Zellen zu Fettsäuren und Glycerol. Zusätzlich ergänzt sie vermutlich die Lipoprotein-Lipase bei der Vervollständigung der Hydrolyse von Monoglyceriden, die aus der Spaltung von Lipoprotein-Triglyceriden resultieren (Karlsson *et al.*, 2001). Triacylglycerol (TAG) ist eine energiereiche Substanz, die von verschiedenen Körpergeweben, wie Fettgewebe und Leber, gespeichert wird. Die Nutzung gespeicherter TAG als Energieressource erfordert die Mobilisierung dieser Speicher, die eine bedeutende Rolle bei der Auswahl der Energiequellen nicht-hepatischer Gewebe, wie z. B. des Herzmuskel, spielt (Gibbons *et al.*, 2000).

Die Northern Blot-Analyse von Klon 28 identifizierte eine Induktion des Transkripts während der Herzhypertrophie-Entwicklung von SHR-12 nach SHR-26 im Vergleich zur WKY. Da anzunehmen ist, dass das 3,5 kb große Transkript im Northern Blot dem Klon 28-1 zuzuordnen ist, wäre die Beteiligung des Mgll-Gens an der Hypertrophierung des Herzens in der SHR durchaus vorstellbar. Jedoch gibt es dazu in der aktuellen Literatur keine Hinweise, die diese Idee unterstützen würden.

Zusammenfassung der Diskussion

In der vorliegenden Dissertation konnten mittels einer cDNA-Subtraktionsmethode, Northern Blot-Analysen und *real-time* RT-PCR (siehe Abb. 4.4) bekannte und unbekannte Kandidatengene für Herzhypertrophie identifiziert werden. Diese Gene transkribieren für eine Vielzahl funktionell verschiedener Proteine. Zu ihnen zählen Transkriptionsfaktoren, Cytoskelettproteine, für die Elastizität der Myocyten verantwortliche Proteine, *gap-* und *adhesion junctions*-Proteine, Transporter für Nukleotidzucker, Proteine, die am Fettsäure- und Lipidmetabolismus beteiligt sind, ribosomale Proteine, Apoptoseregulatoren und in den Insulinsignalweg verwickelte Proteine. Ein Teil der genannten Gene ist mit bekannten QTLs für erhöhten Blutdruck und Herzgewicht assoziiert. Doch nicht nur QTL-Daten unterstützen die Ergebnisse.

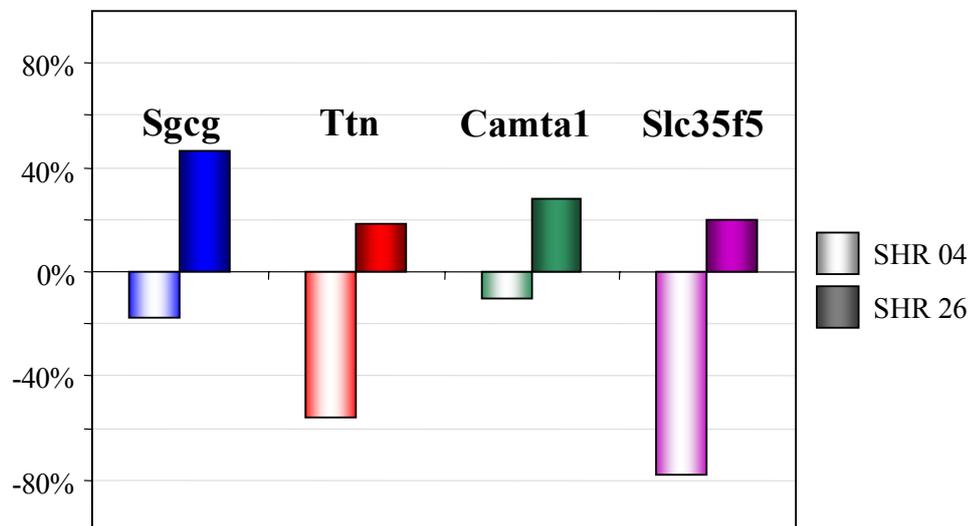


Abb. 4.4: Schematische Zusammenfassung der *real-time* RT-PCR-Ergebnisse von vier differentiell expremierten Genen in der Entwicklung der Herzhypertrophie von SHR-12 nach SHR-26. Dargestellt sind die relativen Genexpressionen als Differenz zur WKY-04-Kontrolle.

Die in der vorliegenden Arbeit durch *real-time* RT-PCR bestätigte Aktivierung der Novex-2-Isoform des Ttn während der Entwicklung der Herzhypertrophie weist auf eine weitere Ttn-Isoform hin, deren Expression sich im Krankheitsverlauf erhöht. In der Induktion der Sgcg-Expression, die durch *real-time* RT-PCR-Analysen im Herz der SHR während der Hypertrophie-Entwicklung herausgefunden wurde, könnte eine adaptive Reaktion des erkrankten Herzmuskels gesehen werden. Eine erhöhte Expression der Sarcoglycane würde die vermehrte Ausbildung von DGCs begünstigen, die dem Schutz der Herzmuskelfasern vor Kontraktionsschäden durch die mechanische Überlast der Hypertonie dienen. Ebenfalls durch *real-time* RT-PCR konnte in der vorliegenden Arbeit während der Entwicklung der Herzhypertrophie eine Induktion der

Camta1-Expression beobachtet werden. Hierbei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor unbekannter Funktion, der eine Calmodulin-bindende Domäne enthält. Im Gegensatz zu Camta1 ist für das Calmodulin schon nachgewiesen, dass es durch die Regulation verschiedener Signalwege mit Herzhypertrophie assoziiert ist. Bisher konnte allerdings keine direkte Regulation der Transkription durch das Calmodulin selbst beobachtet werden. Möglicherweise ist Camta1 das fehlende Bindeglied, über das das Calmodulin die Genexpression regelt. Durch *real-time* RT-PCR-Analysen konnte auch die Induktion des unbekanntes Gens Slc35f5 in der Hypertrophie-Entwicklung nachgewiesen werden. Über dieses Gen ist nur bekannt, dass es für einen Nukleotidzucker-Transporter kodiert. Die beobachtete Induktion wird durch die chromosomale Lokalisation dieses Gens unterstützt, da sie mit Bluthochdruck und Dilatierter Kardiomyopathie assoziiert ist.

Zusätzlich konnte auch für andere durch Northern Blot-Analysen identifizierte Kandidatengene für die Herzhypertrophie-Entwicklung ein Zusammenhang mit dieser Erkrankung aufgezeigt werden. So erwies sich der cDNA-Klon 32-33 als homolog zum Gja1-Gen, dessen Aktivierung während der Herzhypertrophie bereits beschrieben war. In dieser Arbeit wurde auch eine Hypertrophie-abhängige Induktion der Cdh2-Expression durch Northern Blot gefunden. Das entsprechende Protein ist am Aufbau von *adhesion junctions* der Kardiomyocyten beteiligt und damit mitverantwortlich für die synchronisierten Kontraktionen dieser Zellen. Die vorliegenden Daten lassen den Schluss zu, dass während der Entwicklung einer Herzhypertrophie die Zell-Zell-Kontakte verstärkt werden. Ein weiteres putatives, durch Northern Blot ermitteltes, Kandidatengen, Acadl, zeigte ebenfalls eine induzierte Expression während des genannten Krankheitsverlaufs. Das Genprodukt ist am Fettsäuremetabolismus beteiligt, der die für die Herzarbeit notwendige Energie zur Verfügung stellt. In der Literatur gibt es keine Hinweise auf eine erhöhte Expression der Acadl bei der Entwicklung der Herzhypertrophie. Jedoch wird in diesem Zusammenhang von einem Anstieg der Expression des Transkriptionsfaktors PPAR α berichtet, der die Transkription von Acadl reguliert. Außerdem wird die Rolle des Acadl bei der Herzhypertrophie, die durch erhöhten Blutdruck gekennzeichnet ist, auch durch die Colokalisation der Acadl mit drei bekannten QTLs für Bluthochdruck unterstützt. In Northern Blot-Experimenten wurde auch das Nol3 als mögliches Kandidatengen identifiziert. Bei diesem Gen handelt es sich um einen negativen Regulator der Apoptose, ein Ereignis, das mit Herzfunktionsstörungen eng verbunden ist. So wurde von einem Anstieg von apoptotischen Zellen während der Entwicklung einer Herzhypertrophie von SHR-16 nach SHR-30 berichtet. Mit der gefundenen Abnahme der Nol3-Expression in der vorliegenden Arbeit können die genannten Daten gestützt werden. Die Northern Blot-Daten weisen darauf hin, dass die zusätzliche Aktivierung des Insulinsignalweges in die Entwicklung der Herzhypertrophie involviert sein könnte, da für den positiven

Regulators dieses Signalweges, Socs6, im Krankheitsverlauf Hinweise auf eine erhöhte Expression gefunden wurden. Für einige weitere durch Northern Blot gefundene Kandidatengene wie Rpl3, Mgl1, Mbnl2 and Hrmt112 wurden bisher keine Verbindungen zur Herzhypertrophie aufgezeigt. Dass aber die Gene Rpl3, Mbnl2 und Hrmt112 eine mögliche Rolle bei der Ausbildung der Herzhypertrophie spielen könnten, wird durch die chromosomale Colokalisation dieser Gene mit QTLs für Blutdruck und Herzgewicht unterstützt. Außerdem deuten die Funktionen der Genprodukte eine denkbare Beteiligung dieser Gene an der Entwicklung der Herzhypertrophie an. So sind sie involviert in Muskelfunktionen (Mbnl2), den Lipidmetabolismus (Mgl1), die Reifung von RNA (Hrmt112) und die Proteinbiosynthese (Rpl3). Die in der vorliegenden Arbeit im Kontext mit Herzhypertrophie gefundenen unbekanntenen Kandidatengene könnten dazu beitragen, neue Einsichten auf dem Gebiet der Erforschung der Herzhypertrophie zu bekommen und die zugrunde liegenden Mechanismen besser zu verstehen. So konnten mittels der hier verwendeten Methode der subtraktiven Suppressions-Hybridisierung bereits publizierte Daten über die Verwicklung einzelner Gene in die Herzhypertrophie-Entwicklung bestätigt und neue Kandidatengene identifiziert werden.

Die Expression der übrigen, bisher nur mittels Northern-Analysen untersuchten Gene, die in der vorliegenden Arbeit als differentiell exprimiert identifiziert wurden, sollten durch quantitative Expressionsanalysen bezüglich dieses Status' verifiziert werden. Durch die Untersuchung der Kandidatengene an menschlichen Proben könnte deren Beteiligung an der Entstehung der kardialen Hypertrophie beim Menschen überprüft werden.

5 Zusammenfassung

Die Myokardhypertrophie stellt ein fortgeschrittenes Stadium einer sich progredient entwickelnden Herzinsuffizienz dar und wird durch Veränderungen im Expressionsmuster verschiedener Gene verursacht. Die Untersuchung dieses Expressionsmusters und die Identifizierung neuer Kandidatengene im Zusammenhang mit der Ausbildung der Herzhypertrophie sind notwendig für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien. Die *Spontan Hypertensive Ratte* ist ein anerkanntes Modell für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, speziell für Hypertonie und Herzhypertrophie. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Suche nach neuen, mit der Entwicklung der Herzhypertrophie assoziierten Kandidatengenen mittels einer cDNA-Subtraktionsmethode in der SHR.

Unter Verwendung der erzeugten subtraktiven Genbibliotheken, der Screeningexperimente, der Northern- und Sequenzanalysen, konnten 17 Kandidatengene identifiziert werden, die während der Entwicklung der Herzhypertrophie im Herzgewebe der SHR gegenüber der WKY-Kontrollgruppe eine erhöhte Expression zeigen, sowie 3 Gene, deren Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe verringert ist. *In silico*-Analysen der cDNA-Sequenzen dieser potentiellen Kandidaten identifizierten bereits bekannte als auch bisher unbekannte Gene. Hierbei konnten Gene gefunden werden, welche teilweise bereits im Zusammenhang mit Kardiomyopathien (Sgcg) oder Herzhypertrophie (Ttn-Novex-2, Acadl, Cdh2 und Cx43) diskutiert worden sind. Weitere Gene, wie Camta1, Nol3 und Socs6, sind funktionell in verschiedene Prozesse verwickelt, die mit Herzhypertrophie assoziiert sind. Zusätzlich wurden in der vorliegenden Arbeit Kandidatengene identifiziert, die schwer einzuordnen sind, die jedoch aufgrund ihrer Lokalisation mit bekannten QTLs für Blutdruck und Herzgewicht in einen möglichen Zusammenhang mit Herzhypertrophie gebracht werden können. Die *real-time* Analyse von 6 Kandidaten ergab eine Hochregulierung von Sgcg, Ttn-Novex-2, Camta1 und Slc5f5 im Herzgewebe der SHR während der Entwicklung zur Herzhypertrophie. Diese Daten deuten darauf hin, dass der Krankheitsverlauf mit einer verstärkten Expression der Nukleotidzucker-Transporter, der bisher in diesem Zusammenhang unbekanntem Ttn-Isoform Novex-2 sowie einem erhöhten Niveau an Dystrophin-Glycoprotein-Komplexen in den Herzmuskelfasern verbunden sein könnte. Die Ergebnisse geben auch einen Hinweis darauf, dass im Verlauf der Herzhypertrophie die Kontrolle der Gentranskription durch Calmodulin über Camta1 erfolgen könnte. Die vorliegende Arbeit unterstützt durch die Identifizierung bereits bekannter Kandidatengene der Herzhypertrophie die bisher veröffentlichten Daten, und sie kann durch die gefundenen, unbekanntem Kandidatengene helfen, neue Signal- und Regulationswege aufzuzeigen, die in den Krankheitsverlauf der Myokardhypertrophie involviert sind.

6 Literaturverzeichnis

- Akar, F.G., Spragg, D.D., Tunin, R.S., Kass, D.A. und Tomaselli, G.F. (2004) Mechanisms underlying conduction slowing and arrhythmogenesis in nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circ Res* **95**: 717-25.
- Artero, R., Prokop, A., Paricio, N., Begemann, G., Pueyo, I., Mlodzik, M., Perez-Alonso, M. und Baylies, M.K. (1998) The muscleblind gene participates in the organization of Z-bands and epidermal attachments of *Drosophila* muscles and is regulated by Dmef2. *Dev Biol* **195**: 131-43.
- Baker, S.J. und Reddy, E.P. (2000) Cloning of murine G1RP, a novel gene related to *Drosophila melanogaster* gl. *Gene* **248**: 33-40.
- Barresi, R., Di Blasi, C., Negri, T., Brugnoli, R., Vitali, A., Felisari, G., Salandi, A., Daniel, S., Cornelio, F., Morandi, L. und Mora, M. (2000) Disruption of heart sarcoglycan complex and severe cardiomyopathy caused by beta sarcoglycan mutations. *J Med Genet* **37**: 102-7.
- Bell, D., Allen, A.R., Kelso, E.J., Balasubramaniam, A. und McDermott, B.J. (2002) Induction of hypertrophic responsiveness of cardiomyocytes to neuropeptide Y in response to pressure overload. *J Pharmacol Exp Ther* **303**: 581-91.
- Bonath, I. (2003). Analyse differentiell exprimierter Gene der hypertensiven Ratte und Charakterisierung der homologen Gene bei Mensch und Maus. Diplomarbeit. Halle (S.), Fachbereich Biochemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Bond, B.C., Virley, D.J., Cairns, N.J., Hunter, A.J., Moore, G.B., Moss, S.J., Mudge, A.W., Walsh, F.S., Jazin, E. und Preece, P. (2002) The quantification of gene expression in an animal model of brain ischaemia using TaqMan real-time RT-PCR. *Brain Res Mol Brain Res* **106**: 101-16.
- Bouchard, M.L. und Cote, S. (1993) The *Drosophila melanogaster* developmental gene gl encodes a variant zinc-finger-motif protein. *Gene* **125**: 205-9.
- Bouche, N., Scharlat, A., Snedden, W., Bouchez, D. und Fromm, H. (2002) A novel family of calmodulin-binding transcription activators in multicellular organisms. *J Biol Chem* **277**: 21851-61.
- Bowles, N.E., Bowles, K.R. und Towbin, J.A. (2000) The "final common pathway" hypothesis and inherited cardiovascular disease. The role of cytoskeletal proteins in dilated cardiomyopathy. *Herz* **25**: 168-75.
- Brancaccio, M., Fratta, L., Notte, A., Hirsch, E., Poulet, R., Guazzone, S., De Acetis, M., Vecchione, C., Marino, G., Altruda, F., Silengo, L., Tarone, G. und Lembo, G. (2003) Melusin, a muscle-specific integrin beta1-interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload. *Nat Med* **9**: 68-75.
- Brilla, C.G., Janicki, J.S. und Weber, K.T. (1991) Impaired diastolic function and coronary reserve in genetic hypertension. Role of interstitial fibrosis and medial thickening of intramyocardial coronary arteries. *Circ Res* **69**: 107-15.
- Bruneau, B.G., Bao, Z.Z., Fatkin, D., Xavier-Neto, J., Georgakopoulos, D., Maguire, C.T., Berul, C.I., Kass, D.A., Kuroski-de Bold, M.L., de Bold, A.J., Conner, D.A., Rosenthal, N., Cepko, C.L., Seidman, C.E. und Seidman, J.G. (2001) Cardiomyopathy in *Irx4*-deficient mice is preceded by abnormal ventricular gene expression. *Mol Cell Biol* **21**: 1730-6.
- Bustamante, J.O., Ruknudin, A. und Sachs, F. (1991) Stretch-activated channels in heart cells: relevance to cardiac hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol* **17 Suppl 2**: S110-3.
- Bustin, S.A. (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* **29**: 23-39.
- Chatterjee, S., Bish, L.T., Jayasankar, V., Stewart, A.S., Woo, Y.J., Crow, M.T., Gardner, T.J. und Sweeney, H.L. (2003) Blocking the development of postischemic cardiomyopathy with viral gene transfer of the apoptosis repressor with caspase recruitment domain. *J Thorac Cardiovasc Surg* **125**: 1461-9.
- Christ, M., Diener, H.C., Kurth, T., Diehm, C. und Wehling, M. (1998) Secondary prevention of atherosclerosis in routine practice. *Internist (Berl)* **39**: 1080-97.

- Cicila, G.T., Dukhanina, O.I., Kurtz, T.W., Walder, R., Garrett, M.R., Dene, H. und Rapp, J.P. (1997) Blood pressure and survival of a chromosome 7 congenic strain bred from Dahl rats. *Mamm Genome* **8**: 896-902.
- Clark, J.S., Jeffs, B., Davidson, A.O., Lee, W.K., Anderson, N.H., Bihoreau, M.T., Brosnan, M.J., Devlin, A.M., Kelman, A.W., Lindpaintner, K. und Dominiczak, A.F. (1996) Quantitative trait loci in genetically hypertensive rats. Possible sex specificity. *Hypertension* **28**: 898-906.
- Clark, K.A., McElhinny, A.S., Beckerle, M.C. und Gregorio, C.C. (2002) Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 637-706.
- Clement, S., Chaponnier, C. und Gabbiani, G. (1999) A subpopulation of cardiomyocytes expressing alpha-skeletal actin is identified by a specific polyclonal antibody. *Circ Res* **85**: e51-8.
- Collins, J.F., Pawloski-Dahm, C., Davis, M.G., Ball, N., Dorn, G.W., 2nd und Walsh, R.A. (1996) The role of the cytoskeleton in left ventricular pressure overload hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol* **28**: 1435-43.
- Colomer, J.M. und Means, A.R. (2000) Chronic elevation of calmodulin in the ventricles of transgenic mice increases the autonomous activity of calmodulin-dependent protein kinase II, which regulates atrial natriuretic factor gene expression. *Mol Endocrinol* **14**: 1125-36.
- Dalton, G.R., Jones, J.V., Levi, A.J. und Levy, A. (2000) Changes in contractile protein gene expression with ageing and with captopril-induced regression of hypertrophy in the spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* **18**: 1297-306.
- Deindl, E., Boengler, K., van Royen, N. und Schaper, W. (2002) Differential expression of GAPDH and beta3-actin in growing collateral arteries. *Mol Cell Biochem* **236**: 139-46.
- Depre, C., Young, M.E., Ying, J., Ahuja, H.S., Han, Q., Garza, N., Davies, P.J. und Taegtmeyer, H. (2000) Streptozotocin-induced changes in cardiac gene expression in the absence of severe contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* **32**: 985-96.
- Dhein, S., Polontchouk, L., Salameh, A. und Haefliger, J.A. (2002) Pharmacological modulation and differential regulation of the cardiac gap junction proteins connexin 43 and connexin 40. *Biol Cell* **94**: 409-22.
- Di Nardo, P., Fiaccavento, R., Natali, A., Minieri, M., Sampaolesi, M., Fusco, A., Janmot, C., Cuda, G., Carbone, A., Rogliani, P. und Peruzzi, G. (1997) Embryonic gene expression in nonoverloaded ventricles of hereditary hypertrophic cardiomyopathic hamsters. *Lab Invest* **77**: 489-502.
- Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. und Siebert, P.D. (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 6025-30.
- Diep, Q.N. und Schiffrin, E.L. (2001) Increased expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma in blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **38**: 249-54.
- Diez, J., Panizo, A., Hernandez, M., Vega, F., Sola, I., Fortuno, M.A. und Pardo, J. (1997) Cardiomyocyte apoptosis and cardiac angiotensin-converting enzyme in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **30**: 1029-34.
- Eble, D.M., Qi, M., Waldschmidt, S., Lucchesi, P.A., Byron, K.L. und Samarel, A.M. (1998) Contractile activity is required for sarcomeric assembly in phenylephrine-induced cardiac myocyte hypertrophy. *Am J Physiol* **274**: C1226-37.
- Egeo, A., Mazzocco, M., Sotgia, F., Arrigo, P., Oliva, R., Bergonon, S., Nizetic, D., Rasore-Quartino, A. und Scartezzini, P. (1998) Identification and characterization of a new human cDNA from chromosome 21q22.3 encoding a basic nuclear protein. *Hum Genet* **102**: 289-93.
- Engelmann, G.L., Campbell, S.E. und Rakusan, K. (1996) Immediate postnatal rat heart development modified by abdominal aortic banding: analysis of gene expression. *Mol Cell Biochem* **163-164**: 47-56.
- Ferreira-Cornwell, M.C., Luo, Y., Narula, N., Lenox, J.M., Lieberman, M. und Radice, G.L. (2002) Remodeling the intercalated disc leads to cardiomyopathy in mice misexpressing cadherins in the heart. *J Cell Sci* **115**: 1623-34.
- Finsterer, J. (2004) Limb girdle muscular dystrophies. *Nervenarzt* **75**: 1153-66.
- Formigli, L., Ibbi-Manneschi, L., Perna, A.M., Pacini, A., Polidori, L., Nediani, C., Modesti, P.A., Nosi, D., Tani, A., Celli, A., Neri-Serneri, G.G., Quercioli, F. und Zecchi-Orlandini, S. (2003) Altered

- Cx43 expression during myocardial adaptation to acute and chronic volume overloading. *Histol Histopathol* **18**: 359-69.
- Freiburg, A., Trombitas, K., Hell, W., Cazorla, O., Fougerousse, F., Centner, T., Kolmerer, B., Witt, C., Beckmann, J.S., Gregorio, C.C., Granzier, H. und Labeit, S. (2000) Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circ Res* **86**: 1114-21.
- Frey, N., McKinsey, T.A. und Olson, E.N. (2000) Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nat Med* **6**: 1221-7.
- Frey, N. und Olson, E.N. (2003) CARDIAC HYPERTROPHY: The Good, the Bad, and the Ugly. *Annu Rev Physiol* **65**: 45-79.
- Friehs, I., Moran, A.M., Stamm, C., Colan, S.D., Takeuchi, K., Cao-Danh, H., Rader, C.M., McGowan, F.X. und del Nido, P.J. (1999) Impaired glucose transporter activity in pressure-overload hypertrophy is an early indicator of progression to failure. *Circulation* **100**: II187-93.
- Gaboury, C.L., Karanja, N., Holcomb, S.R., Torok, J. und McCarron, D.A. (1991) Patterns of insulin secretion and responsiveness in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* **4**: 661-6.
- Garrett, M.R., Dene, H. und Rapp, J.P. (2003) Time-course genetic analysis of albuminuria in Dahl salt-sensitive rats on low-salt diet. *J Am Soc Nephrol* **14**: 1175-87.
- Garrett, M.R., Saad, Y., Dene, H. und Rapp, J.P. (2000) Blood pressure QTL that differentiate Dahl salt-sensitive and spontaneously hypertensive rats. *Physiol Genomics* **3**: 33-8.
- Gibbons, G.F., Islam, K. und Pease, R.J. (2000) Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochim Biophys Acta* **1483**: 37-57.
- Goidin, D., Mamessier, A., Staquet, M.J., Schmitt, D. und Berthier-Vergnes, O. (2001) Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal Biochem* **295**: 17-21.
- Gopalan, S.M., Flaim, C., Bhatia, S.N., Hoshijima, M., Knoell, R., Chien, K.R., Omens, J.H. und McCulloch, A.D. (2003) Anisotropic stretch-induced hypertrophy in neonatal ventricular myocytes micropatterned on deformable elastomers. *Biotechnol Bioeng* **81**: 578-87.
- Granzier, H.L. und Labeit, S. (2004) The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res* **94**: 284-95.
- Gray, S.D. (1984) Spontaneous hypertension in the neonatal rat. A review. *Clin Exp Hypertens A* **6**: 755-81.
- Gress, T.M., Wallrapp, C., Frohme, M., Muller-Pillasch, F., Lacher, U., Friess, H., Buchler, M., Adler, G. und Hoheisel, J.D. (1997) Identification of genes with specific expression in pancreatic cancer by cDNA representational difference analysis. *Genes Chromosomes Cancer* **19**: 97-103.
- Gruver, C.L., DeMayo, F., Goldstein, M.A. und Means, A.R. (1993) Targeted developmental overexpression of calmodulin induces proliferative and hypertrophic growth of cardiomyocytes in transgenic mice. *Endocrinology* **133**: 376-88.
- Guais, A., Solhonne, B., Melaine, N., Guellaen, G. und Bulle, F. (2004) Goliath, a ring-H2 mitochondrial protein, regulated by luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin in rat leydig cells. *Biol Reprod* **70**: 204-13.
- Gurskaya, N.G., Diatchenko, L., Chenchik, A., Siebert, P.D., Khaspekov, G.L., Lukyanov, K.A., Vagner, L.L., Ermolaeva, O.D., Lukyanov, S.A. und Sverdlov, E.D. (1996) Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal Biochem* **240**: 90-7.
- Gutstein, D.E., Morley, G.E. und Fishman, G.I. (2001) Conditional gene targeting of connexin43: exploring the consequences of gap junction remodeling in the heart. *Cell Commun Adhes* **8**: 345-8.
- Hack, A.A., Lam, M.Y., Cordier, L., Shoturma, D.I., Ly, C.T., Hadhazy, M.A., Hadhazy, M.R., Sweeney, H.L. und McNally, E.M. (2000) Differential requirement for individual sarcoglycans and dystrophin in the assembly and function of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Cell Sci* **113** (Pt 14): 2535-44.

- Hamalainen, H.K., Tubman, J.C., Vikman, S., Kyrola, T., Ylikoski, E., Warrington, J.A. und Lahesmaa, R. (2001) Identification and validation of endogenous reference genes for expression profiling of T helper cell differentiation by quantitative real-time RT-PCR. *Anal Biochem* **299**: 63-70.
- Hanrath, P., vom Dahl, J., Kerber, S. und Breithardt, G. (1999) Cardiology. *Internist (Berl)* **40**: 381-5.
- Harada, H., Kimura, A., Fukino, K., Yasunaga, S., Nishi, H. und Emi, M. (2002) Genomic structure and eight novel exonic polymorphisms of the human N-cadherin gene. *J Hum Genet* **47**: 330-2.
- Harada, M., Itoh, H., Nakagawa, O., Ogawa, Y., Miyamoto, Y., Kuwahara, K., Ogawa, E., Igaki, T., Yamashita, J., Masuda, I., Yoshimasa, T., Tanaka, I., Saito, Y. und Nakao, K. (1997) Significance of ventricular myocytes and nonmyocytes interaction during cardiocyte hypertrophy: evidence for endothelin-1 as a paracrine hypertrophic factor from cardiac nonmyocytes. *Circulation* **96**: 3737-44.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. und Williams, P.M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* **6**: 986-94.
- Hempel, P., Hoch, B., Bartel, S. und Karczewski, P. (2002) Hypertrophic phenotype of cardiac calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is reversed by angiotensin converting enzyme inhibition. *Basic Res Cardiol* **97 Suppl 1**: I96-101.
- Herrmann [Corbett Research], M. (2002, unveröffentlicht) An Explanation of the Comparative Quantitation Technique Used In The Rotor-Gene Analysis Software. *unveröffentlicht*.
- Hertig, C.M., Butz, S., Koch, S., Eppenberger-Eberhardt, M., Kemler, R. und Eppenberger, H.M. (1996a) N-cadherin in adult rat cardiomyocytes in culture. II. Spatio-temporal appearance of proteins involved in cell-cell contact and communication. Formation of two distinct N-cadherin/catenin complexes. *J Cell Sci* **109 (Pt 1)**: 11-20.
- Hertig, C.M., Eppenberger-Eberhardt, M., Koch, S. und Eppenberger, H.M. (1996b) N-cadherin in adult rat cardiomyocytes in culture. I. Functional role of N-cadherin and impairment of cell-cell contact by a truncated N-cadherin mutant. *J Cell Sci* **109 (Pt 1)**: 1-10.
- Heydemann, A., Wheeler, M.T. und McNally, E.M. (2001) Cardiomyopathy in animal models of muscular dystrophy. *Curr Opin Cardiol* **16**: 211-7.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. und Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* **11**: 1026-30.
- Hilbert, P., Lindpaintner, K., Beckmann, J.S., Serikawa, T., Soubrier, F., Dubay, C., Cartwright, P., De Gouyon, B., Julier, C., Takahasi, S. und et al. (1991) Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature* **353**: 521-9.
- Holt, K.H., Lim, L.E., Straub, V., Venzke, D.P., Duclos, F., Anderson, R.D., Davidson, B.L. und Campbell, K.P. (1998) Functional rescue of the sarcoglycan complex in the BIO 14.6 hamster using delta-sarcoglycan gene transfer. *Mol Cell* **1**: 841-8.
- Holtz, J. (1992) The significance of myocardial hypertrophy in heart failure. *Z Kardiol* **81 Suppl 4**: 41-8.
- Hoshijima, M. und Chien, K.R. (2002) Mixed signals in heart failure: cancer rules. *J Clin Invest* **109**: 849-55.
- Hulman, S., Falkner, B. und Freyvogel, N. (1993) Insulin resistance in the conscious spontaneously hypertensive rat: euglycemic hyperinsulinemic clamp study. *Metabolism* **42**: 14-8.
- Huss, J.M. und Kelly, D.P. (2005) Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *J Clin Invest* **115**: 547-55.
- Hwang, D.M., Dempsey, A.A., Lee, C.Y. und Liew, C.C. (2000) Identification of differentially expressed genes in cardiac hypertrophy by analysis of expressed sequence tags. *Genomics* **66**: 1-14.
- Hwang, D.M., Dempsey, A.A., Wang, R.X., Rezvani, M., Barrans, J.D., Dai, K.S., Wang, H.Y., Ma, H., Cukerman, E., Liu, Y.Q., Gu, J.R., Zhang, J.H., Tsui, S.K., Wayne, M.M., Fung, K.P., Lee, C.Y. und Liew, C.C. (1997) A genome-based resource for molecular cardiovascular medicine: toward a compendium of cardiovascular genes. *Circulation* **96**: 4146-203.
- Hwang, J.J., Allen, P.D., Tseng, G.C., Lam, C.W., Fananapazir, L., Dzau, V.J. und Liew, C.C. (2002) Microarray gene expression profiles in dilated and hypertrophic cardiomyopathic end-stage heart failure. *Physiol Genomics* **10**: 31-44.
- Iemitsu, M., Miyauchi, T., Maeda, S., Tanabe, T., Irukayama-Tomobe, Y., Goto, K., Matsuda, M. und Yamaguchi, I. (2002) Effects of aging and subsequent exercise training on gene expression of endothelin-1 in rat heart. *Clin Sci (Lond)* **103 Suppl 48**: 152S-157S.

- Ikura, M., Osawa, M. und Ames, J.B. (2002) The role of calcium-binding proteins in the control of transcription: structure to function. *Bioessays* **24**: 625-36.
- Innes, B.A., McLaughlin, M.G., Kapuscinski, M.K., Jacob, H.J. und Harrap, S.B. (1998) Independent genetic susceptibility to cardiac hypertrophy in inherited hypertension. *Hypertension* **31**: 741-6.
- Ishida, N. und Kawakita, M. (2004) Molecular physiology and pathology of the nucleotide sugar transporter family (SLC35). *Pflugers Arch* **447**: 768-75.
- Izumiya, Y., Kim, S., Izumi, Y., Yoshida, K., Yoshiyama, M., Matsuzawa, A., Ichijo, H. und Iwao, H. (2003) Apoptosis signal-regulating kinase 1 plays a pivotal role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodeling. *Circ Res* **93**: 874-83.
- Jung, D., Duclos, F., Apostol, B., Straub, V., Lee, J.C., Allamand, V., Venzke, D.P., Sunada, Y., Moomaw, C.R., Leveille, C.J., Slaughter, C.A., Crawford, T.O., McPherson, J.D. und Campbell, K.P. (1996) Characterization of delta-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. *J Biol Chem* **271**: 32321-9.
- Jung, M., Poepping, I., Perrot, A., Ellmer, A.E., Wienker, T.F., Dietz, R., Reis, A. und Osterziel, K.J. (1999) Investigation of a family with autosomal dominant dilated cardiomyopathy defines a novel locus on chromosome 2q14-q22. *Am J Hum Genet* **65**: 1068-77.
- Jurkovicova, D., Dobesova, Z., Kunes, J. und Krizanova, O. (2001) Different expression of renin-angiotensin system components in hearts of normotensive and hypertensive rats. *Physiol Res* **50**: 35-42.
- Kainz, P. (2000) The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. *Biochim Biophys Acta* **1494**: 23-7.
- Karlsson, M., Reue, K., Xia, Y.R., Lusic, A.J., Langin, D., Tornqvist, H. und Holm, C. (2001) Exon-intron organization and chromosomal localization of the mouse monoglyceride lipase gene. *Gene* **272**: 11-8.
- Kato, N., Nabika, T., Liang, Y.Q., Mashimo, T., Inomata, H., Watanabe, T., Yanai, K., Yamori, Y., Yazaki, Y. und Sasazuki, T. (2003) Isolation of a chromosome 1 region affecting blood pressure and vascular disease traits in the stroke-prone rat model. *Hypertension* **42**: 1191-7.
- Katoh, M. (2003) Identification and characterization of FLJ10737 and CAMTA1 genes on the commonly deleted region of neuroblastoma at human chromosome 1p36.31-p36.23. *Int J Oncol* **23**: 1219-24.
- Katus, H. und Remppis, A. (2003) Beistand für schwache Herzen. <http://www.uni-heidelberg.de/presse/ruca/ruca03-2/beist.html>.
- Kostetskii, I., Li, J., Xiong, Y., Zhou, R., Ferrari, V.A., Patel, V.V., Molkentin, J.D. und Radice, G.L. (2005) Induced deletion of the N-cadherin gene in the heart leads to dissolution of the intercalated disc structure. *Circ Res* **96**: 346-54.
- Kostin, S., Dammer, S., Hein, S., Klovekorn, W.P., Bauer, E.P. und Schaper, J. (2004) Connexin 43 expression and distribution in compensated and decompensated cardiac hypertrophy in patients with aortic stenosis. *Cardiovasc Res* **62**: 426-36.
- Kostin, S., Hein, S., Bauer, E.P. und Schaper, J. (1999) Spatiotemporal development and distribution of intercellular junctions in adult rat cardiomyocytes in culture. *Circ Res* **85**: 154-67.
- Kostin, S., Rieger, M., Dammer, S., Hein, S., Richter, M., Klovekorn, W.P., Bauer, E.P. und Schaper, J. (2003) Gap junction remodeling and altered connexin43 expression in the failing human heart. *Mol Cell Biochem* **242**: 135-44.
- Kovacs, P., Voigt, B. und Kloting, I. (1997a) Alleles of the spontaneously hypertensive rat decrease blood pressure at loci on chromosomes 4 and 13. *Biochem Biophys Res Commun* **238**: 586-9.
- Kovacs, P., Voigt, B. und Kloting, I. (1997b) Novel quantitative trait loci for blood pressure and related traits on rat chromosomes 1, 10, and 18. *Biochem Biophys Res Commun* **235**: 343-8.
- Krebs, D.L., Uren, R.T., Metcalf, D., Rakar, S., Zhang, J.G., Starr, R., De Souza, D.P., Hanzinikolas, K., Eyles, J., Connolly, L.M., Simpson, R.J., Nicola, N.A., Nicholson, S.E., Baca, M., Hilton, D.J. und Alexander, W.S. (2002) SOCS-6 binds to insulin receptor substrate 4, and mice lacking the SOCS-6 gene exhibit mild growth retardation. *Mol Cell Biol* **22**: 4567-78.
- Kren, V., Pravenec, M., Lu, S., Krenova, D., Wang, J.M., Wang, N., Merriouns, T., Wong, A., St Lezin, E., Lau, D., Szpirer, C., Szpirer, J. und Kurtz, T.W. (1997) Genetic isolation of a region of

- chromosome 8 that exerts major effects on blood pressure and cardiac mass in the spontaneously hypertensive rat. *J Clin Invest* **99**: 577-81.
- Kreutz, R., Hubner, N., James, M.R., Bihoreau, M.T., Gauguier, D., Lathrop, G.M., Ganten, D. und Lindpaintner, K. (1995) Dissection of a quantitative trait locus for genetic hypertension on rat chromosome 10. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 8778-82.
- Lange, S., Xiang, F., Yakovenko, A., Vihola, A., Hackman, P., Rostkova, E., Kristensen, J., Brandmeier, B., Franzen, G., Hedberg, B., Gunnarsson, L.G., Hughes, S.M., Marchand, S., Sejersen, T., Richard, I., Edstrom, L., Ehler, E., Udd, B. und Gautel, M. (2005) The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science* **308**: 1599-603.
- Leite, M.F., Page, E. und Ambler, S.K. (1994) Regulation of ANP secretion by endothelin-1 in cultured atrial myocytes: desensitization and receptor subtype. *Am J Physiol* **267**: H2193-203.
- Levy, D., Garrison, R.J., Savage, D.D., Kannel, W.B. und Castelli, W.P. (1990) Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med* **322**: 1561-6.
- Li, J., Patel, V.V., Kostetskii, I., Xiong, Y., Chu, A.F., Jacobson, J.T., Yu, C., Morley, G.E., Molkentin, J.D. und Radice, G.L. (2005) Cardiac-specific loss of N-cadherin leads to alteration in connexins with conduction slowing and arrhythmogenesis. *Circ Res* **97**: 474-81.
- Li, L., Gronning, L.M., Anderson, P.O., Li, S., Edvardsen, K., Johnston, J., Kioussis, D., Shepherd, P.R. und Wang, P. (2004) Insulin induces SOCS-6 expression and its binding to the p85 monomer of phosphoinositide 3-kinase, resulting in improvement in glucose metabolism. *J Biol Chem* **279**: 34107-14.
- Lion, T. (2001) Current recommendations for positive controls in RT-PCR assays. *Leukemia* **15**: 1033-7.
- Liu, F. und Gutstein, D.E. (2002a) The cardiac gap junction: a potential therapeutic target in the treatment of heart disease. *Mt Sinai J Med* **69**: 421-4.
- Liu, W. und Saint, D.A. (2002b) A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal Biochem* **302**: 52-9.
- Livak, K.J. (1997) ABI Prism 7700 Sequence Detection System. User Bulletin no. 2. *PE Applied Biosystems, AB website, bulletin reference: 4303859B 777802-002*.
- Livak, K.J. und Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-8.
- Lukyanov, K.A., Matz, M.V., Bogdanova, E.A., Gurskaya, N.G. und Lukyanov, S.A. (1996) Molecule by molecule PCR amplification of complex DNA mixtures for direct sequencing: an approach to in vitro cloning. *Nucleic Acids Res* **24**: 2194-5.
- Lupberger, J., Kreuzer, K.A., Baskaynak, G., Peters, U.R., le Coutre, P. und Schmidt, C.A. (2002) Quantitative analysis of beta-actin, beta-2-microglobulin and porphobilinogen deaminase mRNA and their comparison as control transcripts for RT-PCR. *Mol Cell Probes* **16**: 25-30.
- Masuda, M., Kobayashi, K., Horiuchi, M., Terazono, H., Yoshimura, N. und Saheki, T. (1997) A novel gene suppressed in the ventricle of carnitine-deficient juvenile visceral steatosis mice. *FEBS Lett* **408**: 221-4.
- Masuzaki, H., Jingami, H., Matsuoka, N., Nakagawa, O., Ogawa, Y., Mizuno, M., Yoshimasa, Y., Yamamoto, T. und Nakao, K. (1996) Regulation of very-low-density lipoprotein receptor in hypertrophic rat heart. *Circ Res* **78**: 8-14.
- Matsuda, T., Takahashi, K., Nariai, T., Ito, T., Takatani, T., Fujio, Y. und Azuma, J. (2005) N-cadherin-mediated cell adhesion determines the plasticity for cell alignment in response to mechanical stretch in cultured cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **326**: 228-32.
- McKinsey, T.A. und Olson, E.N. (1999) Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry. *Curr Opin Genet Dev* **9**: 267-74.
- Miller, M.K., Bang, M.L., Witt, C.C., Labeit, D., Trombitas, C., Watanabe, K., Granzier, H., McElhinny, A.S., Gregorio, C.C. und Labeit, S. (2003) The muscle ankyrin repeat proteins: CARP, ankrd2/Arpp and DARP as a family of titin filament-based stress response molecules. *J Mol Biol* **333**: 951-64.

- Molkentin, J.D., Lu, J.R., Antos, C.L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S.R. und Olson, E.N. (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**: 215-28.
- Mondon, C.E. und Reaven, G.M. (1988) Evidence of abnormalities of insulin metabolism in rats with spontaneous hypertension. *Metabolism* **37**: 303-5.
- Moreno, C., Dumas, P., Kaldunski, M.L., Tonellato, P.J., Greene, A.S., Roman, R.J., Cheng, Q., Wang, Z., Jacob, H.J. und Cowley, A.W., Jr. (2003) Genomic map of cardiovascular phenotypes of hypertension in female Dahl S rats. *Physiol Genomics* **15**: 243-57.
- Morikawa, J., Nishimura, Y., Uchida, A. und Tanaka, T. (2001) Molecular cloning of novel mouse and human putative citrate lyase beta-subunit. *Biochem Biophys Res Commun* **289**: 1282-6.
- Nagueh, S.F., Shah, G., Wu, Y., Torre-Amione, G., King, N.M., Lahmers, S., Witt, C.C., Becker, K., Labeit, S. und Granzier, H.L. (2004) Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* **110**: 155-62.
- Naito, Y., Tsujino, T., Fujioka, Y., Ohyanagi, M. und Iwasaki, T. (2002) Augmented diurnal variations of the cardiac renin-angiotensin system in hypertensive rats. *Hypertension* **40**: 827-33.
- Natalucci, S., Ruggeri, P., Cogo, C.E., Picchio, V., Brunori, A. und Burattini, R. (2003) Age-related analysis of glucose metabolism in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Exp Physiol* **88**: 399-404.
- Neuss, M., Monticone, R., Lundberg, M.S., Chesley, A.T., Fleck, E. und Crow, M.T. (2001) The apoptotic regulatory protein ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain) prevents oxidant stress-mediated cell death by preserving mitochondrial function. *J Biol Chem* **276**: 33915-22.
- Noguchi, S., McNally, E.M., Ben Othmane, K., Hagiwara, Y., Mizuno, Y., Yoshida, M., Yamamoto, H., Bonnemant, C.G., Gussoni, E., Denton, P.H. und et al. (1995) Mutations in the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science* **270**: 819-22.
- Nudel, U., Zakut, R., Shani, M., Neuman, S., Levy, Z. und Yaffe, D. (1983) The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic beta-actin gene. *Nucleic Acids Res* **11**: 1759.
- Nuutila, P., Maki, M., Laine, H., Knuuti, M.J., Ruotsalainen, U., Luotolahti, M., Haaparanta, M., Solin, O., Jula, A., Koivisto, V.A. und et al. (1995) Insulin action on heart and skeletal muscle glucose uptake in essential hypertension. *J Clin Invest* **96**: 1003-9.
- Opitz, C.A., Leake, M.C., Makarenko, I., Benes, V. und Linke, W.A. (2004) Developmentally regulated switching of titin size alters myofibrillar stiffness in the perinatal heart. *Circ Res* **94**: 967-75.
- Parker, T.G. (1995) Molecular biology of myocardial hypertrophy and failure: gene expression and trophic signaling. *New Horiz* **3**: 288-300.
- Pawlak, M.R., Scherer, C.A., Chen, J., Roshon, M.J. und Ruley, H.E. (2000) Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. *Mol Cell Biol* **20**: 4859-69.
- Peirson, S.N., Butler, J.N. und Foster, R.G. (2003) Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res* **31**: e73.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.
- Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I.M., Landt, O., Siegert, W. und Nitsche, A. (2004) Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* **313**: 856-62.
- Ramirez, C.D. und Padron, R. (2004) Familial hypertrophic cardiomyopathy: genes, mutations and animal models. A review. *Invest Clin* **45**: 69-99.
- Rao, R.H. (1993) Insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. Difference in interpretation based on insulin infusion rate or on plasma insulin in glucose clamp studies. *Diabetes* **42**: 1364-71.
- Rapp, J.P., Garrett, M.R., Dene, H., Meng, H., Hoebee, B. und Lathrop, G.M. (1998) Linkage analysis and construction of a congenic strain for a blood pressure QTL on rat chromosome 9. *Genomics* **51**: 191-6.

- Razeghi, P., Essop, M.F., Huss, J.M., Abbasi, S., Manga, N. und Taegtmeier, H. (2003) Hypoxia-induced switches of myosin heavy chain iso-gene expression in rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* **303**: 1024-7.
- Reinecke, H., Zhang, M., Bartosek, T. und Murry, C.E. (1999) Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. *Circulation* **100**: 193-202.
- Rockman, H.A., Koch, W.J. und Lefkowitz, R.J. (1997) Cardiac function in genetically engineered mice with altered adrenergic receptor signaling. *Am J Physiol* **272**: H1553-9.
- Sack, M.N., Harrington, L.S., Jonassen, A.K., Mjos, O.D. und Yellon, D.M. (2000) Coordinate regulation of metabolic enzyme encoding genes during cardiac development and following carvedilol therapy in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Drugs Ther* **14**: 31-9.
- Sack, M.N. und Kelly, D.P. (1998) The energy substrate switch during development of heart failure: gene regulatory mechanisms (Review). *Int J Mol Med* **1**: 17-24.
- Sadoshima, J., Xu, Y., Slayter, H.S. und Izumo, S. (1993) Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* **75**: 977-84.
- Saffitz, J.E. und Kleber, A.G. (2004) Effects of mechanical forces and mediators of hypertrophy on remodeling of gap junctions in the heart. *Circ Res* **94**: 585-91.
- Sakai, S., Miyauchi, T., Irukayama-Tomobe, Y., Ogata, T., Goto, K. und Yamaguchi, I. (2002) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators inhibit endothelin-1-related cardiac hypertrophy in rats. *Clin Sci (Lond)* **103 Suppl 48**: 16S-20S.
- Sakamoto, A., Ono, K., Abe, M., Jasmin, G., Eki, T., Murakami, Y., Masaki, T., Toyo-oka, T. und Hanaoka, F. (1997) Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, delta-sarcoglycan, in hamster: an animal model of disrupted dystrophin-associated glycoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci US A* **94**: 13873-8.
- Sambandam, N., Lopaschuk, G.D., Brownsey, R.W. und Allard, M.F. (2002) Energy metabolism in the hypertrophied heart. *Heart Fail Rev* **7**: 161-73.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1998). *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor.
- Schmittgen, T.D. und Zakrajsek, B.A. (2000) Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* **46**: 69-81.
- Schneider, M.D., Kirshenbaum, L.A., Brand, T. und MacLellan, W.R. (1994) Control of cardiac gene transcription by fibroblast growth factors. *Mol Reprod Dev* **39**: 112-7.
- Schoenfeld, J.R., Vasser, M., Jhurani, P., Ng, P., Hunter, J.J., Ross, J., Jr., Chien, K.R. und Lowe, D.G. (1998) Distinct molecular phenotypes in murine cardiac muscle development, growth, and hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* **30**: 2269-80.
- Schulz, R. und Heusch, G. (2004) Connexin 43 and ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* **62**: 335-44.
- Schunkert, H., Weinberg, E.O., Bruckschlegel, G., Riegger, A.J. und Lorell, B.H. (1995) Alteration of growth responses in established cardiac pressure overload hypertrophy in rats with aortic banding. *J Clin Invest* **96**: 2768-74.
- Scorilas, A., Black, M.H., Talieri, M. und Diamandis, E.P. (2000) Genomic organization, physical mapping, and expression analysis of the human protein arginine methyltransferase 1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* **278**: 349-59.
- Severs, N.J. (2001) Gap junction remodeling and cardiac arrhythmogenesis: cause or coincidence? *J Cell Mol Med* **5**: 355-66.
- Sirokman, G., Humphries, D.E. und Bing, O.H. (1997) Endogenous retroviral transcripts in myocytes from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **30**: 88-93.
- Sirotkin, H., Morrow, B., Saint-Jore, B., Puech, A., Das Gupta, R., Patanjali, S.R., Skoultchi, A., Weissman, S.M. und Kucherlapati, R. (1997) Identification, characterization, and precise mapping of a human gene encoding a novel membrane-spanning protein from the 22q11 region deleted in velo-cardio-facial syndrome. *Genomics* **42**: 245-51.
- Squillace, R.M., Chenault, D.M. und Wang, E.H. (2002) Inhibition of muscle differentiation by the novel muscleblind-related protein CHCR. *Dev Biol* **250**: 218-30.

- Stoll, M., Kwitek-Black, A.E., Cowley, A.W., Jr., Harris, E.L., Harrap, S.B., Krieger, J.E., Printz, M.P., Provoost, A.P., Sassard, J. und Jacob, H.J. (2000) New target regions for human hypertension via comparative genomics. *Genome Res* **10**: 473-82.
- Sucov, H.M. und Evans, R.M. (1995) Retinoic acid and retinoic acid receptors in development. *Mol Neurobiol* **10**: 169-84.
- Sugden, P.H. und Clerk, A. (1998) Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med* **76**: 725-46.
- Suzuki, T., Higgins, P.J. und Crawford, D.R. (2000) Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques* **29**: 332-7.
- Taegtmeyer, H. (2002) Switching metabolic genes to build a better heart. *Circulation* **106**: 2043-5.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A. und Heinen, E. (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* **75**: 291-5.
- Thum, T. und Borlak, J. (2002) Testosterone, cytochrome P450, and cardiac hypertrophy. *Faseb J* **16**: 1537-49.
- Towbin, J.A. (1998) The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 131-9.
- Tskhovrebova, L. und Trinick, J. (2003) Titin: properties and family relationships. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 679-89.
- Tsujita, Y., Iwai, N., Tamaki, S., Nakamura, Y., Nishimura, M. und Kinoshita, M. (2000) Genetic mapping of quantitative trait loci influencing left ventricular mass in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**: H2062-7.
- Uechi, T., Tanaka, T. und Kenmochi, N. (2001) A complete map of the human ribosomal protein genes: assignment of 80 genes to the cytogenetic map and implications for human disorders. *Genomics* **72**: 223-30.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. und Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**: RESEARCH0034.
- von Wöern, F., Bengtsson, K., Lindgren, C.M., Orho-Melander, M., Fyhrquist, F., Lindblad, U., Rastam, L., Forsblom, C., Kanninen, T., Almgren, P., Burri, P., Katzman, P., Groop, L., Hulthén, U.L. und Melander, O. (2003) A genome wide scan for early onset primary hypertension in Scandinavians. *Hum Mol Genet* **12**: 2077-81.
- Vosberg, H.P. (1999) Genetics in cardiology. An update. *Internist (Berl)* **40**: 522-33.
- Wada, J., Kumar, A., Ota, K., Wallner, E.I., Batlle, D.C. und Kanwar, Y.S. (1997) Representational difference analysis of cDNA of genes expressed in embryonic kidney. *Kidney Int* **51**: 1629-38.
- Wang, T.L., Tseng, Y.Z. und Chang, H. (2000) Regulation of connexin 43 gene expression by cyclical mechanical stretch in neonatal rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **267**: 551-7.
- Wang, X. und Gerdes, A.M. (1999a) Chronic pressure overload cardiac hypertrophy and failure in guinea pigs: III. Intercalated disc remodeling. *J Mol Cell Cardiol* **31**: 333-43.
- Wang, X., Li, F., Campbell, S.E. und Gerdes, A.M. (1999b) Chronic pressure overload cardiac hypertrophy and failure in guinea pigs: II. Cytoskeletal remodeling. *J Mol Cell Cardiol* **31**: 319-31.
- Wang, Z. und Brown, D.D. (1991) A gene expression screen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 11505-9.
- Warren, C.M., Jordan, M.C., Roos, K.P., Krzesinski, P.R. und Greaser, M.L. (2003) Titin isoform expression in normal and hypertensive myocardium. *Cardiovasc Res* **59**: 86-94.
- Warrington, J.A., Nair, A., Mahadevappa, M. und Tsyganskaya, M. (2000) Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiol Genomics* **2**: 143-7.
- Wilkins, B.J. und Molkenin, J.D. (2004) Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* **322**: 1178-91.
- Winer, J., Jung, C.K., Shackel, I. und Williams, P.M. (1999) Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem* **270**: 41-9.

- Wu, Y., Bell, S.P., Trombitas, K., Witt, C.C., Labeit, S., LeWinter, M.M. und Granzier, H. (2002) Changes in titin isoform expression in pacing-induced cardiac failure give rise to increased passive muscle stiffness. *Circulation* **106**: 1384-9.
- Yagil, C., Sapojnikov, M., Kretz, R., Katni, G., Lindpaintner, K., Ganten, D. und Yagil, Y. (1998) Salt susceptibility maps to chromosomes 1 and 17 with sex specificity in the Sabra rat model of hypertension. *Hypertension* **31**: 119-24.
- Yamazaki, T., Komuro, I. und Yazaki, Y. (1996) Molecular aspects of mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biochem* **163-164**: 197-201.
- Yeager, M. (1998) Structure of cardiac gap junction intercellular channels. *J Struct Biol* **121**: 231-45.
- Young, M.E., Laws, F.A., Goodwin, G.W. und Taegtmeier, H. (2001) Reactivation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is associated with contractile dysfunction in hypertrophied rat heart. *J Biol Chem* **276**: 44390-5.
- Zhang, L., Summers, K.M. und West, M.J. (1996) Cosegregation of genes on chromosome 5 with heart weight and blood pressure in genetic hypertension. *Clin Exp Hypertens* **18**: 1073-87.
- Zhang, T. und Brown, J.H. (2004) Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* **63**: 476-86.
- Zhong, H. und Simons, J.W. (1999) Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* **259**: 523-6.
- Zhu, D., Huang, W., Wang, H., Xiong, M., Chu, S., Jin, L., Wang, G., He, X., Yuan, W., Qian, Y. und Zhao, G. (2002) Linkage analysis of a region on chromosome 2 with essential hypertension in Chinese families. *Chin Med J (Engl)* **115**: 654-7.
- Zhu, X., Hadhazy, M., Groh, M.E., Wheeler, M.T., Wollmann, R. und McNally, E.M. (2001) Overexpression of gamma-sarcoglycan induces severe muscular dystrophy. Implications for the regulation of Sarcoglycan assembly. *J Biol Chem* **276**: 21785-90.
- Zhuang, J., Yamada, K.A., Saffitz, J.E. und Kleber, A.G. (2000) Pulsatile stretch remodels cell-to-cell communication in cultured myocytes. *Circ Res* **87**: 316-22.

7 Abkürzungsverzeichnis

βME	β-Mercaptoethanol
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
A2-Polymerase	Advantage 2 Polymerase-Mix (50× Stammlösung)
abs	absolut
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
cM	Centi-Morgan
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH ₂ O	Aqua bidest
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGC	Dystrophin-Glycoprotein-Komplex
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
EKG	Elektrokardiogramm
EST	<i>expressed sequence tagged site</i>
et al.	<i>et alii</i> , und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LGMD	autosomal-rezessive Muskeldystrophie (Gliedergürtel-Dystrophie)
M	Molar
Mb	Megabasen
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NGF	Nerven-Wachstumsfaktor
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
OD	Optische Dichte
p.c.	<i>post coitum</i> ; nach der Befruchtung

p.n.	postnatal; nach der Geburt
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	pH-Wert
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHR-x	<i>Spontan Hypertensive Ratte</i> im Alter von x Wochen
ss	einzelsträngig
SSC	Standardzitronat
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
tRNA	Transport-Ribonukleinsäure
U	<i>unit</i> , Einheit
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WKY-x	Wistar-Kyoto-Ratte im Alter von x Wochen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -Galactosid

Halle (Saale), den 2. November 2005

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Torsten Hahn, die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Ich erkläre außerdem, diese Dissertation keiner anderen Einrichtung vorgelegt und mich nicht früher um den Doktorgrad beworben zu haben.

Torsten Hahn

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. I. Hansmann für seine Betreuung und die Möglichkeit, am Institut für Humangenetik meine Doktorarbeit anfertigen zu können.

Herrn Dr. M. Schlicker danke ich für das interessante Projekt und die Einarbeitung in die molekularbiologischen Methoden.

Bei Herrn Dr. D. Schlote möchte ich mich dafür bedanken, dass er immer als wissenschaftlicher und computertechnischer Ansprechpartner hilfreich zur Verfügung stand.

Im Zusammenhang mit den *real-time* PCR-Experimenten bedanke ich mich bei Frau Dr. A. Kehlen für die fachliche Hilfe u. Unterstützung bei der Etablierung der Methode.

Allen anderen MitarbeiterInnen des Instituts für Humangenetik danke ich für das nette Arbeitsklima. Besonders möchte ich hierbei Uta Grasemann, Sylvia Weißflog und Karin Strahl erwähnen.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie, die immer für mich da ist. Insbesondere danke ich meinen Eltern und meiner Frau Maria für ihre finanzielle und moralische Unterstützung, die diese Arbeit erst ermöglicht hat.