

**Effekte von Herzinsuffizienz und
Kardiomyopathie-assoziiierter Mutationen des Troponin I
auf die Kontraktions- und Relaxationskinetik isolierter
Kardiomyofibrillen**

Inaugural-Dissertation

zur

**Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln**

vorgelegt von

Martina Krüger

aus Freiburg i. Br.

Hundt Druck, Köln

2003

Berichterstatter:

Prof. Dr. G. Pfitzer

Institut für Vegetative Physiologie, Universität zu Köln

Prof. Dr. H. W. Klein

Institut für Biochemie, Universität zu Köln

Tag der mündlichen Prüfung:

04.11.2003

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I	Einleitung
1	Grundlagen der Herzmuskelkontraktion 1
1.1	Aufbau und Funktion des Herzens 1
1.2	Histologie des Myokards 3
1.3	Aufbau der Myofilamente 4
1.3.1	Das dicke Filament 4
1.3.2	Das dünne Filament 6
1.4	Molekulare Mechanismen der Herzmuskelkontraktion 7
1.5	Der Troponinkomplex 9
1.5.1	Troponin C 9
1.5.2	Troponin I 10
1.5.3	Troponin T 12
1.5.4	Interaktionen des Troponinkomplexes 14
2	Pathophysiologie des Herzens - Kardiomyopathien 16
2.1	Dilatative Kardiomyopathie 16
2.2	Hypertrophe Kardiomyopathie 17
2.2.1	Krankheitsbild 17
2.2.2	Molekulargenetische Ursachen 18
2.2.3	Veränderungen des humanen kardialen Troponin I (hcTnI) 21
3	Charakterisierung des Troponinkomplexes an Muskelpräparaten 25
4	Kinetische Studien an isolierten kardialen Myofibrillen 27
II	Zielsetzung der Arbeit 32
III	Material und Methoden 33
1	Expression der humanen kardialen Troponinuntereinheiten 33
1.1	Herstellung kompetenter Zellen 33
1.2	Transformation der kompetenten Zellen 34
1.3	Bakterienanzucht 34
1.3.1	Anzucht von hcTnI und hcTnC exprimierenden Bakterien 34
1.3.2	Anzucht von hcTnT exprimierenden Bakterien 35

2	Isolation der rekombinanten Troponinuntereinheiten aus <i>E.coli</i>	36
	2.1 Chromatographische Isolierung von rekombinantem hcTnI aus <i>E.coli</i>	36
	2.2 Chromatographische Isolierung von rekombinantem hcTnT aus <i>E.coli</i>	37
	2.3 Chromatographische Isolierung von rekombinantem hcTnC aus <i>E.coli</i>	38
3	Isolierung von sTn aus Skelettmuskulatur	40
4	Methoden zum Proteinnachweis	41
	4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
	4.2 Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen durch Anfärbung mit Coomassie Brillant Blue R-250®	43
	4.3 Western Blot Analyse	44
	4.4 Färbung der transferierten Proteine mit Ponceau-Rot® nach Salinovich & Montelaro (1986)	45
	4.5 Western Blot Entwicklung durch Antikörper-gebundene Peroxidase-Reaktion	45
5	Rekonstitution des hcTn Komplexes	47
6	Fluoreszenzmarkierung des Troponinkomplexes	48
7	Kraftmessungen an kardialen Myofibrillen	49
	7.1 Präparation von Kardiomyofibrillen aus Mausherzen	49
	7.2 Präparation von Kardiomyofibrillen aus menschlichen Spenderherzen	50
	7.3 Austausch des Troponinkomplexes in Kardiomyofibrillen der Maus	52
	7.4 Fixierung von Myofibrillen für die Mikroskopie	52
	7.5 Kraftmessungen an Kardiomyofibrillen	54
	7.6 Datenanalyse	56
8	Statistik	57
9	Bezugsquellennachweis	58
IV	Ergebnisse	61
1	Austausch des Troponinkomplexes an kardialen Myofibrillen der Maus	61
	1.1 Expression und Isolation der Troponin Untereinheiten aus <i>E.coli</i>	61
	1.2 Isolierung von sTn aus Kaninchen Skelettmuskel	63
	1.3 Nachweis des Troponinkomplex-Austausches an Kardiomyofibrillen	64
	1.3.1 Nachweis des Proteinaustausches mittels Western Blot Analyse	64
	1.3.2 Nachweis des Proteinaustausches mittels Fluoreszenzmarkierung	67

2	Speziesspezifische Kinetik der Kraftentwicklung und des Kraftabfalls in kardialen Myofibrillen der Maus im Vergleich zum Menschen	68
2.1	Die Kinetik der Ca^{2+} -aktivierten Kraftentwicklung in murinen und humanen kardialen Myofibrillen	68
2.2	Ca^{2+} -Sensitivität der Kraftentwicklung in murinen und humanen kardialen Myofibrillen	71
2.3	Kinetische Parameter des Kraftabfalls in murinen und humanen kardialen Myofibrillen	71
3	Funktionelle Auswirkungen des Austausches mit hcTn WT	73
3.1	Vorbemerkungen zu den Austausch-Experimenten mit rekombinantem hcTn WT	73
3.2	Auswirkungen des hcTn Austausches auf F_{\max}/CSA und $F_{\text{pass}}/\text{CSA}$ und auf die Ratenkonstante der Ca^{2+} -aktivierten Kraftentwicklung k_{ACT}	74
3.3	Auswirkungen des hcTn Austausches auf die kinetischen Parameter des Kraftabfalls in kardialen Myofibrillen der Maus	76
4	Funktionelle Auswirkungen der hcTnI R145G Mutante auf die Kraftentwicklung und Relaxation kardialer Myofibrillen der Maus	79
4.1	Vorbemerkungen zu den Austausch-Experimenten mit hcTnI Mutanten	79
4.2	Auswirkungen der hcTnI R145G Mutante auf $F_{\text{pass}}/\text{CSA}$ und F_{\max}/CSA sowie auf die Ratenkonstante der Ca^{2+} -aktivierten Kraftentwicklung k_{ACT}	79
4.3	Auswirkungen der hcTnI R145G Mutante auf die kinetischen Parameter der Relaxation	82
5	Funktionelle Auswirkungen der hcTnI G203S Mutante auf die Kraftentwicklung und Relaxation kardialer Myofibrillen der Maus	84
5.1	Auswirkungen der hcTnI G203S Mutante auf $F_{\text{pass}}/\text{CSA}$ und F_{\max}/CSA sowie auf die Ratenkonstante der Ca^{2+} -aktivierten Kraftentwicklung k_{ACT}	84
5.2	Auswirkungen der hcTnI G203S Mutante auf die kinetischen Parameter der Relaxation	86
6	Kinetische Untersuchungen an humanen pathologischen Herzproben	88
6.1	Vorbemerkungen zur Untersuchung humaner Herzproben	88
6.2	Die passive Kraft $F_{\text{pass}}/\text{CSA}$ und die maximale Ca^{2+} -induzierte Kraft F_{\max}/CSA von ICM- und DCM-Herzen	88
6.3	Die Ratenkonstante der Ca^{2+} -induzierten Kraftentwicklung k_{ACT} und des Kraftwiederanstiegs k_{TR}	90

	6.4 Die kinetischen Parameter der Relaxation in ICM- und DCM-Herzen	93
V	Diskussion	95
1	Der hcTn Austausch in kardialen Myofibrillen der Maus	95
1.1	Die kardiale Myofibrille als „Mini-Modell“ des Herzmuskels	95
1.2	Der hcTn Komplex lässt sich in kardiale Myofibrillen der Maus	97
1.3	Mit hcTn ausgetauschte kardiale Myofibrillen bleiben vollständig Ca ²⁺ -reguliert	98
1.4	HcTn Isoformen zeigen keinen Einfluss auf die speziesspezifische Kontraktions- und Relaxationskinetik kardialer Myofibrillen der Maus	99
2	Der hcTnI R145G Austausch in kardialen Myofibrillen der Maus	102
2.1	HcTnI R145 führt zu einer tendenziell erhöhten passiven Kraftentwicklung und zu einer Verminderung der maximalen Ca ²⁺ -induzierten Kraftentwicklung	102
2.2	HcTnI R145G verlangsamt die Kinetik der Ca ²⁺ -induzierten Kraftentwicklung	104
2.3	HcTnI R145G verlangsamt die Kinetik des Kraftabfalls	105
2.4	Die Mutation hcTnI R145G im transgenen Tiermodell	106
3	Der hcTnI G203S Austausch in kardialen Myofibrillen der Maus	109
3.1	HcTnI G203S führt zu keiner signifikanten Veränderung in der Kinetik der Kraftentwicklung und Relaxation	109
4	Aktivierungs- und Relaxationskinetik terminaler ICM und DCM	114
4.1	Die myofibrilläre Aktivierungs- und Relaxationskinetik humaner Spenderherzen lässt sich mit der hier vorgestellten Methode charakterisieren	113
4.2	Myofibrillen aus insuffizienten Herzen zeigen keine signifikante Beeinträchtigung von F_{\max}/CSA und F_{pass}/CSA	113
4.3	Myofibrillen aus insuffizienten Herzen haben eine erhöhte Ca ²⁺ -Sensitivität der Kraftentwicklung und deren Ratenkonstante k_{ACT}	114
4.4	Nur Myofibrillen aus ICM-Herzen zeigen eine stark beschleunigte Ratenkonstante k_{ACT} bei maximaler Ca ²⁺ -Aktivierung	116
4.5	Nur Myofibrillen aus DCM-Herzen zeigen eine veränderte lineare Phase des Kraftabfalls	117
4.6	Die exponentielle Phase der Relaxation ist nur in ICM Herzen deutlich verlangsamt	119

4.7	Viele Wege führen zu einem insuffizienten Herzen	120
5	Abschließende Betrachtungen über das Modell der isolierten kardialen Myofibrillen	123
VI	Literaturverzeichnis	125
VII	Zusammenfassung	136
VII	Summary	138
	Danksagung	
	Eidesstattliche Erklärung	
	Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis

Gängige Abkürzungen für Proteine werden im Text der Arbeit bei der ersten Erwähnung erklärt und dann als solche verwendet (z.B. hcTnI: humanes kardiales Troponin I). Im Abkürzungsverzeichnis werden lediglich die für das Verständnis dieser Arbeit zentralen Abkürzungen aufgeführt. Ebenso werden die neben den SI-Einheiten verwendeten Standardgrößen der Biochemie (z.B. μl), sowie gängige Textabkürzungen (z.B., bzw. und andere) hier nicht erläutert.

cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
AHCM	apikale hypertrophe Kardiomyopathie
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CSA	Querschnittsfläche (cross-sectional area)
cTn	kardialer Troponinkomplex (alle 3 Untereinheiten)
DCM	dilatative Kardiomyopathie
FHC	familiäre hypertrophe Kardiomyopathie
hcTnC	humanes kardiales Troponin C
hcTnI	humanes kardiales Troponin I
hcTnT	humanes kardiales Troponin T
ICM	ischämische Kardiomyopathie
MHC	schwere Ketten des Myosins (<i>myosin heavy chain</i>)
MLC	leichte Ketten des Myosins (<i>myosin light chain</i>)
MLC-2 = RLC-2	regulatorische leichte Kette des Myosins II
pCa	negativer dekadischer Logarithmus der freien Ca^{2+} -Konzentration
SERCA	Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
sTn	skelettaler Troponinkomplex (alle 3 Untereinheiten)
Tm	Tropomyosin

I Einleitung

1 Grundlagen der Herzmuskelkontraktion

1.1 Aufbau und Funktion des Herzens

Das Herz eines Säugetiers gliedert sich in zwei Hälften, das rechte und das linke Herz, welches jeweils aus einem kleineren Vorhof (Atrium) und einer größeren Kammer (Ventrikel) besteht. Die beiden Herzhälften werden sowohl im Bereich der Vorhöfe als auch der beiden Kammern durch Scheidewände voneinander getrennt. Die Innenwände der Ventrikel sind unregelmäßig gestaltet und teilweise von netzartig angeordneten Muskelfasern (Trabeculae carnae, Trabekel) überzogen. Zudem ragen kegelförmige Muskelvorsprünge, die sogenannten Papillarmuskeln, in das Lumen vor. Durch die unidirektionale Ausrichtung der Sarkomere in den Trabekeln und Papillarmuskeln sind Faserpräparationen aus diesen Bereichen besonders gut für definierte Kraftmessungen unter isometrischen Bedingungen geeignet.

Das Herz arbeitet dabei nach dem Prinzip einer Saugpumpe, die Blutbewegung wird durch rhythmische Erschlaffung (Relaxation) und Anspannung (Kontraktion) der Herzmuskulatur bewirkt. Das rhythmische Öffnen und Schließen der Herzklappen bestimmt dabei die Richtung des Blutflusses. Während der Kontraktionsphase (Systole) werden Ca^{2+} -Ionen aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum ins Zytosol freigesetzt. Dabei steigt die Konzentration des zytosolischen Ca^{2+} von 10^{-7} mol/l auf ca. 10^{-6} bis 10^{-5} mol/l an, was zur Kontraktion der Myofilamente führt. Während der Erschlaffungsphase des Herzmuskels (Diastole) werden diese Ca^{2+} -Ionen über spezifische Ionentransporter wieder aus dem Zytosol entfernt, die Myofilamente relaxieren. Der regulierte Ablauf der Kontraktions- und Relaxationszyklen wird durch die Erregungsausbreitung über den Herzmuskel gesteuert. Abb. I-1 zeigt einen typischen Druckverlauf des linken Ventrikels. Nach Erregung des Ventrikelmyokards steigt der intraventrikuläre Druck zunächst isovolumetrisch an. Die Anspannungsphase endet, wenn der Ventrikeldruck den Druck in der Aorta überschreitet und sich die Aortenklappe öffnet (Abb. I-1 A.). Dann beginnt die Austreibungsphase, die zunächst durch einen weiteren Druckanstieg in Ventrikel und Aorta charakterisiert ist. Sie endet, wenn der Ventrikeldruck den Aortendruck wieder unterschreitet, was zum Schließen der Aortenklappen führt (Abb. I-1

B.). Der Austreibungsphase schließt sich eine isovolumentrische Erschlaffungsphase an. Während dieser nimmt der Ventrikeldruck rasch ab, unterschreitet den Vorhofdruck und die Füllungsphase beginnt [Klinke R. & Silbernagel S.,1996].

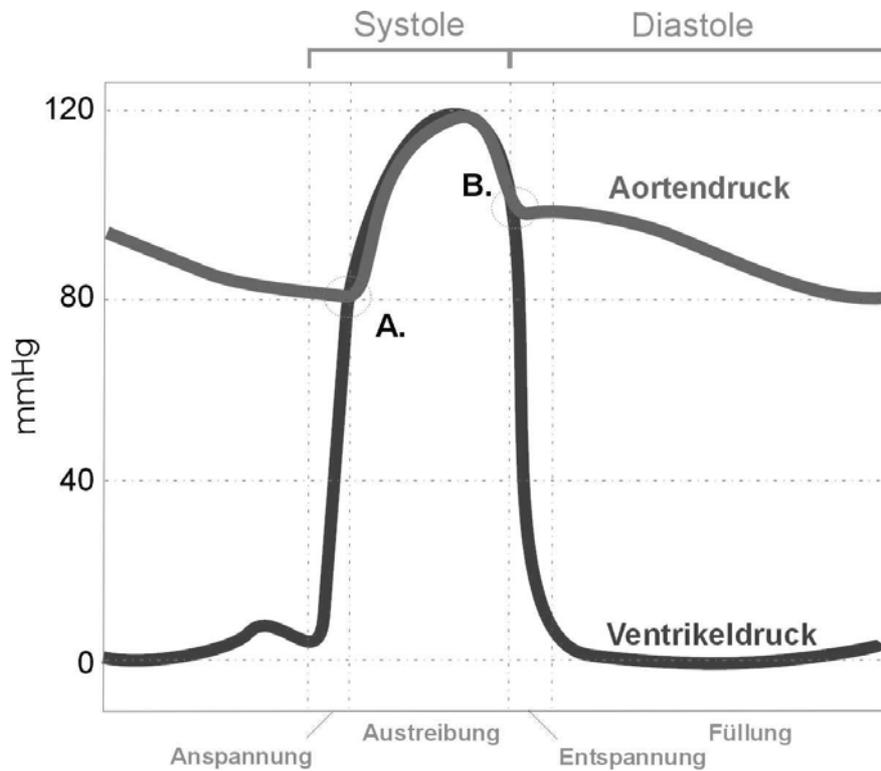


Abb. I-1 Druckkurve des linken Ventrikels. Die Abbildung zeigt die Phasen des Herzzyklus. Isovolumetrische Anspannung und Austreibung während der Systole, isovolumentrische Entspannung und Füllung im Verlauf der Diastole. Die Punkte A. und B. kennzeichnen die Öffnung bzw. den Schluss der Aortenklappen und somit Ende der Anspannungsphase (A.) und Beginn der Entspannungsphase (B.) [nach Klinke/Silbernagel, 1996].

1.2 Histologie des Myokards

Die Herzwand setzt sich aus drei Schichten zusammen: dem Endokard (innen), dem Myokard (in der Mitte) und dem Epikard (außen). Dabei entfällt die überwiegende Gewebemasse der Herzmuskulatur auf das Myokard. Das Myokard bildet ein Netzwerk aus verzweigten Fasern, deren Zellgrenzen durch die sog. Glanzstreifen markiert werden (Abb.I-2). Herzmuskelzellen zeichnen sich durch große, zentral liegende Kerne aus. Um die Energieversorgung für die hohe Stoffwechselaktivität zu garantieren, sind die Zellen außerdem besonders reich an Mitochondrien. Der Großteil des Zellvolumens einer Muskelfaser wird jedoch von den kontraktile Elementen, den Myofibrillen, eingenommen. Sie sind in parallelen Längsbündeln in die Intrazellulärsubstanz eingebettet. Die Myofibrillen sind langgestreckte, etwa 1µm dicke Strukturen, die Zonen unterschiedlicher Lichtdurchlässigkeit aufweisen, welche sich in regelmäßigen Abständen wiederholen. Durch die Anordnung von abwechselnd hellen und dunklen Banden entsteht bei lichtmikroskopischer Betrachtung das Bild einer Querstreifung, eine Gemeinsamkeit von Herz- und Skelettmuskel.

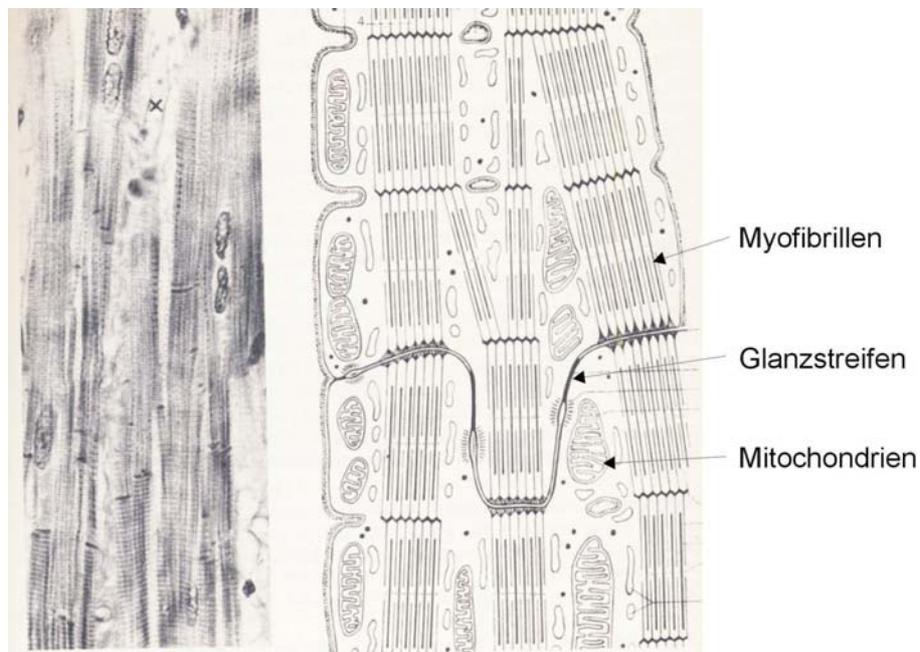


Abb. I-2. Mikroskopischer Aufbau von Herzmuskelzellen. Der linke Teil der Abbildung zeigt eine mikroskopische Aufnahme mehrerer verzweigter Herzmuskelzellen, der rechte Teil ein vereinfachtes Schema [nach H. Leonhardt, 1990].

1.3 Aufbau der Myofilamente

Die oben beschriebenen Brechungsunterschiede in den Myofibrillen beruhen auf einer regelmäßigen Anordnung kleinster Strukturelemente. Jede Myofibrille besteht aus vielen parallel gelagerten dicken und dünnen Filamenten. Die sog. I-Bande (isotropisch) enthält ausschließlich dünne Filamente, die einen Durchmesser von etwa 6 nm haben. Dickere Filamente (Durchmesser ca. 12 nm) finden sich nur in der A-Bande (anisotropisch) (Abb.I-4). Als Sarkomer bezeichnet man die von zwei Z-Scheiben begrenzte Struktur einer Myofibrille, d.h. die sich wiederholende kleinste funktionelle Einheit. Myofibrillen lassen sich als Bündel oder einzeln aus der Zelle isolieren. Sie stellen mit einer durchschnittlichen Länge von 50 μm und Breite von 1-2 μm das kontraktile Untersuchungsobjekt in der hier vorgestellten Arbeit dar.

1.3.1 Das dicke Filament

Ein dickes Filament besteht zum Hauptteil aus mehreren hundert aggregierten Myosinmolekülen [Übersicht in Gordon & Homsher, 2000]. Das Motorprotein Myosin ist ein etwa 160 nm langes, asymmetrisches Protein, dessen Struktur einen dünnen Schwanz- und Halsteil sowie zwei Kopffregionen aufweist. Myosin besteht aus zwei schweren Ketten (engl.: myosin heavy chain = MHC) mit einem Molekulargewicht von je ca. 200 kDa und vier leichten Ketten. Die beiden schweren Ketten bilden helikal umeinander gewunden den Molekülschwanz, an dessen NH_2 -terminalem Ende sich die beiden globulären Kopfteile befinden. Der Kopfteil des Myosins wird auch S1 Fragment (engl.: subfragment 1) genannt. Jeder Myosinkopf besitzt eine Nukleotid-Bindungsstelle für Adenosintriphosphat (ATP) bzw. Adenosindiphosphat (ADP), sowie für Aktin [Rayment *et al.*, 1993]. Jeder schweren Myosinkette sind zwei leichte Ketten (engl.: Myosin light chain = MLC) angelagert. Man unterscheidet zwischen der essentiellen leichten Kette (ELC) und der regulatorischen leichten Kette (RLC-2, bzw. MLC-2) (Abb.I-3 A.).

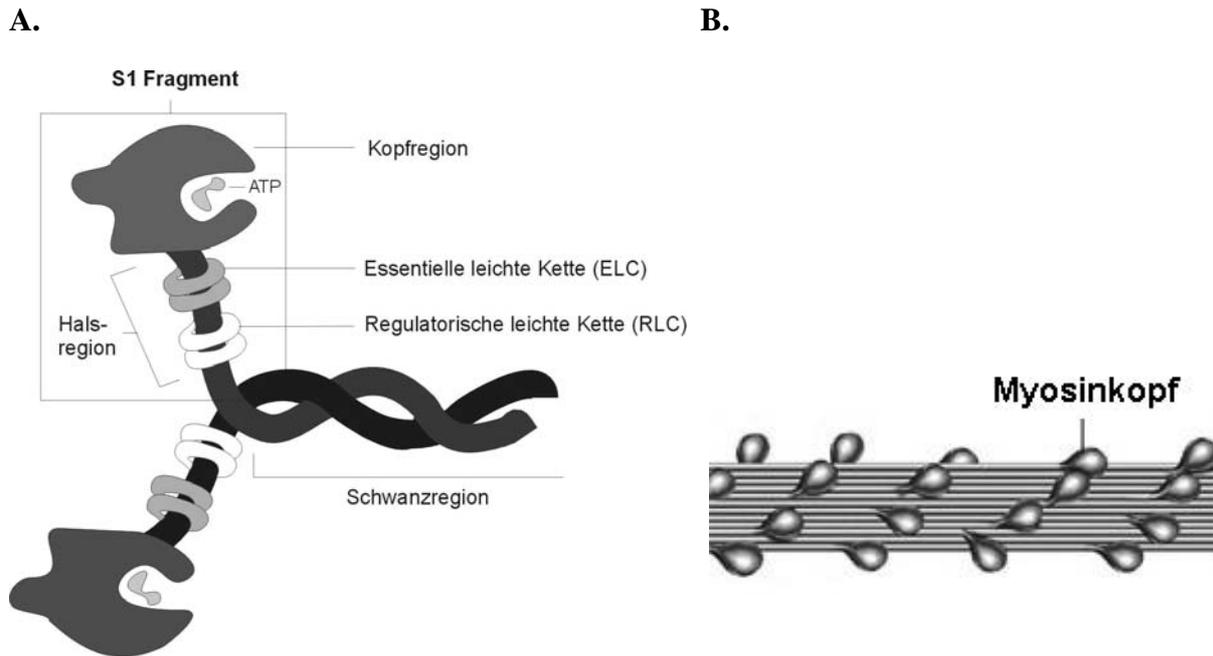


Abb. I-3. Schema eines Myosinmoleküls mit zwei globulären S1-Köpfen, den vier leichten Ketten und je einem Schwanzteil (A). Die Myosinmoleküle lagern sich zum Grundgerüst des dicken Filaments zusammen, die S1-Fragmente ragen helikal heraus (B)

Die Schwanzregion des Myosins enthält in regelmäßigen Intervallen Abschnitte gegensätzlich geladener Aminosäuren, was zur Filamentausbildung führt. Dabei ragen die S1 Fragmente in definierten Abständen von 14,3 nm aus dem Filament heraus (Abb.I-3 B.) [Rayment *et al.*, 1993]. Diese aus dem Filament herausragenden S1-Köpfe interagieren mit Aktin und führen zum Ineinandergleiten der dicken und dünnen Filamente und damit zur Muskelverkürzung und eigentlichen Krafterzeugung (s. Querbrückenzyklus).

Auch andere Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Struktur der dicken Filamente. Das sogenannte C-Protein beispielsweise hält die Myosinmoleküle während der Entwicklungsphase im Filament gebunden, in dem es sich über die A-Bande des Sarkomers lagert [Seiler *et al.*, 1996]. Ein weiteres Protein ist Titin, welches die dicken Filamente indirekt an die Z-Scheiben bindet. Titin (MW 3000 kDa) ist ein federartig gewundenes, elastisches Protein, das fest in der Z-Scheibe verankert ist. Neben der „Ankerfunktion“ für die dicken Filamente ist es durch seine federartige Struktur für die elastische Dehnbarkeit des Muskels verantwortlich [Labeit *et al.*, 1997, Li *et al.*, 2002].

1.3.2 Das dünne Filament

Dünne Filamente bestehen zum größten Teil aus den Struktur- und Regulatorproteinen Aktin, Troponin (Tn) und Tropomyosin (Tm) [Übersicht gibt Tobacman L.S., 1996]. Aktin besteht aus globulären Molekülen (G-Aktin), welche in der Zelle zu einem Filament aggregieren (F-Aktin). Ein Aktinfilament besteht aus 2 helikal umeinander gewundenen Ketten, die durch das Gerüstprotein α -Aktinin an den Z-Scheiben befestigt sind. Um das Aktinfilament windet sich wiederum das Tropomyosin, welches ebenfalls ein Dimer aus zwei α -helikalen Ketten ist. Die flexible Assoziation des Tm an das Aktinfilament ist nicht nur abhängig von Interaktionen mit den Aktinmonomeren, sondern wird zudem durch Bindung an den Troponinkomplex stabilisiert. Dieser ist einer Aktinkette in regelmäßigen Abständen von etwa 40 nm angelagert. Die Ca^{2+} -induzierte Verschiebung des Tm auf der Oberfläche der Aktinfilamenten zählt zu den zentralen Regulationsvorgängen während der Muskelkontraktion [Übersicht in Phillips *et al.*, 1986.] (siehe Abb. I-7).

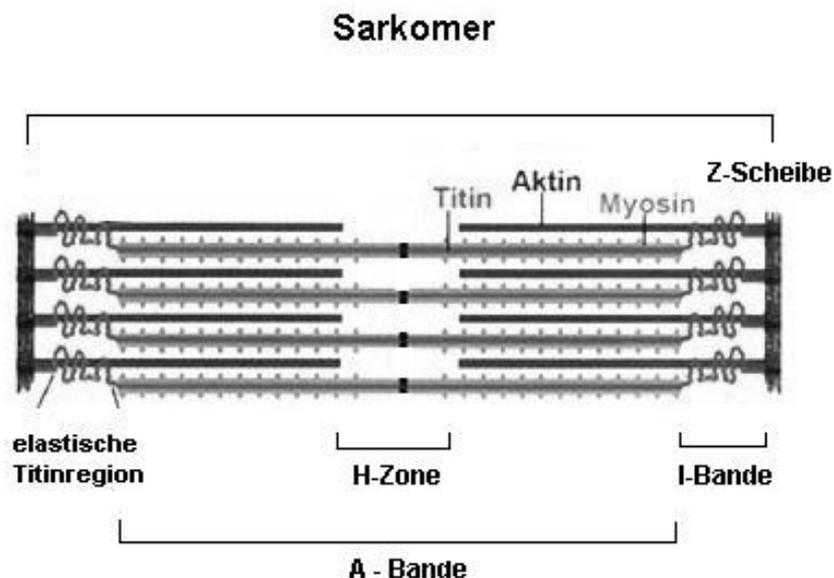


Abb. I-4. Schematischer Aufbau der Filamente im Sarkomer. Aktinfilamente und Myosinfilamente lagern sich in der Sarkomerstruktur aneinander. Das Myosinfilament wird von Titin an die Z-Scheiben gebunden und erhält so seine Flexibilität.

1.4 Molekulare Mechanismen der Herzmuskelkontraktion

Der eigentliche Kontraktionsprozess der Muskelzellen besteht darin, dass sich die Myosin- und Aktinfilamente teleskopartig ineinanderschieben, ohne dass sich deren eigene Länge verändert. Dabei nähern sich die Z-Scheiben einander an und die Sarkomere verkürzen sich. Dieser Vorgang wurde erstmals von H.E. Huxley 1957 als sog. „Gleit - Filament - Mechanismus“ vorgeschlagen [Huxley H.E., 1957].

Der Querbrücken-Zyklus

Myosin ist eine Mg^{2+} -abhängige ATPase, welche durch Bindung an Aktin stark stimuliert wird. Dieser Mechanismus wurde erstmals von Lymn & Taylor (1971) beschrieben, die ihre Ergebnisse mit den zuvor von H.E. Huxley entdeckten Querbrücken kombinierten und den Lymn-Taylor Zyklus vorschlugen [Übersicht in Holmes & Geeves, 2000]. Diese Querbrücken Theorie der Muskelkontraktion besagt, dass die Myosin Querbrücken in einer initialen Konformation an das Aktinfilament binden und dann einer Strukturveränderung unterliegen, die das Aktinfilament gegen das Myosinfilament verschiebt. Energiequelle für den Querbrückenzyklus, der aus Anheftung, Strukturänderung, Ablösung und Rückführung der Querbrücke in ihren Ausgangszustand besteht, ist die Hydrolyse von ATP. Durch die Bindung von ATP an den Myosinkopf nimmt dessen Affinität zu Aktin stark ab, wodurch sich der Kopf vom Aktinfilament ablöst (Abb.I-5 d-a). Der Myosinkopf besitzt ATPase-Aktivität, d.h. in Anwesenheit von Mg^{2+} wird das ATP in ADP und Phosphat (P_i) gespalten. Zunächst verbleiben beide Spaltprodukte am Myosinkopf, was zu einer Steigerung der Affinität der Aktin-Myosin-Bindung führt. Dadurch richtet sich der Myosinkopf in eine 90° Position auf (Abb.I-5 b) und lagert an das Aktinfilament an (Abb.I-5 c). Im nächsten Schritt wird P_i abgegeben, was ein Abknicken des Myosinkopfes zur Folge hat. Eine weitere Kippung der Querbrücke erfolgt bei der sich anschließenden Freisetzung von ADP, die eine Verschiebung des Aktinfilaments um ca. 15 nm zur Sarkomermitte hin nach sich zieht (Abb.I-5 d). Als Resultat verkürzt sich das Sarkomer, wodurch die Muskelfaser Spannung entwickelt. Erst wenn erneut ATP an den Myosinkopf bindet, erfolgt die Ablösung des Myosins vom Aktin. Da ein einzelner Zyklus die Filamente nur um wenige nm verschiebt, erfolgen größere Längenänderungen bei fortbestehender Ca^{2+} -Aktivierung erst mit zahlreichen Wiederholungen des Querbrückenzyklus. Um die maximale Verkürzung eines Sarkomers um 40 % zu erreichen, müssen etwa 50 Querbrückenzyklen ablaufen. Durch den asynchronen

Verlauf der Einzelvorgänge werden ruckartige Aktionen vermieden und die Bewegung verläuft fließend [Übersicht in Cooke, 1997].

Wird die Nachfuhr von ATP in der Muskelzelle unterbrochen, was beispielsweise nach einem Kreislaufstillstand auftritt, bleiben die Myosinköpfe nach der kraftgenerierenden Bewegung starr mit den Aktinfilamenten verbunden. Der Muskel verharrt dann in der Totenstarre, auch Rigor, bzw. Rigor mortis genannt.

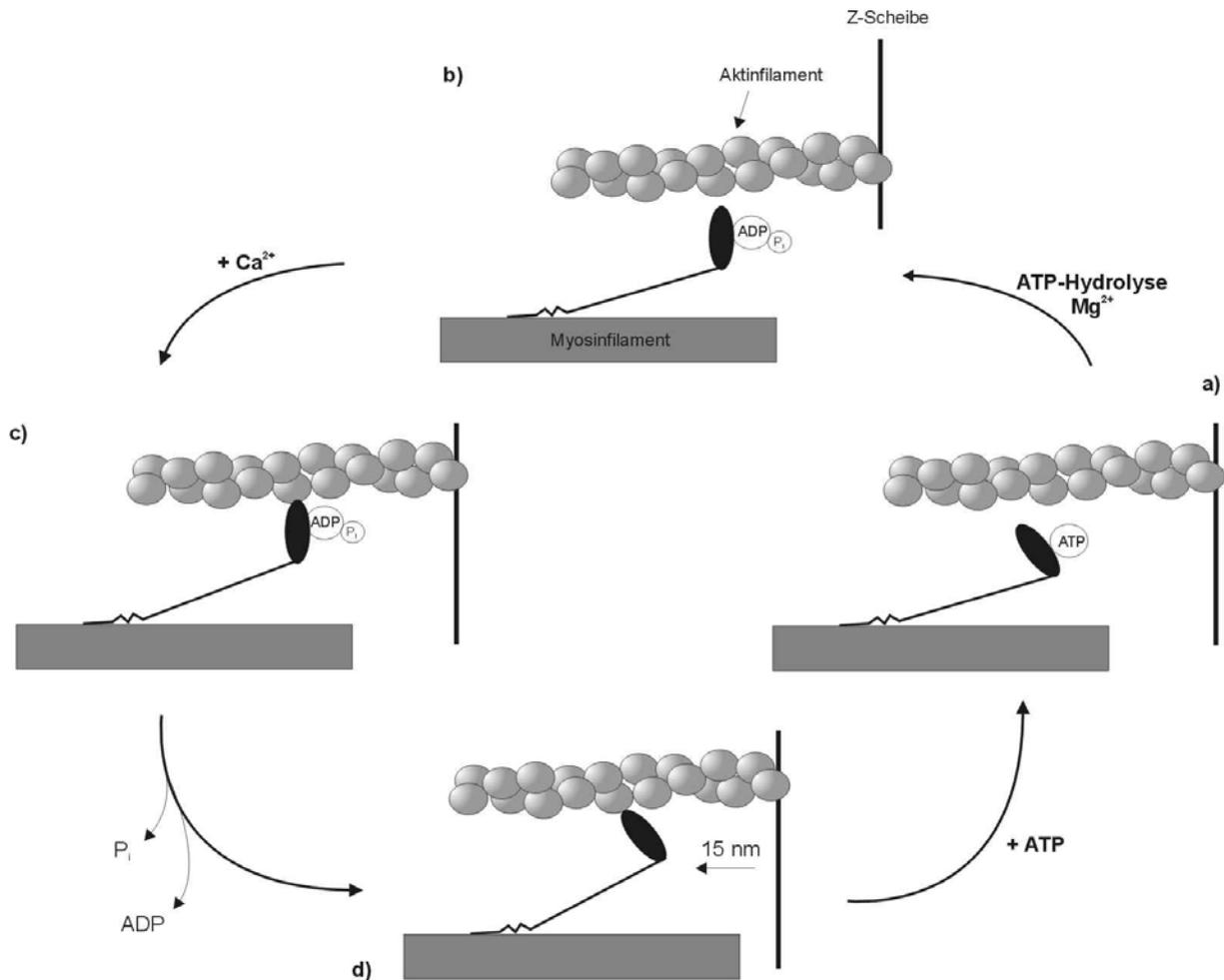


Abb. I-5 Der Lymn-Taylor Zyklus

ATP bindet an die Myosin Querbrücke, was zu einer schnellen Dissoziation vom Aktin führt (d-a). Die Hydrolyse von ATP zu ADP und P_i führt zu einem Zurückklappen der Myosin Querbrücke (b), woraufhin es an Aktin bindet (c). Diese Bindung an das Aktin führt zur Freisetzung von ADP und P_i und zu einem „kraftgenerierenden Rudern“ des Myosinkopfes (d). [modifiziert nach: Lymn & Taylor, 1971].

1.5 Der Troponinkomplex

Der Troponinkomplex ist das regulatorische Element, das die intrazellulären Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration auf die dicken und dünnen Filamente übersetzt. Er besteht aus drei Untereinheiten; Troponin C (TnC), Troponin I (TnI) und Troponin T (TnT) [Übersicht in Gordon & Homsher, 2000]. Alle Untereinheiten treten sowohl als speziesspezifische als auch gewebespezifische Isoformen auf [Adamcová *et al.*, 1999].

1.5.1 Troponin C

TnC (MW 18 kDa) ist der Ca^{2+} -Sensor der kontraktiven Regulation in quergestreifter Muskulatur. TnC besitzt zwei globuläre Domänen, die durch eine lange zentrale Helix miteinander verbunden sind. Jede der globulären Domänen enthält zwei mögliche Ca^{2+} -Bindestellen nach dem EF-Hand bzw. dem „*helix-loop-helix*“ Prinzip. Die Bindestellen (III+IV) am COOH-Terminus haben zwar eine hohe Affinität zu Ca^{2+} (etwa 10^7 M^{-1}), sind jedoch durch die ebenfalls hohe Affinität zu Mg^{2+} unter physiologischen Bedingungen meist mit Mg^{2+} -Ionen besetzt. Diese COOH-terminalen Bindestellen werden auch „strukturelle“ Bindestellen genannt, da Mg^{2+} - bzw. Ca^{2+} -Bindung an diesen Stellen die TnC-TnI Interaktion fördert, und zugleich die Assoziation des TnC an die dünnen Filamente unterstützt [Gordon & Homsher, 2000]. Die NH_2 -terminalen Bindestellen (I+II) dagegen sind die sog. „physiologischen“ Ca^{2+} -Bindestellen. Diese binden selektiv Ca^{2+} , obwohl sie eine geringere Ca^{2+} -Affinität aufweisen als die COOH-terminalen Bindestellen (10^5 M^{-1}) [Potter *et al.*, 1974].

Man unterscheidet zwischen kardialem cTnC und skelettalem sTnC. Der größte Unterschied zwischen den beiden Isoformen ist die Tatsache, dass im cTnC durch Austausch dreier Aminosäuren die NH_2 -terminale Ca^{2+} -Bindestelle I inaktiviert ist, so dass cTnC unter physiologischen Bedingungen nur noch drei anstatt vier potentielle Ca^{2+} -Bindestelle (II-IV) besitzt [Van Eerd *et al.*, 1976].

1.5.2 Troponin I

Für TnI existieren verschiedene Gene für die „langsame skelettale“ (engl. = slow skeletal, ssTnI), die „schnelle skelettale“ (engl. = fast skeletal, fsTnI) und die kardiale Isoform (engl. = cardiac, cTnI) [Wilkinson *et al.*, 1978; Pearlstone *et al.*, 1986]. Die Begriffe langsam bzw. schnell beziehen sich dabei auf das Vorkommen in langsamer (z.B. *M. soleus*) bzw. schneller Skelettmuskulatur (z.B. *M. psoas*). Das fetale humane Myokard enthält dagegen ausschließlich ssTnI (24 kDa), welches nach den ersten Lebensmonaten vollständig durch die kardiale Isoform cTnI (30 kDa) ersetzt wird [Murphy *et al.*, 1991; Bhavsar *et al.*, 1991]. Inzwischen ist bekannt, dass diese entwicklungs- und gewebespezifischen Isoformen des TnI einen starken Einfluss auf die Kontraktilität des Herzmuskels haben. So konnte beispielsweise an mehrzelligen Faserpräparaten festgestellt werden, dass die beobachteten Unterschiede in der Ca^{2+} -Sensitivität der Kraftentwicklung bei fetalen, neonatalen und adulten Mausherzen u.a. auf veränderte Zusammensetzung der TnI und TnT-Isoformen zurückzuführen sind [Siedner *et al.*, 2003]. Studien an transgenen Mäusen konnten ebenfalls zeigen, dass ssTnI die Ca^{2+} -Sensitivität in adulten Myozyten deutlich erhöht [Westfall *et al.*, 2002]. Da in Faserpräparationen aus pathologischen Spenderherzen signifikante Veränderungen in der Ca^{2+} -Sensitivität der Kraftentwicklung gefunden werden, wird eine mögliche Reexpression fetaler Troponinisoformen in adulten Herzen derzeit im Zusammenhang mit terminaler Herzinsuffizienz diskutiert [Adamcová & Pelouch, 1999; Brixius *et al.*, 2002].

Das kardiale TnI (cTnI) ist ein Protein aus 210 Aminosäuren, das sich von seiner skelettalen Isoform hauptsächlich durch eine Verlängerung von 33 Aminosäuren am NH_2 -Terminus unterscheidet. In dieser NH_2 -terminalen Verlängerung des cTnI liegen jeweils zwei Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase A (PKA) sowie für die Proteinkinase C [PKC] [Solaro & Rarick, 1998]¹. Mehrere Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass Phosphorylierung durch PKA eine verringerte myofibrilläre Ca^{2+} -Sensitivität und einen beschleunigten Querbrückenzyklus zur Folge hat [Kranias & Solaro, 1982; Wattanapernpool *et al.*, 1995], die Befunde über die Auswirkungen der verschiedenen Phosphorylierungsstufen des TnI sind jedoch widersprüchlich. In ersten Studien konnten Veränderungen im Phosphorylierungsstatus des TnI auch in Muskelproben terminal insuffizienter Herzen detektiert werden [Van der Velden *et al.*, 2003]. Derzeit wird diskutiert, ob diese veränderte

¹ Phosphorylierungsstellen der PKA sind die Serinreste 23 und 24, für die PKC die Serine 41 und 43 sowie das Threonin 142.

Phosphorylierung auch an den beobachteten Änderungen in der Ca^{2+} -Sensitivität der Kraftentwicklung beteiligt sein könnte [Van der Velden *et al.*, 2003].

Die Effekte einer Phosphorylierung durch Proteinkinase C (PKC) sind dagegen noch nicht genauer untersucht. Studien an insuffizienten humanen Herzen und an Herzen aus transgenen Mäusen lassen jedoch auch hier einen starken Zusammenhang mit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz vermuten [Bowling *et al.*, 1999; Bowman *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2001]. Die Studien konnten zeigen, dass eine erhöhte Expression der PKC zu einer ebenfalls erhöhten und teilweise persistierenden Phosphorylierung des cTnI führt, was wiederum die Kraftentwicklung im Myofilament beeinträchtigt. Myofilamente aus Herzen transgener Mäuse, deren cTnI an den Serinen 43 und 45 (S43A/S45A) nicht mehr phosphorylierbar ist, zeigen eine Aufhebung dieses Effekts [Montgomery *et al.*, 2002; MacGowan *et al.*, 2001].

Innerhalb des Troponinkomplexes ist TnI die Untereinheit, welche den Komplex durch Bindung sowohl an Aktin als auch an TnC und TnT zusammenhält. Namensgebend für TnI ist seine sog. inhibitorische Region, ein 20 Aminosäuren langes, innerhalb aller TnI Isoformen konserviertes Motiv der Reste 128–147. In Abwesenheit von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen assoziiert der COOH-terminale Teil des inhibitorischen Peptids an die NH_2 -terminale Region des Aktins was zu einer Inhibition der Mg^{2+} -ATPase Aktivität des S1 Myosins führt. Der NH_2 -terminale Abschnitt der inhibitorischen Region interagiert dagegen mit TnC [Talbot & Hodges, 1981; Grand *et al.*, 1982].

Die meisten Studien über TnC-TnI Interaktion wurden an skelettalen Isoformen durchgeführt. Da sich Kristallisationsstudien bislang als schwierig erwiesen haben, sind noch keine Daten über eine definitive Struktur des Proteinverbundes vorhanden. Fluoreszenzstudien des Troponinkomplexes schlagen eine Zusammenlagerung von TnC und TnI in gestrecktem Zustand vor [Kobayashi *et al.*, 1994]. Das würde die Hypothese von Farah *et al.* bestätigen, nach der die Proteine sTnC und sTnI antiparallel assoziieren (Schema siehe Abb.I-6) [Farah *et al.*, 1994]. Eine NMR-Studie (nuclear magnetic resonance spectroscopy) eines NH_2 -terminalen cTnI Peptids (33-80) mit dem COOH-Terminus des cTnC lässt dies auch für die kardialen Isoformen vermuten [Gasmi-Seabrook *et al.*, 1999].

Ingraham & Swenson (1984) beobachteten weiter, dass im Komplex der skelettalen Isoformen durch Ca^{2+} -bzw. Mg^{2+} -Bindung an die NH_2 -terminalen Bindestellen I-II des TnC die Assoziation von TnC und TnI verstärkt wird. Diesen Effekt findet man im kardialen Komplex nur sehr stark abgeschwächt vor. In Anwesenheit von Mg^{2+} binden cTnI und cTnC

im kardialen Komplex mit einer Affinität von $4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, in Anwesenheit von Ca^{2+} dagegen mit einer Affinität von $1,3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ [Liao *et al.*, 1994].

Doch nicht alle Interaktionen von TnI mit TnC sind Ca^{2+} -abhängig, beispielsweise wird postuliert, dass die zentrale Helix des TnC in Ca^{2+} -unabhängiger Weise mit der NH_2 -terminalen Helix des TnI interagiert [Farah *et al.*, 1994]. Diejenigen Interaktionen, welche letztlich für die Vermittlung des Ca^{2+} -Signals verantwortlich sind, finden jedoch zwischen der NH_2 -terminalen Domäne des TnC und den Aminosäuren 116-131 des fsTnI statt (entspricht Position 149-164 auf hcTnI) [Tripet *et al.*, 1997]. Tripet *et al.* vermuten, dass die Assoziation dieser TnI-Region an das TnC zu einem Ablösen der angrenzenden Reste 96-116 und 140-148 von der Aktinbindestelle führen könnte. Die Reste 96-116 könnten daraufhin an den COOH-Terminus des TnC binden und so die Bindung von TnC und TnI verstärken, was schließlich zu einer Ablösung des TnI von der Aktinbindestelle und so zur Aufhebung der inhibitorischen Wirkung des TnI auf die Aktomyosin-Interaktion führt. FRET-Studien an fluoreszenzmarkiertem TnI mit Aktin und TnI mit TnC bestätigen diese Vermutung. Sie können zeigen, dass sich in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen der Abstand zwischen TnI und Aktin deutlich vergrößert, wogegen er gleichzeitig zwischen TnI und TnC verringert wird [Gergely *et al.*, 1988]. Die Interaktion des TnI mit Aktin scheint also als eine Art Ca^{2+} -sensitive Verankerung des Tn-Tm Verbundes am Aktin zu wirken.

1.5.3 Troponin T

TnT bindet den Troponinkomplex an Tropomyosin und somit auch an Aktin. TnT ist ein asymmetrisches Protein (36 kDa); das aus einer globulären COOH-terminale Region und einem langgedehnten NH_2 -terminalen Bereich besteht. Die globuläre COOH-terminale Region des TnT ist innerhalb des Troponinkomplexes für die Bindung an TnI-TnC verantwortlich, wogegen der NH_2 -terminale Bereich in der überlappenden Region zweier benachbarter Tm Moleküle bindet, und so die Ca^{2+} -Aktivierung des Troponinkomplexes auf das Tm übermittelt [Chen *et al.*, 1997; Pearlstone & Smillie, 1988; Schaertl *et al.*, 1995]. Die Überlappungsregion zweier Tm Moleküle ist hauptsächlich für die Affinität des Tm für Aktin verantwortlich [Phillips *et al.*, 1986], weshalb TnT durch Assoziation an diese Überlappungsregion in der Lage ist, aktiv in die inhibitorische Wirkung des Tn-Tm-Komplexes einzugreifen. (s. Abb. I-7). Dabei erhöht die Interaktion des TnT mit TnC-TnI-Tm nicht nur die inhibitorische Funktion des Tn-Tm-Komplexes in Abwesenheit von Ca^{2+} ,

sondern fördert darüber hinaus deren Stimulation in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen [Greaser & Gergely, 1973].

Auf Proteinebene werden im menschlichen Myokard vier cTnT Isoformen unterschieden, die durch alternatives „*splicing*“ aus einer hnRNA entstehen. Diese Isoformen werden in der Reihenfolge ihres aufsteigenden Molekulargewichts als cTnT₁ – cTnT₄ bezeichnet. CTnT₁ und cTnT₂ werden hauptsächlich im fetalen Herzen exprimiert, cTnT₃ ist die dominante adulte TnT Isoform, welche nach der Geburt cTnT₁ und cTnT₂ ersetzt. CTnT₄ wird ebenfalls bereits im fetalen Herzen exprimiert, diskutiert wird jedoch derzeit auch eine erneute Expression dieser Isoform bei schwerwiegenden Herzerkrankungen [Anderson *et al.*, 1991]. Im fetalen Herzen werden zudem auch die skelettalen Isoformen exprimiert, die jedoch sofort nach der Geburt vollkommen fehlen.

Auch für TnT wurde beobachtet, dass die muskel- und entwicklungsabhängigen Isoformen im Muskel zu erhöhter Ca^{2+} -Sensitivität der Kontraktion [Nassar *et al.*, 1991; Schachat *et al.*, 1987] oder verstärkter ATPase Aktivierung führen können [Farah *et al.* 1994, Greaser & Gergely 1971; Potter *et al.*, 1995]. Beides kann als ein wichtiger funktioneller Regulationsmechanismus der Muskelkontraktion angesehen werden.

1.5.4 Interaktionen des Troponinkomplexes

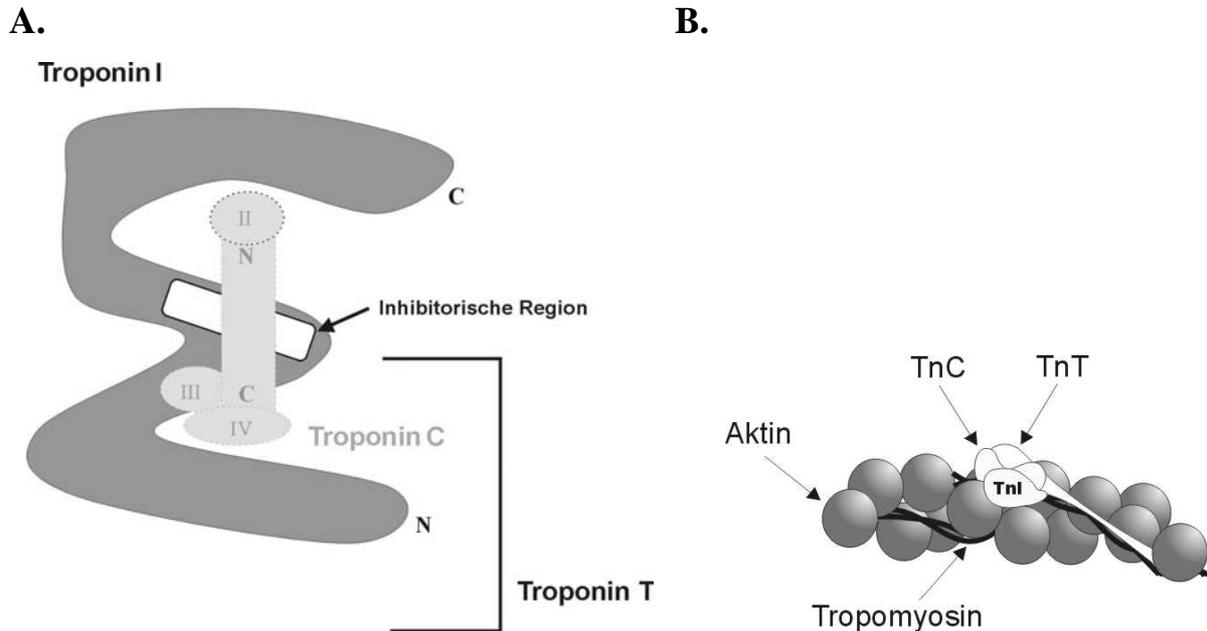


Abb. I-6. Der Troponinkomplex. TnC liegt in antiparalleler Anordnung dem TnI angelagert (A.) [Modell vereinfacht nach Olah *et al.*, 1994]. Der langgestreckte NH₂-Terminus des TnT bindet den Troponinkomplex an das Tropomyosin, welches sich in regelmäßigen Abständen um die Aktinketten windet (B.) [nach Heeley *et al.*, 1987].

Röntgendiffraktionsstudien an gehäuteten Faserpräparaten und an orientierten Filamenten haben drei verschiedene Positionen des Tm aufgezeigt, was die Theorie eines Drei-Phasen Modells der Regulation des dünnen Filaments unterstützt [McKillop & Geeves, 1993]. In Abwesenheit von Ca²⁺ besetzt Tm dabei eine Position, welche die meisten der potentiellen Myosinbindestellen des Aktins blockiert und somit die Bindung des S1 verhindert [Lehman *et al.*, 1995]. Nachdem Ca²⁺ an den Troponinkomplex bindet, verlagert sich das Tm um etwa 25° auf der Oberfläche der Aktinkette und bildet den sog. „geschlossenen“ Zustand. Dadurch werden potentielle Myosinbindestellen des Aktins freigelegt, was eine schwache Bindung von S1 an das Myosin ermöglicht. Im sich anschließenden sog. „offenen“ Zustand kann S1 dann in jedem Stadium des Querbrückenzyklus Bindungen an das Aktin eingehen [McKillop & Geeves 1993].

Der Troponinkomplex wirkt in diesem Modell als eine Art molekularer Schalter (s. Abb. I-7): die Bindung von Ca²⁺ an TnC verursacht zunächst eine Konformationsänderung, welche auf das TnI übertragen wird. Gleichzeitig wird die Affinität des TnC zu TnI und TnT erhöht, was wiederum zu einer verringerten Affinität des TnI zum Aktin führt. Über TnT werden diese

Konformationsänderungen auf das Tropomyosin übertragen, das daraufhin seine Position auf dem Aktin verschiebt und die S1-Bindestelle freigibt. [Übersicht in Tobacman, 1996; Solaro & Rarick, 1998; Gordon *et al.*, 2001]. In Abb. I-7 sind die Ca^{2+} -abhängigen Interaktionen des Tn-Tm-Komplexes noch einmal schematisch dargestellt.

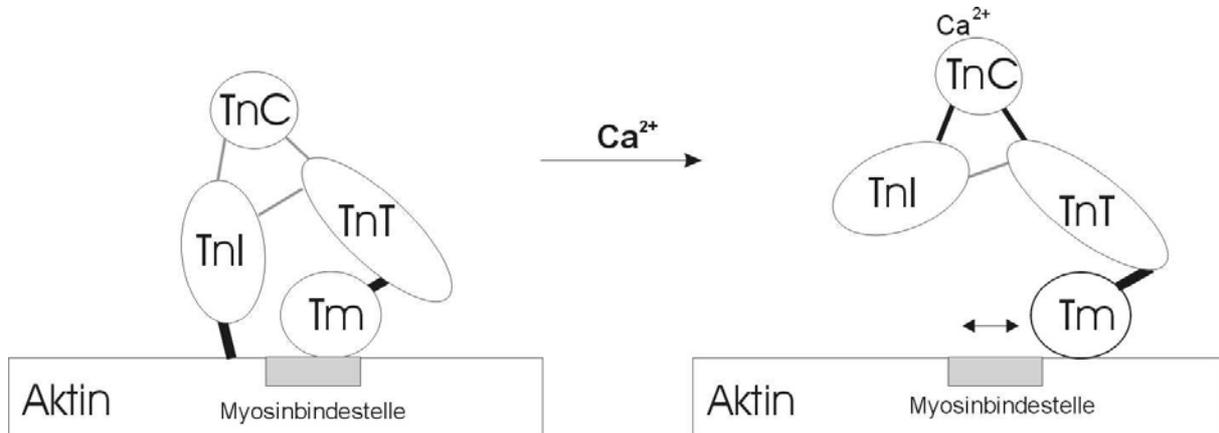


Abb. I-7. Effekt von Ca^{2+} auf die Interaktionen des Tm-Tn-Komplexes. Die Linien stellen die Interaktion der einzelnen Proteine dar. Dickere Linien stehen für stärkere, dünnere Linien für schwächere Bindungen. Ca^{2+} -Bindung an TnC verursacht eine verstärkte Interaktion von TnC-TnI und TnC-TnT, schwächt jedoch die Bindung von TnI an Aktin (rechte Seite der Abb.). Das führt zu einer Bewegung des Tm auf der Aktinoberfläche und somit zur Freigabe von Myosinbindestellen [Nach Heeley *et al.* 1987].

2 Pathophysiologie des Herzens – Kardiomyopathien

Eine Herzinsuffizienz entwickelt sich, wenn das Herz nicht genug Blut transportieren kann, um den metabolischen Ansprüchen des Stoffwechsels zu genügen [Alpert *et al.*, 2002]. Eine solche Fehlleistung des Herzens äußert sich zunächst in einer Reduktion der physischen Belastbarkeit, bevor das Herz im weiteren Verlauf seine Fähigkeit verliert, im Ruhezustand genügend Blut in das periphere Gewebe zu transportieren [Francis *et al.*, 2001].

In der westlichen Welt nehmen Herz-Kreislauf-Erkrankungen die führende Position in der Statistik der Todesfälle ein [offizielle Angaben der American Heart Association 2003]. Ein hoher Prozentsatz davon kann auf Kardiomyopathien zurückgeführt werden. Kardiomyopathien sind per Definition Erkrankungen des Myokards, welche mit kardialer Dysfunktion einhergehen. Nach der WHO/ISFC - Klassifikation werden Kardiomyopathien nach morphologischen und funktionellen Kriterien in 5 Formen unterteilt [Maisch B., 1998]:

1. Dilatative Kardiomyopathien (DCM)
2. Hypertrophe Kardiomyopathien (HCM)
3. Restriktive Kardiomyopathien (RCM)
4. Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathien (ARVCM)
5. Nicht klassifizierbare Kardiomyopathien (NKCM)

Da sich die vorliegende Arbeit ausschließlich mit dilatativen oder hypertrophischen Kardiomyopathien befasst, sollen diese im Folgenden eingehender vorgestellt werden.

2.1 Dilatative Kardiomyopathie

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM = engl. dilated cardiomyopathy) ist die häufigste Form der Kardiomyopathie, von der überwiegend Männer betroffen sind. Die Inzidenz der DCM wird auf etwa 36 Neuerkrankungen pro 100000 Menschen pro Jahr geschätzt [Manolio *et al.*, 1992; Dec & Fuster, 1994]. Die DCM ruft charakteristischerweise eine kardiale Dilatation sowie kontraktile Dysfunktion des linken und in späterem Stadium auch des rechten Ventrikels hervor. Infolge der ausgeprägten Ventrikeldilatation bedeutet das meist eine verminderte Pumpleistung des Herzens während der Systole, d.h. eine ausgeprägte Herzinsuffizienz. Die Fünfjahresüberlebensrate nach Diagnosestellung beträgt nur etwa 30 %

[Dec & Fuster, 1994]. Obwohl eine Behandlung mit Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE)-Inhibitoren oder Betablockern bei einer Großzahl der Patienten eine Verbesserung der Symptome hervorruft, ist die DCM in den USA weiterhin die primäre Indikation für eine Herztransplantation.

Als Ursachen einer DCM kommen sowohl toxische Myokardschädigungen, z.B. durch chronischen Alkoholismus oder Kokainmissbrauch, als auch metabolische und infektiöse Myokardschädigungen in Frage. In etwa der Hälfte aller DCM-Erkrankungen ist eine Ursache jedoch nicht zu bestimmen, das Krankheitsbild wird dann als sog. idiopathische DCM eingestuft. Erst in den letzten Jahren ist man durch genetische Studien an größeren Familien mit DCM auf eine mögliche genetische Ursache der Erkrankung aufmerksam geworden. Mehrere Mutationen der kardialen Isoformen von Troponin T (cTnT), dem Myosinbindeprotein C und Aktin, sowie von Titin, Desmin und Tropomyosin konnten mit Fällen von idiopathischer DCM in Verbindung gebracht werden [z.B. Gerull *et al.*, 2002; Schaper *et al.*, 1993]. In den meisten Fällen werden die Mutationen autosomal dominant vererbt. Neuere Schätzungen gehen inzwischen davon aus, dass etwa 1/3 der idiopathischen DCM Erkrankungen einen genetischen Auslöser haben. [Grunig *et al.*, 1998]

Im Gegensatz zu den idiopathischen Formen sind bei den spezifischen Kardiomyopathien Ätiologie und Pathogenese bekannt. Die häufigste Form ist die ischämische Kardiomyopathie (ICM) als Endstadium der koronaren Herzerkrankung. Hierunter ist die kardiale Dysfunktion des nichtischämischen, d.h. des nicht direkt infarktgeschädigten Herzmuskelareals zu verstehen. Sie ist überwiegend Folge des sog. „*Remodeling*“-Prozesses, das heißt der Anpassung des nichtinfarzierten Herzmuskels an die durch den Infarkt hervorgerufene Insuffizienz [Maisch B., (1998)].

2.2 Hypertrophe Kardiomyopathie

2.2.1 Krankheitsbild

Charakteristisch für diese Form der Herzmuskelerkrankungen ist eine ausgeprägte Hypertrophie mit erhöhter Wandsteifigkeit des Herzens. Die familiäre Form der hypertrophen Kardiomyopathie (FHC) ist mit einer Prävalenz von etwa 1 zu 500 in jungen Erwachsenen die am häufigsten vererbte kardiale Erkrankung [Maron *et al.*, 1995]. Dabei kann die

Hypertrophie der Herzmuskulatur alle Wandabschnitte gleichermaßen oder aber nur einzelne Teile, z.B. das Ventrikelsystem betreffen.² Abb. I-8 zeigt schematisch den Vergleich zwischen einem gesunden Herzen und dem Herz eines FHC Patienten mit stark hypertrophiertem Septum und linker Ventrikelwand.

Das klinische Bild der FHC ist variabel: verläuft die Krankheit bei manchen Patienten ihr Leben lang asymptomatisch, kann sie bei anderen verminderte Belastbarkeit, Schwindel, Belastungsdyspnoe oder Herzrhythmusstörungen verursachen. Darüber hinaus ist die FHC die häufigste Ursache eines plötzlichen Herztodes bei jungen Erwachsenen sowie bei Wettkampfsportlern. Im Gegensatz zu der in I-2.1 beschriebenen DCM liegt die funktionelle Beeinträchtigung hier in der diastolischen Funktion. Auf mikroskopischer Ebene zeigt das Myokard eine verstärkte Einlagerung von Bindegewebe sowie eine Dysorientierung und Hypertrophie der Herzmuskelzellen [Towbin *et al.*, 2002].

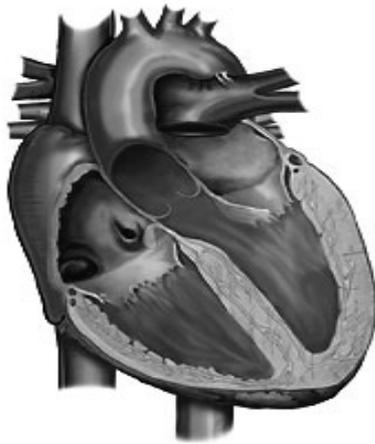
2.2.1 Molekulargenetische Ursachen

Vielen Patienten mit Herzerkrankungen konnte durch Gabe von Medikamenten wie beispielsweise Herzglykosiden geholfen werden. Diese Medikamente besitzen u.a. die Eigenschaft, die Kontraktilität der kardialen Myozyten zu erhöhen und somit die Hämodynamik und die Belastbarkeit zu verbessern [Konstam & Mann, 2002]. Diese Beobachtung führte zu der „Hämodynamik-Hypothese“, dass Herzerkrankungen primär durch reduzierte Kontraktilität der Myozyten hervorgerufen werden.

Ein Charakteristikum eines insuffizienten Herzens ist der ausgeschaltete adrenerge Effekt auf die Myozytenkontraktilität [Bristow M.R., 1984; Mann D.L., 1998]. In einem gesunden Herzen führt die Aktivierung des β -adrenergen Signalweges über erhöhten Ca^{2+} -Transport durch das Sarkolemm zu einem erhöhten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle, einer verstärkten Ca^{2+} -Speicherung im SR und zu einer verringerten Ca^{2+} -Affinität des Troponinkomplexes.

² Man unterscheidet zudem zwischen einer nicht-obstruktiven und einer obstruktiven Form, bei der die Ausflussbahn aus dem Ventrikel stark verengt ist. Etwa 25% der FHC Patienten zeigen die obstruktive Form der hypertrophischen Kardiomyopathie [Fatkin & Graham, 2002].

A.



B.

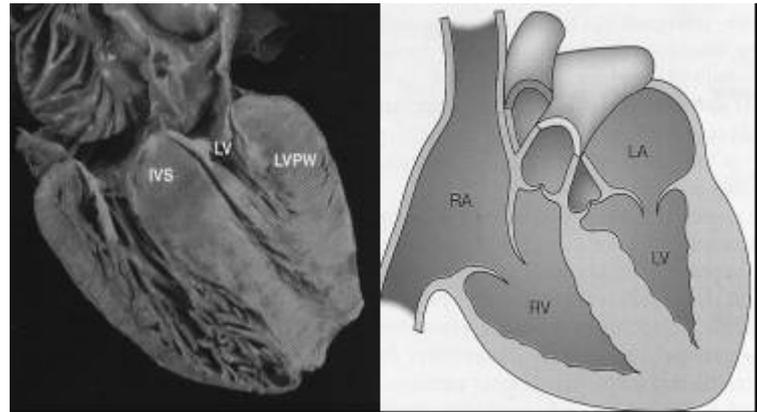


Abb.I-8 Schematischer Längsschnitt durch ein gesundes humanes Herz (A) [www-medlib.med.utah.edu] und Längsschnitt durch ein FHC Herz (B), auf der rechten Hälfte schematisch verdeutlicht [aus Towbin *et al.*, 2002]. IVS interventrikuläres Septum, LV linker Ventrikel, LVPW Hinterwand des linken Ventrikels, RA rechtes Atrium, LA linkes Atrium, RV rechter Ventrikel, LV linker Ventrikel.

Eine mögliche Erklärung für die veränderte Ca^{2+} -Homöostase in Myozyten aus erkrankten Herzen könnte demnach also die verringerte Dichte von β_1 -Rezeptoren in der Membran von Kardiomyozyten sein könnte [Bristow & Feldman, 1992]. Weitere Effekte, die im Zusammenhang mit veränderter Ca^{2+} -Homöostase in Myozyten auftreten, sind beispielsweise eine verringerte Expression und Aktivität der Ca^{2+} -ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) und eine verringerte Phospholamban Phosphorylierung [Hasenfuss & Pieske, 2002; Flesch M. *et al.*, 1996]. Wie eine veränderte Ca^{2+} -Homöostase zur Ausbildung der für Kardiomyopathien typischen Veränderungen der Herzmuskulatur (Dilatation bzw. Hypertrophie des linken Ventrikels) führen kann, ist bislang noch unklar.

Neuere Studien an einem Tiermodell der Herzinsuffizienz stellten einen Zusammenhang zwischen beeinträchtigter Herzmuskelkontraktilität und transversaler Einlagerung von Kollagen fest. Erstmals wurde postuliert, dass Veränderungen in der Ca^{2+} -Homöostase nicht die Ursache, sondern ein Adaptationsprozess auf die veränderte Steifigkeit und somit auf beeinträchtigte Kontraktilität des Myokards sein könnte. [Ward *et al.*, 2003]. Weiter bleibt unklar, ob Änderungen in kontraktilen Proteinen selbst die Ursache der verringerten Kontraktilität bei Herzerkrankungen sein könnten.

In den vergangenen Jahren haben genetische Studien an FHC Patienten nach und nach Mutationen aufgedeckt, welche Proteine des kardialen Sarkomers betreffen. In Titin [Satoh *et al.*, 1999], im Myosin [Geisterfer-Lowrance *et al.* 1990; Poetter *et al.*, 1996], im Myosinbindeprotein C [Bonne *et al.*, 1995] sowie in den kardialen Isoformen von Aktin [Olson *et al.*, 2000], Tropomyosin [Thierfelder *et al.*, 1994], TnT [Thierfelder *et al.*, 1994], TnC [Hoffmann *et al.*, 2001] und TnI [Kimura *et al.*, 1997] wurden Punkt- bzw. Deletionsmutationen beschrieben. Blair *et al.* (2001) fanden erstmals Mutationen in zwei nicht-sarkomerischen Proteinen, die sie mit FHC in Verbindung bringen konnten: in der regulatorischen Untereinheit der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) und im zytoskelettalen sog. Muskel LIM Protein [Geier *et al.*, 2003].

Am besten charakterisiert sind die funktionellen Konsequenzen der β -MHC Mutationen [Übersicht in Palmiter & Solaro, 1997]. Dabei zeigt sich, dass die FHC Mutationen auf funktionell relevanten Bereichen des Myosins lokalisiert sind [Rayment *et al.*, 1995]. Es ist daher zu erwarten, dass auch die genomisch identifizierten Mutationen anderer sarkomerischer Proteine, deren detaillierte funktionelle Charakterisierung noch aussteht, aussichtsreiche Kandidaten zur Entdeckung und Aufklärung funktioneller Proteinabschnitte sind.

Die klinische Ausprägung der FHC variiert stark, auch bei Mutationen innerhalb eines einzelnen Proteins [Arad *et al.*, 2002b]. Patienten mit einer Mutation in der β -MHC zeigen beispielsweise einen höheren Grad an kardialer Hypertrophie, wohingegen die Fälle mit Mutationen im cTnT zwar durch geringe Hypertrophie ausgezeichnet sind, die Patienten jedoch mit einer höheren Inzidenz an plötzlichem Herztod versterben [Watkins *et al.*, 1995]. Dazu kommt, dass die verschiedenen Mutationen desselben Proteins im Patienten nicht immer die gleichen Symptome hervor rufen. Wie Tab.I-1 zeigt, variiert das klinische Bild der durch Mutationen im hcTnI hervorgerufenen FHC von schwacher ventrikulärer Hypertrophie [Morner *et al.*, 2000], apikaler Hypertrophie [Kimura *et al.*, 1997] bis hin zu häufigem Auftreten des plötzlichen Herztods³ [Klausen *et al.*, 1999].

³ Die physiologischen Ursachen, die schließlich zu einem plötzlichen Herzversagen führen sind für die FHC noch nicht abschließend geklärt und einige Mechanismen stehen noch zur Diskussion, so z.B. die Auswirkungen der veränderten Ca^{2+} -Homöostase, myokardiale Ischämien oder Obstruktionen des linksventrikulären Auswurfs.

2.2.3 Veränderungen des humanen kardialen Troponin I (hcTnI)

Kardiales Troponin I wird ausschließlich im Herzmuskel exprimiert. Das korrespondierende Gen TNNI3 besteht aus 6,2 kb genomischer DNA und seine 8 Exone kodieren für ein 32kDa großes Protein, bestehend aus 210 Aminosäuren. Bislang sind 13 Mutationen für TNNI3 beschrieben worden, die in Tabelle I-1 mit ihrem klinischen Erscheinungsbild kurz dargestellt sind. Zwei der hier aufgezeigten Mutationen liegen innerhalb der sog. inhibitorischen Region des TnI; R145G und R145Q.

Erstere ist die am intensivsten untersuchte, FHC-assoziierte Mutation des hcTnI, welche den Austausch eines positiv geladenen Argininrests gegen ein ungeladenes Glycin innerhalb der inhibitorischen Region des Proteins verursacht. Da diese Region sowohl mit hcTnC als auch mit Aktin interagiert ist es wahrscheinlich, dass dieser Ladungswechsel einen Einfluss auf die Proteindynamik bzw. die regulatorischen Mechanismen des hcTnI hat. Die Mehrzahl der Studien stellt, verglichen mit dem Wildtyp hcTnI (WT), in Muskelpräparaten mit hcTnI R145G eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität und eine Abnahme in der inhibitorischen Funktion fest [Takahashi-Yanaga *et al.*, 2001, Burton *et al.*, 2002]. James *et al.* (2000) zeigten darüber hinaus an einem transgenen Mausmodell dieser Punktmutation, dass die Effekte sowohl auf histologischer als auch physiologischer Ebene stark von der Expression des mutierten Proteins abhängen. Mäuse, deren TnI zu 60 % aus mutiertem Protein besteht, entwickeln bereits in den ersten Lebenstagen eine ausgeprägte linksventrikuläre Hypertrophie und sterben wenige Tage nach der Geburt. Histologische Untersuchungen dieser Tiere hatten typische Effekte einer Hypertrophie wie Dysorientierung der Myozyten und starke Fibrose aufzeigen können. Eine weitere Mauslinie mit einer geringeren Expression (40 %) zeigt dagegen keine anatomischen und histologischen Auffälligkeiten. Analysen am schlagenden Herzen (*working heart analysis*) dieser Mäuse zeigten jedoch sowohl eine Beschleunigung der Druckanstiegs- (dP/dt) als auch eine Verlangsamung der Druckabfallsgeschwindigkeit ($-\text{dP/dt}$). Die beeinträchtigte ventrikuläre Relaxation dieser Mäuse ist konform mit der bei FHC Patienten beobachteten verminderten diastolischen Funktion des Herzens. Ob es sich bei der beschleunigten Druckanstiegsgeschwindigkeit und der Hyperkontraktilität bei FHC Patienten um einen Primäreffekt der Mutation oder um einen physiologischen Adaptationsprozess handelt, ist noch nicht umfassend untersucht worden. Abb. I-9 zeigt die Lokalisation der FHC-assoziierten hcTnI Mutationen an einem vereinfachten Schema des Proteinkomplexes.

Mutation	Klinisches Erscheinungsbild	Referenz
R145G	Ventrikuläre Hypertrophie	Kimura <i>et al.</i> , 1997
R145Q	Ventrikuläre Hypertrophie	Kimura <i>et al.</i> , 1997
R162W	Apikale Hypertrophie	Kimura <i>et al.</i> , 1997
ΔK183	Apikale und ventrikuläre Hypertrophie, unterschiedliche Prognosen	Kimura <i>et al.</i> , 1997 und Kokado <i>et al.</i> , 2000
S199N	Ventrikuläre Hypertrophie, Plötzlicher Herztod	Klausen <i>et al.</i> , 1999
G203S	Apikale Hypertrophie	Kimura <i>et al.</i> , 1997
K206Q	Ventrikuläre Hypertrophie	Kimura <i>et al.</i> , 1997
ΔExon8	Schwache ventrikuläre Hypertrophie	Morner S. <i>et al.</i> , 2000
P82S	Hypertrophe Kardiomyopathie in älteren Erwachsenen	Niimura H. <i>et al.</i> , 2002
D196N	Hypertrophe Kardiomyopathie in älteren Erwachsenen	Niimura H. <i>et al.</i> , 2002
R21K I195M R204K	FHC	Genomics of Cardiovascular Development, Adaptation, and Remodeling. NHLBI Program for Genomic Applications, Beth Israel Deaconess Medical Center. URL: http://www.cardiogenomics.org

Tab.I-1. Auflistung der bislang durch Studien belegten Mutationen im hcTnI. Gegenübergestellt sind die Positionen der Punkt- und Deletionsmutanten, deren klinisches Erscheinungsbild und die zugehörigen Referenzen.

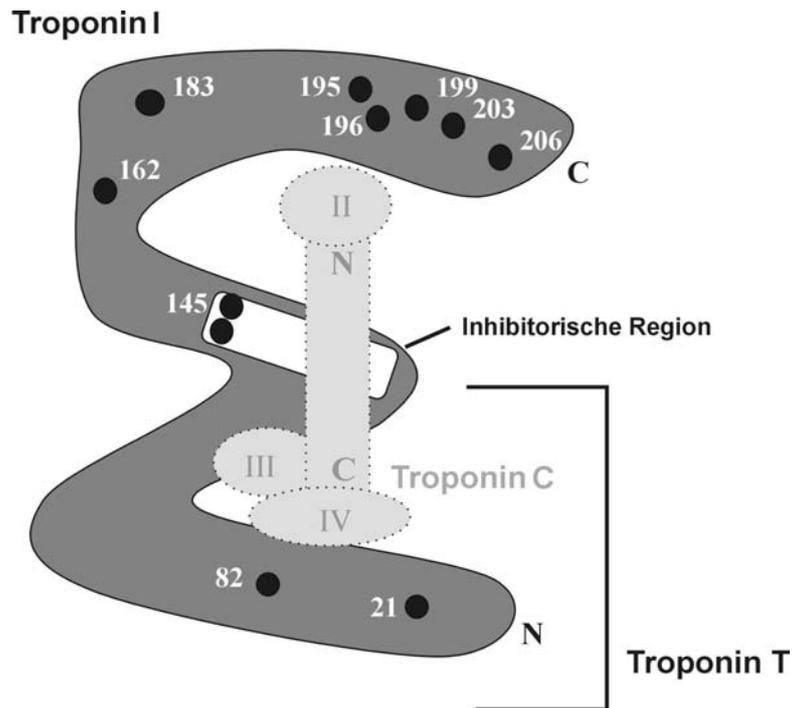


Abb.I-9. Schema der Proteine hcTnI und hcTnC. Die häufigsten FHC verursachenden Punktmutationen sind durch schwarze Kreise symbolisiert in das hcTnI eingetragen. Die beiden Mutanten R145G und R145Q liegen in der inhibitorischen Region. HcTnC mit den drei Ca^{2+} -Bindestellen (II-IV) ist in seiner üblichen Position im Troponinkomplex eingefügt [Modell vereinfacht nach Olah *et al.*, 1994].

Die Mutationen R162W und K183del liegen nahe des Inhibitorbereiches auf der COOH-terminalen Seite von hcTnI. Bei der fcTnI Isoform werden für diese Region eine oder mehrere Ca^{2+} -abhängige Bindungsstellen für TnC diskutiert [Farah *et al.* 1994]. Für cTnI wurde dies kürzlich von Rarick *et al.* (1997) bestätigt. Auch sog. „cross-linking“ [Kobayashi *et al.*, 1994] und FRET-Studien [Tao *et al.*, 1990] an Cys 133 des fsTnI (entspricht Position 166 im hcTnI) deuten darauf hin, dass sich die Mutation R162W auf hcTnI in unmittelbarer Umgebung eines Ca^{2+} -abhängigen molekularen Schalters auf dem Molekül befindet. Der Austausch einer positiv geladenen Aminosäure gegen einen aromatischen Rest in dieser Region des Proteins kann sich möglicherweise stark auf die regulatorische Funktion des Troponinkomplexes auswirken.

Tripet *et al.* (1997) konnten für fsTnI neben der in I-1.5.2 beschriebenen inhibitorischen Region eine zweite Domäne der Reste 140-148 identifizieren, die inhibitorisch auf die Aktomyosin-Interaktion wirkt. Dieser Bereich entspricht bei der hcTnI Isoform den Resten 173-181. Für die auf Position 183 lokalisierte Lysin-Deletionsmutante sind daher zunächst

ähnliche Effekte wie für die Mutationen in der konservierten inhibitorischen Region (Position 145) zu postulieren.

Die vier Punktmutationen I195M, D196N, S199N, G203S und K206Q liegen nahe des COOH-Terminus (Position 209) des hcTnI. Für diesen Bereich wurden bislang noch keine Funktionen nachgewiesen. In der Studie von Rarick et al. (Rarick *et al.*, 1997) an einer Rekombinanten mit 12 fehlenden Aminosäuren am COOH-Terminus des hcTnI konnten keine Veränderungen der Ca^{2+} -Abhängigkeit der myofibrillären ATPase gegenüber dem hcTnI-Wildtyp festgestellt werden.

Erst kürzlich sind die Mutationen P82S und R21K auf der NH_2 -terminalen Domäne des hcTnI in Studien an FHC Patienten beschrieben worden [s.Tab.I-1]. Farah et al. (1994) vermuten, dass der NH_2 -Terminus des hcTnI mit der zentralen Helix des TnC interagiert und somit maßgeblich zur TnC-TnI Interaktion beiträgt. An diesen Bereich ist auch der globuläre COOH-Terminus des TnT assoziiert. Punktmutationen in diesem Bereich könnten also möglicherweise einen Effekt auf die Ca^{2+} -vermittelte Konformationsänderungen im gesamten Troponinkomplex zur Folge haben.

Der Mechanismus mit dem die mit FHC assoziierten Mutationen des TnI zur Ausprägung der Erkrankung führen, ist noch vollständig unbekannt. Zwar bedeuten manche Punktmutation eine Ladungswechsel innerhalb der Peptidsequenz⁴ und andere nicht, doch sind die klinischen Ausprägungen der jeweiligen Erkrankungen nicht einheitlich genug, um daraus eine Schlussfolgerung auf die Schwere und den Ausgang der Erkrankung ziehen zu können [Vikstrom & Leinwand, 1996].

Da die Mehrheit der FHC verursachenden Mutationen in Proteinen des Sarkomers auftreten, ist eine Vermutung, dass die linksventrikuläre Hypertrophie kein primärer Defekt ist, sondern sich durch eine Kompensation der sarkomerischen Fehlfunktion entwickelt [Fatkin & Graham, 2002]. Im Hinblick auf die Variabilität der sekundären klinischen Symptome und auf die langfristig orientierte Entwicklung einer zielgerichteten Therapie ist es daher wichtig, zunächst die molekularen Primäreffekte der Mutationen auf hcTnI aufzuklären.

⁴ Beispiel: Bei der hcTnI Mutante R145G ist eine positiv geladene Aminosäure (Arginin) durch eine neutrale Aminosäure (Glycin) ersetzt worden.

3 Charakterisierung des Troponinkomplexes an Muskelpräparaten

Um die funktionelle Rolle des Tn bei der Regulation der Muskelkontraktion zu untersuchen, sind bereits mehrere Methoden entwickelt worden, bei denen die endogenen Troponinisoformen in gehäuteten skelettalen oder kardialen Muskelfasern ausgetauscht wurden und anschließend an diesen Fasern beispielsweise Kraft-[Ca²⁺]-Beziehungen untersucht werden konnten [z.B. Brenner *et al.*, 1999b, Shiraishi *et al.*, 1992]. Dafür wurden die Muskelfasern mit dem Detergenz Triton-X-100 inkubiert, was zu einer Permeabilisierung der Zellmembran, und somit zum Verlust der intrazellulären Ca²⁺-Regulation führt. Bei diesen Studien wurden sowohl speziesspezifische und gewebespezifische Isoformen als auch rekombinante modifizierte Troponinuntereinheiten als Austauschpartner eingesetzt. So führt Inkubation gehäuteter Faserpräparate mit Orthovanadat zur Extraktion der endogenen TnI und TnC Isoformen, welche dann durch exogene Untereinheiten substituiert werden können [Strauss *et al.*, 1992]. Andere Methoden basieren auf der Entfernung des gesamten Troponinkomplexes durch Behandlung mit einem Überschuss an TnT [Shiraishi *et al.*, 1992] oder aber einer Mischung von TnI und TnT [Chandra *et al.*, 1999], gefolgt von einer Rekonstitution mit den entsprechenden Troponin Untereinheiten.

Brenner *et al.* (1999b) zeigten, dass auch die Inkubation gehäuteter skelettaler Muskelfasern mit einem Überschuss an gesamtem Troponinkomplex zu einem vollständigen Ersatz des endogenen Tn führt. Der Austausch eines Troponin Moleküls gegen ein anderes kann als einfache Dissoziationsreaktion verstanden werden, der eine Assoziationsreaktion folgt. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass die Muskelfaser während des gesamten Protokolls im Besitz aller drei Troponinuntereinheiten ist. Es konnte gezeigt werden, dass durch diesen Austauschprozess weder die strukturelle Integrität noch die kontraktile Eigenschaften der Präparate beeinträchtigt werden [Brenner *et al.*, 1999b]. Da Kraftmessungen an einem multizellulären Präparat wie dem einer gehäuteten Muskelfaser zeitlich diffusionslimitiert sind, konnte dieses System keine detaillierten Informationen über die Kinetik der Kontraktion oder Relaxation liefern. Auch Kraftmessungen mit sogenannten „caged compounds“, welche durch Blitzlichtphotolyse entweder Ca²⁺ für die Aktivierung oder Ca²⁺-Chelatoren für die Relaxation freisetzen, sind für detaillierte Studien an der Kinetik der Kraftentwicklung bzw. Relaxation nicht ausreichend gut geeignet [Gordon *et al.*, 2000].

In der hier vorgestellten Arbeit wurden einzelne Myofibrillenbündel aus gehäuteten Herzmuskelfasern isoliert und für die Kraftmessungen verwendet. Myofibrillen bzw. Myofibrillenbündel haben im Gegensatz zu mehrzelligen Fasern einen Querschnitt von wenigen Mikrometern. Sie benötigen nur etwa 1 ms, um mit der umgebenden Lösung zu äquilibrieren und sind daher nicht diffusionslimitiert. Aus diesem Grund sind sie ideal für kinetische Studien geeignet, die auf dem Prinzip des schnellen Lösungswechsels [Colomo *et al.*, 1997] oder aber schneller Lösungsvermischung („*Stopped-flow*“) beruhen. Mittels Fluoreszenztechniken, die ursprünglich für Proteinlösungen entwickelt wurden, sind Myofibrillensuspensionen bereits erfolgreich bei Untersuchungen an der Kinetik myofibrillärer ATPase eingesetzt worden [Ma *et al.*, 1994; Stehle *et al.*, 2000a]. Es ist zu erwarten, dass die geringe Größe der Präparate darüber hinaus die Diffusion von sarkomerischen Proteinen in die Myofilamente vereinfacht. In den in dieser Arbeit geplanten Austauschexperimenten könnte dies ein Vorteil sein, der zu einer homogeneren Verteilung ausgetauschter exogener Proteine im Myofilament führt.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen sind Teil eines Forschungsprojektes, welches sich mit der Untersuchung der beim Menschen FHC auslösenden Mutationen des Troponin I befasst. Als Teilprojekt ist dort vorgesehen, die Auswirkungen einiger dieser Mutationen auch am transgenen Mausmodell zu untersuchen. Obwohl lediglich die Plasmide für die rekombinanten humanen kardialen Troponin Isoformen verwendet werden sollten, wurde in der vorliegenden Arbeit die Maus auch als Spezies für die Austauschexperimente gewählt. Da kardiales Troponin der Maus sich nur geringfügig von der humanen kardialen Isoform des Menschen unterscheidet, stellt es ein zuverlässiges Untersuchungsobjekt für die geplanten Untersuchungen dar, und ist darüber hinaus ideal für den Vergleich mit transgenen Mausmodellen geeignet.

4 Kinetische Studien an isolierten kardialen Myofibrillen

Die hier vorgestellten Ergebnisse wurden an der von Dr. Stehle entwickelten Messapparatur durchgeführt. Mit Hilfe dieser Apparatur können synchrone Messungen der Kraftentwicklung und der Sarkomerstruktur von Myofibrillen im Anschluss an schnelle Lösungswechsel durchgeführt werden [Stehle *et al.*, 2002a].

Die dafür angewandte Messtechnik basiert auf dem Prinzip der Atomkraft-Mikroskopie (Abb. I-10). Zu diesem Zweck wurde ein invertiertes Labormikroskop (Olympus IX-70) mit mehreren Mikromanipulatoren ausgestattet, mittels derer sich eine Messkammer, die Laseroptik, ein Kraftaufnehmer sowie Piezoaktor-gesteuerte Längengebung des Präparates und des Lösungswechsels positionieren lassen. Die Myofibrillensuspension wird zunächst in die gekühlte, mit Relaxationslösung gefüllte Messkammer gegeben, in der sich die Myofibrillen für 1–2 h absetzen können. Mit Hilfe des positionierbaren Längengebers lassen sich die Myofibrillen vom Kammerboden aufnehmen, durch einen zusätzlichen Manipulator kann das freie Ende der Myofibrille an der Spitze des Kraftaufnehmers (*Forcecantilevers*) befestigt werden. Dieser ist mit einer Mischung aus Nitrozellulose und Silikonkleber beschichtet, was eine stabile Haftung der Myofibrillen auch während der Kontraktion sicherstellt. Über den Längengeber kann die eingespannte Myofibrille zudem auf eine definierte Sarkomerlänge vorgedehnt werden. Die derart befestigten Präparate werden in den Lösungsstrom einer doppelkanäligen Lösungskapillare gebracht. Ein Lösungswechsel zum Auslösen der Aktivierung oder Relaxation erfolgt durch piezoaktorgesteuerte Verschiebung der Kapillare, was die Myofibrille in den Strom des zweiten Kanals bringt (Abb. I-10). Für die Steuerung des schnellen Lösungswechsels sowie die Entdehnung („slack“) des Präparates und der zeitlich koordinierten Datenerfassung des Längen- und Kraftsignals wurde eine Multifunktionskarte (PCI – 6111 E, National Instruments) unter der Software LabView (National Instruments) programmiert [Stehle *et al.*, 2002a]. Ein Laser ist auf die Rückseite des Kraftaufnehmers gerichtet und wird von dort auf einen Detektorschirm reflektiert. Bei einer Längenänderung der fixierten Myofibrille wird die Position des Kraftaufnehmers verändert, was in einer Ablenkung des Lasers resultiert (Abb. I –10, gestrichelte rote Linie). Diese Ablenkung wird über den Detektor registriert und in ein elektronisches Signal umgewandelt, welches anschließend in einem speziellen Datenverarbeitungsprogramm (LabView) ausgewertet werden kann.

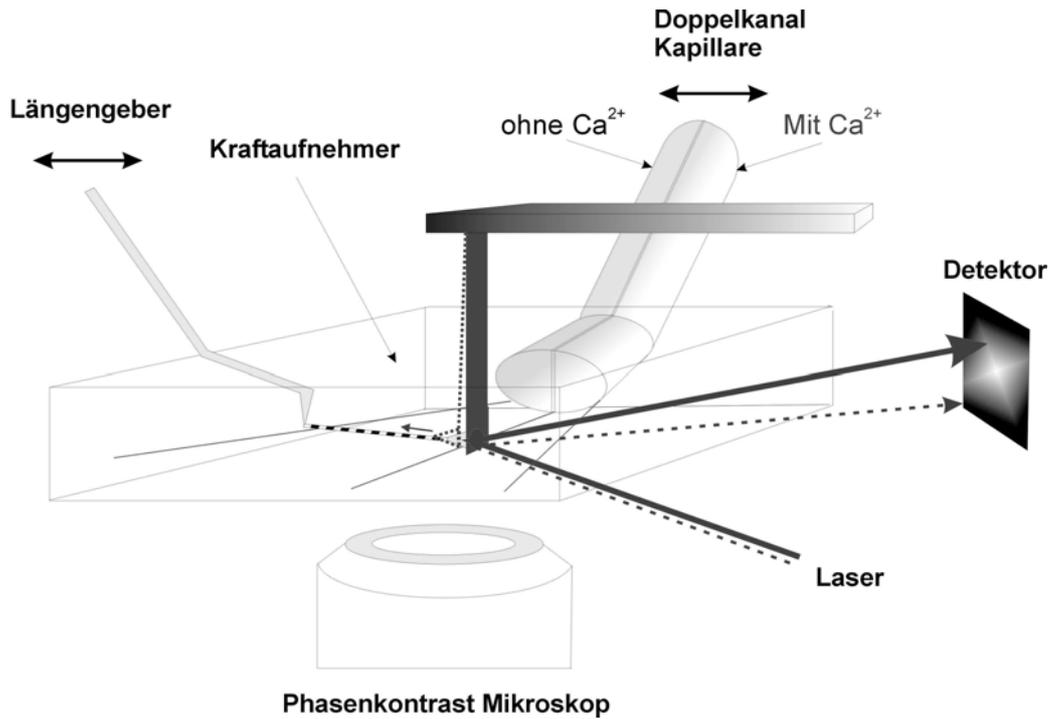


Abb. I-10. Schematischer Aufbau der Apparatur für Kraftmessungen an Myofibrillen. Die Myofibrille wird zwischen einem Längengeber und der Spitze eines Forcecantilevers befestigt. Eine doppelkanalige Lösungskapillare setzt die Myofibrille in einen definierbaren Lösungsstrom. Längenänderungen der Myofibrille werden über den reflektierten Laser mittels eines Detektors registriert und als Kraftsignal auf den Computer transferiert. Die Kontraktion und Relaxation einzelner Sarkomere kann über eine an das Phasenkontrast Mikroskop angeschlossene CCD (*charge-coupled device*) Kamera verfolgt werden.

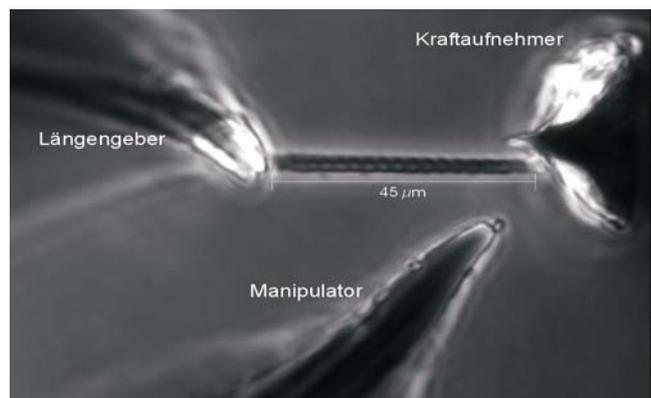


Abb.I-11. Mikroskopische Aufnahme eines zwischen Kraftaufnehmer und Längengeber eingespannten Myofibrillenbündels. Die Abbildung zeigt ein 45 µm langes Myofibrillenbündel, das mit Hilfe des Manipulators zwischen Kraftaufnehmer und Längengeber eingespannt wurde.

Sowohl in kardialen Myofibrillen der Maus als auch in solchen aus menschlichen Herzen entwickelt sich die Ca^{2+} -induzierte Kraft in einem monoexponentiellen Kurvenverlauf. Die Rate für diese Kraftentwicklung kann durch die Aktivierungskonstante k_{ACT} beschrieben werden [Stehle *et al.*, 2002a]. Abb.I-12 zeigt charakteristische Krafttransienten maximal Ca^{2+} aktivierter kardialer Myofibrillen aus einem Mauserherz und einem menschlichen Spenderherzen [aus Stehle *et al.*, 2002b]. Aufgetragen ist die Kraft [nN] gegen die Zeit [s]. Die beste mathematische Annäherung dieser exponentiellen Kurven ist durch die rote Linien dargestellt.

Der linke Teil der Abb.I-12 zeigt den ganzen Kontraktions-Relaxationszyklus. Zum Zeitpunkt 0s befindet sich die Myofibrille in nominell Ca^{2+} -freier Umgebung⁵ (pCa 7,5) und daher in relaxiertem Zustand. Eine kurze Stauchung („slack“, zum Zeitpunkt 0,2 s) dient dazu, die passive Kraft des gemessenen Präparates zu ermitteln. Nach 0,5 s werden die Myofibrillenbündel durch Wechsel des Lösungsstroms in Ca^{2+} -haltige Lösung (pCa 4,54) gebracht, was eine Kontraktion zur Folge hat. Wechsel zurück zu pCa 7,5 führt dann wieder zum Relaxieren der Myofibrillen. Vergleicht man die Kinetik der Kontraktion und Relaxation bei kardialen Myofibrillen aus Maus (obere Hälfte der Abbildung) mit der bei kardialen Myofibrillen des Menschen ermittelten (untere Hälfte der Abbildung), findet man eine etwa 10-fach verlangsamte Kinetik in den menschlichen Myofibrillen. Auf die spezie-spezifischen Unterschiede soll später noch genauer eingegangen werden.

Trotz der beobachteten kinetischen Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies korrelieren innerhalb eines Krafttransienten die für die Aktivierungskonstante k_{ACT} ermittelten Werte mit der Rate des jeweiligen isometrischen Kraftwiederanstiegs (k_{TR}), welcher unter fortwährender Ca^{2+} -Aktivierung mit einer lastfreie Verkürzung durch den Längengeber ausgelöst wird. Anhand dieser Korrelation lässt sich schlussfolgern, dass k_{ACT} die isometrische Querbrückenumsatzkinetik widerspiegelt [Brenner *et al.*, 1986; Stehle *et al.*, 2002b].

Die rechte Hälfte der Abb. I-12 zeigt die aus den gegebenen Transienten heraus vergrößerte Kinetik des Kraftabfalls, beginnend mit $t = 0$ als Zeitpunkt des Wechsels zu Ca^{2+} -freier Lösung (pCa 7,5). Im Gegensatz zur Aktivierungskinetik zeigt die Relaxation kardialer Myofibrillen stets einen biphasischen Kurvenverlauf. Die Myofibrillen relaxieren in der ersten Phase zunächst langsam und linear für einen Zeitraum beschrieben durch t_{LIN} und mit einer Steigung beschrieben durch k_{LIN} . In der sich anschließenden zweiten Phase erfolgt die

⁵ Die Ca^{2+} -Konzentration wird hier analog zum pH als pCa ausgedrückt ($-\log[\text{Ca}^{2+}]$).

Relaxation dann sehr schnell in einem exponentiellen Kurvenverlauf. Diese exponentielle Phase wird durch die Ratenkonstante k_{REL} beschrieben.

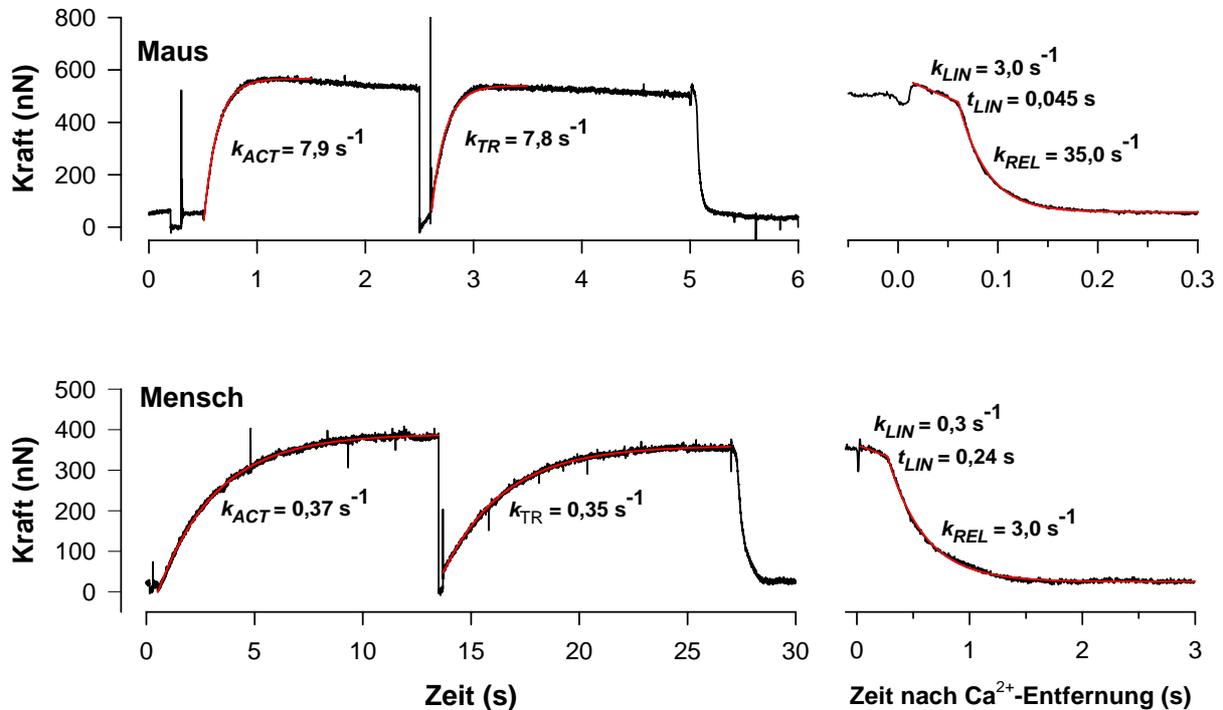


Abb. I-12. Typischer Kontraktions-Relaxationszyklus kardialer Myofibrillen aus Maus und Mensch. Original Krafttransienten isolierter Myofibrillen aus einem Mauserzen (obere Reihe) und aus einem menschlichen Spenderherzen (untere Reihe). Die linke Hälfte zeigt den ganzen Kontraktions-Relaxationszyklus beginnend mit Ca^{2+} -induzierter Kontraktion zum Zeitpunkt 0,5 s (ausgelöst durch Wechsel von pCa 7,5 zu pCa 4,54), Kraftwiederanstieg nach lastfreier Verkürzung und schließlich durch Entfernung der Ca^{2+} -Ionen induzierter Kraftabfall (ausgelöst durch Wechsel von pCa 4,54 zu 7,5). Die rechte Hälfte zeigt die aus den selben Transienten heraus vergrößerte Kinetik des Kraftabfalls, beginnend mit $t = 0$ als Zeitpunkt des Lösungswechsels zu pCa 7,5. Die roten Linien repräsentieren die mathematischen Angleichungen an die Transienten, welche die genannten kinetischen Parameter liefern (aus Stehle *et al.*, 2002b).

Die Biphasizität des Kraftabfalls und sein schnellerer Verlauf gegenüber dem Kraftanstieg bei Ca^{2+} -Aktivierung waren bislang unerklärte Phänomene [Hoskins *et al.*, 1999]. Die simultane Registrierung der Sarkomerstruktur zeigte, dass die Isometrie der einzelnen Sarkomere nur während der Dauer des initialen langsamen Kraftabfalls aufrechterhalten bleibt [Stehle *et al.*, 2002a und 2002b]. Mit dem Beginn des schnellen exponentiellen Kraftabfalls findet dann zunächst die Relaxation eines einzelnen Sarkomers statt, welches dabei gedehnt wird. Im

Fortlauf propagiert die Relaxation von Sarkomer zu Sarkomer entlang der Myofibrille. Durch weitere Messungen konnte gezeigt werden, dass bei diesem Prozess die Wiederbindung von Phosphat an Querbrücken eine Schlüsselrolle spielt [Stehle *et al.*, 2002a und 2002b].

II Zielsetzung der Arbeit

Die Kinetik der Aktivierung und Relaxation von Myofibrillen aus dem Papillarmuskel der Maus kann mit einer speziellen Technik untersucht werden, die auf dem Prinzip der Atomkraftmikroskopie basiert [Stehle *et al.*, 2002a]. Diese Technik ermöglicht nicht nur die Untersuchung der maximalen Ca^{2+} -induzierten Kraft isolierter Myofibrillenbündel, sondern darüber hinaus auch die Analyse der Kinetik von Kraftentwicklung und Relaxation.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Effekte von Kardiomyopathien auf die kontraktile Eigenschaften isolierter kardialer Myofibrillen zu untersuchen. Neben den kinetischen Parametern der Kraftentwicklung und –relaxation sollen dafür auch die passive Kraft (F_{pass}) und die maximale Ca^{2+} -aktivierte Kraft (F_{max}) zu untersuchende Größen sein.

Zu diesem Zweck werden die Effekte von zwei Mutationen des humanen kardialen Troponin I (hcTnI) studiert, deren Vorkommen im Menschen mit dem Auftreten von familiärer hypertropher Kardiomyopathie assoziiert. Hierfür wird ein Protokoll entwickelt das es ermöglicht, spezifische hcTnI-Mutationen in einen rekombinanten hcTn-Komplex einzufügen, und diesen gegen den endogenen Troponinkomplex in kardialen Myofibrillen der Maus auszutauschen. So können die funktionellen Auswirkungen der Mutationen hcTnI G203S und R145G auf die kinetischen Parameter der Kraftentwicklung und –relaxation isolierter Myofibrillen untersucht werden. Durch den gezielten *in-vitro* Austausch der Mutanten und die Analyse am Myofibrillenmodell können Adaptationsprozesse als sekundäre Antwort auf die Mutationen weitgehend ausgeschlossen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit soll geprüft werden, ob auch die Aktivierungs- und Relaxationskinetik von isolierten Myofibrillen aus humanen Spenderherzen mit der hier vorgestellten Methode analysierbar ist, und möglicherweise sogar eine Charakterisierung der Querbrückenkinetik von pathologischen Herzproben zulässt. Hierfür werden Myofibrillen aus nicht-pathologischen Spenderherzen mit denen aus terminal insuffizienten ischämischen (ICM) und dilatierten (DCM) Herzen verglichen.

Die in beiden Teilen der Arbeit erhaltenen Ergebnisse werden darüber Aufschluss geben, inwieweit pathologische Dysfunktion des gesamten Herzens auf die Fehlfunktion der Myofibrillen zurückzuführen ist, und inwiefern pathologisches Spendermaterial für Kraftmessungen an isolierten Myofibrillen geeignet ist.

III Material und Methoden

1 Expression der humanen kardialen Troponinuntereinheiten

1.1 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte nach dem Prinzip von Hanahan (1983). 5 ml LB - Medium (siehe III 1.3) wurden mit dem Bakterienstamm BL21(DE3) infiziert und über Nacht bei 37°C im Bakterienschüttler angezchtet. Diese wurde am nächsten Morgen in einem Verhältnis von 1:100 verdünnt, und bis zu einer OD_(600 nm) = 0,4 bei 37°C weiter geschüttelt. Um das Bakterienwachstum zu stoppen, wurde die Bakterienkultur anschließend für ca.15 min auf Eis inkubiert, bevor sie für weitere 15 min mit 2500 rpm bei 4°C zentrifugiert wurde. Das entstandene Pellet wurde in RF I Lösung resuspendiert und anschließend für ca. 15 - 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (s.o.) wurde das Pellet diesmal in RFII Lösung resuspendiert und ebenfalls für 15 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden aliquotiert und bis zur Verwendung bei – 80°C eingefroren. Für die Durchführung des Protokolls wurden ausschließlich sterilfiltrierte Lösungen und autoklavierte Gefäße verwendet.

RF I

RbCl	100 mM
K-Acetat, pH 5,8	30 mM
CaCl ₂	10 mM
Glycerin	15 %
MnCl ₂	50 mM

RF II

MOPS , pH 6,8	10 mM
RbCl	10 mM
CaCl ₂	75 mM
Glycerin	15 %

1.2 Transformation der kompetenten Zellen

Zur Produktion von hcTnI und hcTnC wurden für die Transformation kompetente Zellen des E.coli Stammes BL21(DE3) verwendet. Die Transformation der kompetenten E.coli wurde nach Hanahan durchgeführt [Hanahan *et al.*, 1983]. Für eine Transformation wurden ca. 50 ng des in TE - Puffer gelösten Plasmides verwendet.

Da die cDNA von hcTnT einige in Bakterien seltene Arginin Codons aufweist, erfolgte hier die Transformation kompetenter Zellen des Stammes BL21 - CodonPlus® (DE3) - RP (Firma Stratagene). Das Transformationsprotokoll entsprach den Angaben des Herstellers.

TE Puffer:

Tris-HCl, pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM

Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide zur Produktion von WT hcTnI und seiner Mutanten (R145G und G203S) wurden uns freundlicherweise durch Dr. Charles Redwood (University of Birmingham) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um pET9a Plasmide mit Kanamycin Resistenz [Vallins *et al.*, 1990].

Die Plasmide zur Produktion von hcTnC und hcTnT wurden durch Dr. I.P. Trayer (University of Birmingham) zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um pET 11c Vektoren mit Ampicillin Resistenz.

1.3 Bakterienanzucht

1.3.1 Anzucht von hcTnI und hcTnC exprimierenden Bakterien

Die hcTnI und hcTnC exprimierenden Bakterien wurden jeweils nach dem gleichen Protokoll in LB - Medium mit 50 µg /ml Selektionsantibiotikum kultiviert. Dabei wurden für hcTnI Kanamycin und für hcTnC Ampicillin als Antibiotikum eingesetzt. Aus

glycerinisierten Gefrierkulturen wurde eine Übernacht - Kultur in LB –Medium bei 37 °C hergestellt. Die Schüttlerfrequenz betrug 220-250 rpm. Am nächsten Morgen wurde die Übernacht-Kultur in einem Verhältnis von 1:100 in frischem LB - Medium verdünnt und weiter kultiviert, bis die $OD_{600} = 0.6$ betrug. Die nachfolgende Induktion der Plasmidexpression erfolgte durch Gabe von 0.4 mM IPTG. 3 - 4 h nach Induktion wurden die Bakterienzellen durch 15 min Zentrifugation mit 7000 x g pelletiert.

1.3.2 Anzucht von hcTnT exprimierenden Bakterien

Auch aus den hcTnT exprimierenden Bakterien wurde zunächst bei 37°C eine 1 ml Übernacht - Kultur in LB - Medium hergestellt. Dieses Medium enthielt sowohl 50 µg/ml Chloramphenicol als auch 50 µg/ml Kanamycin als Selektionsantibiotika. Diese Kultur wurde am nächsten Morgen in einem Verhältnis von 1:20 mit frischem LB-Medium verdünnt, und für weitere zwei Stunden bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Kultur mit 1mM IPTG induziert und erneut für 2 - 3 Stunden geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen für 15 min bei 7000 x g zentrifugiert und das Pellet zur Proteinreinigung weiterverwendet (siehe III-2-x).

LB - Medium

Fertigmedium der Firma Invitrogen

(„Luria Broth Base“)

25 g ad 1000 ml aqua bidest.

Bei 120°C für 20 min feucht autoklaviert

2 Isolation der rekombinanten Troponinuntereinheiten aus *E.coli*

Für die chromatographische Proteinreinigung wurde eine LCC-501 Plus FPLC-Anlage der Firma Amersham Biosciences verwendet. Zur Isolierung der Tn-Untereinheiten wurden Ionenaustauscher Materialien (Firma Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) in XK 16/20 Säulen mit einem Füllvolumen von 25 ml eingesetzt. Dabei wurde Carboxymethyl (CM)-Sephrose™ als Kationen-Austauscher und Diethylaminoethyl(DEAE)-Sephrose™ als Anionen-Austauscher eingesetzt. Befüllen, Regeneration und Lagerung der Säulen erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers.

Nach jeder Chromatographie wurden die Elutionsfraktionen durch eine SDS-PAGE auf ihren TnI, TnC bzw. TnT-Gehalt überprüft. Nur die Fraktionen mit dem jeweils gewünschten Protein wurden für die weiteren Versuche verwendet.

2.1 Chromatographische Isolierung von rekombinantem hcTnI aus *E.coli*

Bakterienpellets wurden in Harnstoff - Homogenisationspuffer resuspendiert, wobei 5 ml Puffer für ein Pellet aus 250 ml Bakterienkultur eingesetzt wurden. Die resuspendierten Bakterien wurden mit 6 x 15 s Intervallen Ultraschall (Branson Sonifier® Modell 450D, Schallkopf Typ 102-C, Branson, Danbury, USA) lysiert und die Zellüberreste durch Zentrifugation bei 13.000 x g für 15 min. pelletiert. Die resultierende Proteinlösung im Überstand wurde über Nacht (mind. 6 h) durch Dialyse in TnI CM-Sephrose Puffer A umgepuffert (SnakeSkin ® Dialysis tubing, Fa. Piere). Parallel dazu wurde die CM-Sephrose FF Säule mit dem gleichen Puffer äquilibriert. Die Proteinlösung wurde auf die Säule gebracht und mit steigender Konzentration des NaCl-haltigen TnI CM-Sephrose Puffer B eluiert (Flussgeschwindigkeit 1 ml/min). Sowohl hcTnI Wildtyp als auch die isolierten hcTnI Mutanten eluierten bei einer Leitfähigkeit von etwa 12 - 15 mS, was einer Puffer B Konzentration von ca. 40% entsprach. HcTnI enthaltende Fraktionen wurden über SDS-PAGE identifiziert, vereinigt und anschließend ausgiebig gegen 1 mM HCl dialysiert. Zum Abschluss wurde das gereinigte Protein gefriergetrocknet (lyophilisiert) und bei – 80°C gelagert (*alpha 1-2* Lyophylle der Fa. Christ).

Harnstoff - Homogenisationspuffer

TEA-HCl, pH 7,5	25 mM
Harnstoff	8 M
EDTA	5 mM
DTT	1 mM
AEBSF	1 mM

TnI CM-Sepharose Puffer A

TEA-HCl, pH 7,5	25 mM
Harnstoff	8 M
EDTA	2 mM
DTT	1 mM

TnI CM-Sepharose Puffer B

Wie Puffer A + 0,5 M NaCl

2.2 Chromatographische Isolierung von rekombinantem hcTnT aus *E.coli*

HcTnT wurde nach einer Methode von Potter *et al.* (1982) isoliert. Die Bakterien wurden wie unter III 2.3 beschrieben in Harnstoff – Homogenisierungspuffer aufgeschlossen und die gewonnene Proteinlösung gegen TnT CM-Sepharose Puffer A dialysiert. Auf die CM-Sepharose Säule aufgetragen, wurde mit TnT CM-Sepharose Puffer B ein flacher NaCl – Gradient angelegt. HcTnT eluierte bei ca. 10 mS, was einer Puffer B Konzentration von etwa 18 % entspricht. Die hcTnT enthaltenden Fraktionen wurden über SDS-PAGE ermittelt, vereinigt und durch Dialyse in TnT DEAE-Sepharose Puffer A umgepuffert. Auf die DEAE-Sepharose Säule wurde nach Auftragen der Proteinprobe ein NaCl Gradient (10 - 40 % Puffer B, Flussgeschwindigkeit 1 ml/min) gegeben. TnT eluierte bei etwa 25 % Puffer B. Die Proteinzusammensetzung der eluierten Fraktionen wurde auch hier mittels SDS-PAGE bestimmt. Die gereinigte TnT-Lösung wurde über Nacht gegen 1 mM Ammoniumhydrogencarbonat dialysiert und anschließend lyophilisiert. Das Protein wurde anschließend bei - 80°C gelagert.

TnT CM-Sepharose Puffer A

Na-Citrat, pH 6,0	50 mM
Harnstoff	6 M
EDTA	1 mM
DTT	0,1 mM

TnT CM-Sepharose Puffer B

Wie A + 0,5 M NaCl

TnT DEAE-Sepharose Puffer A

Tris-HCl, pH 8,0	50 mM
Harnstoff	6 M
EDTA	1 mM
DTT	0,1 mM

TnT DEAE-Sepharose Puffer B

Wie A + 1,0 M NaCl

2.3 Chromatographische Isolierung von rekombinantem hcTnC aus *E.coli*

In der vorliegenden Arbeit wurde als Säulenmaterial Phenyl-Sepharose™ high performance (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) verwendet. Als Ligand ist hier eine Phenylgruppe über Ätherbindung mit einer Sepharosematrix verknüpft. Es wurde eine XK 16/20 Säule mit 25 ml Säulenmaterial befüllt.

HcTnC wurde nach einem Protokoll von Xu & Hitchcock-DeGregori (1988) isoliert. Die Bakterienpellets wurden in Homogenisationspuffer gelöst, wobei wie für hcTnI ca. 5 ml Puffer für ein Pellet aus 250 ml Bakterienkultur eingesetzt wurden. Die resuspendierten Bakterien wurden wie unter III 2.3 beschrieben in Harnstoff – Homogenisierungspuffer aufgeschlossen und die Zellüberreste durch Zentrifugation bei 13.000 x g für 15 min. pelletiert. Der Überstand wurde über Nacht durch Dialyse in Ca²⁺-haltigen TnC Phenyl-Sepharose Säulenpuffer umgepuffert. Parallel dazu wurde die Phenyl - Sepharose Säule mit dem gleichen Puffer äquilibriert. Die Probe wurde auf die Säule gebracht und

anschließend mit TnC Phenyl-Sepharose Waschpuffer gewaschen. Das Protein eluierte anschließend nach Gabe von EDTA-haltigem TnC Phenyl-Sepharose Elutionspuffer. Die Flußgeschwindigkeit betrug während des ganzen Protokolls 1ml/min. Die hcTnC enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, gegen 1 mM HCl dialysiert, lyophilisiert und wie hcTnI bei -80°C gelagert.

Homogenisationspuffer

TEA-HCl, pH 7,5	25 mM
EDTA	5 mM
DTT	1 mM
AEBSF	1 mM

TnC Phenyl-Sepharose Säulenpuffer

Tris-HCl, pH 7,5	50 mM
NaCl	50 mM
CaCl ₂	5 mM
MgCl ₂	1 mM
DTT	1 mM

TnC Phenyl-Sepharose Waschpuffer

Tris-HCl, pH 7,5	50 mM
CaCl ₂	0,1 mM
NaCl	1,0 M
DTT	1,0 mM

TnC Phenyl-Sepharose Elutionspuffer

Tris-HCl, pH 7,5	50 mM
EDTA	1 mM
DTT	1mM

3 Isolierung von sTn aus Skelettmuskulatur

Die Isolierung von skelettalem Troponin (sTn) erfolgte nach einem Protokoll von Chong & Hodges (1981).

Ein Kaninchen (weißer Neuseeländer, ca. 3 Monate alt) wurde durch eine intramuskuläre Injektion der Anästhetika und Analgetika Ketanest und Rompun betäubt und anschließend mit einer KCl - Injektion ins Herz getötet. Alle größeren Skelettmuskeln wurden präpariert und zunächst auf Eis gekühlt, um dann sowohl Fett als auch Fascien und Blutgefäße zu entfernen. Die kleingeschnittenen Muskelstücke wurden in Portionen mit einem vorgekühlten Küchen-Mixer ca. 10 s in Guba-Straub Lösung homogenisiert. Im Anschluss daran wurde das Homogenat für 10 min. bei 4°C gerührt, ehe es mit 4200 rpm bei gleicher Temperatur für 15 min. zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet in 3 l Resuspensionspuffer gelöst und anschließend für 5 min. mit 4200 rpm zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal mit kaltem aqua bidest. wiederholt. Das Pellet wurde im nächsten Schritt in LiCl-Lösung resuspendiert, PMSF (1mM) und 2 mM β -Mercaptoethanol wurden frisch zugegeben. Diese Suspension wurde bei 4°C für 2 h gerührt, bevor sie bei 4200 rpm für 15 min. zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde anschließend durch mehrere Lagen Glaswolle filtriert und mit einer 1 M Tris-Lösung auf pH 7.6 titriert. In der nachfolgenden fraktionierten Ammoniumsulfat -Fällung wurden zunächst die meisten Muskelproteine mit 40 % Ammoniumsulfat gefällt. Im Bereich von 45-55 % Ammoniumsulfat präzipitierte das sTn und konnte durch 25 min. Zentrifugation bei 4200 rpm pelletiert werden. Das sTn Pellet wurde in einer Ammoniumhydrogencarbonat Lösung aufgenommen und gegen die gleiche Lösung über Nacht dialysiert. Das Dialysat wurde im Anschluss in flüssigem N₂ schockgefroren und dann gefriergetrocknet. Der lyophilisierte Komplex wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Guba-Straub Puffer

KCl	300 mM
Kaliumphosphat, pH 7,0:	
K ₂ HPO ₄	90 mM
KH ₂ PO ₄	65 mM
ATP	1 mM

Resuspensionspuffer

KCl	150 mM
NaHCO ₃ , pH 7,0	2 mM

LiCl Lösung

NaOAc, pH 4,5	100 mM
LiCl	800 mM

Ammoniumhydrogencarbonat - Lösung

NH ₄ HCO ₃	1 mM
β-Mercaptoethanol	1 mM

4 Methoden zum Proteinnachweis

4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach dem Prinzip von Laemmli durchgeführt (1970). Zum Nachweis von TnC wurden Trenngelle mit 15 % AA/BA verwendet, für den Nachweis von TnT und TnI jeweils solche mit 12.5 %. Die Prozentigkeit des Sammelgels blieb in allen Fällen gleich. In der Regel wurden Minigele hergestellt, die für SE 250 Mighty Small Gelapparaturen der Firma HOEFER verwendet werden können.

Trenngel

AA/BA (30/0,8) (v/v)	12,5 oder 15 %
SDS (w/v)	0,1 %
Tris-HCl, pH 8,8	0,375 M
Glycin (v/v)	2,5 %
APS (w/v)	0,05 %
TEMED	0,05 %

Sammelgel

AA/BA (30/0,8) (v/v)	3,3 %
SDS (w/v)	0,1 %
Tris-HCl, pH 6,8	0,125 M
APS (w/v)	0,1 %
TEMED (w/v)	0,1 %

Die aufzutragenden Proteinproben wurden zunächst in Laemmli-Puffer aufgenommen und nachfolgend für 5 min. bei 95 °C denaturiert. Falls nicht anders angegeben, wurden für eine Coomassie Färbung etwa 10-12 µg Gesamtprotein pro Spur aufgetragen, für einen Western Blot lediglich 3-7 µg. Die Proteinbestimmung der zu untersuchenden Proben erfolgte nach Bradford (1976). Für das Sammelgel wurde eine Stromstärke von 15 mA pro Gel, für das Trenngel je 20 mA angelegt.

Für die Trennung einzelner Troponin I oder Troponin T Isoformen wurde eine SE 600 Standard Gelapparatur (HOEFER) mit 14 cm langen Polyacrylamid-Gelen (12,5 % AA) verwendet. Die verlängerte Laufstrecke führt zu einer stärkeren Auflösung im Bereich 25 – 40 kDa. Die aufgetragene Probenmenge lag hier bei 10 µg (Western Blot) bzw. 20 µg (Coomassie Färbung), falls nicht anders angeführt. Der Lauf dieser größeren Gele wurde konstant mit einer Stromstärke von 25 mA durchgeführt.

Auf jedem Gel wurde zusätzlich ein vorgefärbter Molekulargewichtsstandard (MW-Standard; broad range prestained SDS-Marker, Fa. Bio-Rad) aufgetragen. Die aufgetragene Proteinmenge entsprach den Angaben des Herstellers.

Laemmlipuffer

Tris-HCl, pH 6,8	0,05 M
Glycerin (v/v)	10,0 %
SDS (w/v)	1,00 %
DTT	0,02 M
Bromphenolblau (w/v)	0,01 %
Harnstoff	4,00 M

SDS-Laufpuffer

Tris-HCl, pH 8,3	0,025 M
Glycin	0,192 M
SDS (w/v)	0,100 %

4.2 Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen durch Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250®

Die Detektion der aufgetrennten Proteine erfolgte mit Hilfe des organischen Farbstoffes Coomassie BrilliantBlue R-250®. Dieser bindet in saurem Medium an freie geladene Amino- und Iminogruppen der Proteine. Die Nachweisgrenze der Coomassie-Färbung liegt bei ca. 0,3 – 0,5 µg Protein pro Gelbande.

Für die Anfärbung wird das Polyacrylamidgel zunächst für 1 h in der Coomassie-Lösung inkubiert und anschließend mit Entfärber 1 (0,5 – 1 h) und Entfärber 2 (1 – 2 h) entfärbt, bis deutliche Proteinbanden im Gel sichtbar werden.

Coomassie-Lösung

Coomassie BrilliantBlue R-250®	0,25 %
Methanol (v/v)	40,00 %
Essigsäure (v/v)	10,00 %

Entfärber 1

Ethanol (96% vergällt)	50,00 %
Essigsäure (v/v)	7,00 %

Entfärber 2

Ethanol (96%, vergällt) (v/v)	5,00 %
Essigsäure (v/v)	7,00 %

4.3 Western Blot Analyse

Für den biochemischen Nachweis des Tn Austausches in Myofibrillen wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Mit dieser immunologischen Technik lassen sich sehr geringe Mengen eines Proteins nachweisen. Dazu führt man zunächst mit den zu untersuchenden Proben eine SDS-PAGE durch. Die aufgetrennten Proteine werden dann von dem Gel auf eine Polymerschicht übertragen. In dieser Arbeit fand der Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran (PROTRAN, Schleicher & Schuell) mit einer Porengröße von 0,1 µm statt. Es wurde die Methode des Tank Transfer Western Blots nach Towbin *et al.* (1979) angewendet. In der Blotkammer wurde zwischen Kathode und Anode der Blot-Apparatur (IdeaScientific) folgender Sandwich aufgebaut. Auf in Blotpuffer getränkte Schwämme wurden drei bis vier Lagen ebenfalls getränktes Filterpapier (Schleicher und Schuell, GB002) gelegt. Das Polyacrylamidgel wurde auf diese Filterpapierschicht gelegt, die in Blotpuffer äquilibrierte Nitrocellulose-Membran dann vorsichtig auf dem Gel platziert. Bevor die Anodenplatte aufgelegt wurde, wurden zunächst erneut in Blotpuffer getränkte Filterpapiere und Schwämme aufgelegt. Der Tank der Blotapparatur musste mit ausreichend Blotpuffer gefüllt werden, damit die Gel und Membran vollständig mit Flüssigkeit bedeckt waren. Der Methanolanteil im Blotpuffer wird je nach Größe des zu untersuchenden Proteins angepasst. Für den Transfer der in dieser Arbeit untersuchten niedermolekularen Proteine wurde mit einer Methanolkonzentration von 20% gearbeitet. Für den Proteintransfer wurde bei der verwendeten Apparatur für 90 min eine Spannung von 24 V angelegt. Nach Beendigung des Transfers wurde die Blotmembran kurz mit Aqua bidest gespült und konnte bei Bedarf mit Ponceau-Rot® gefärbt werden (s.u.).

Blotpuffer

Tris-Base, pH 8,0	0,325 M
Glycin	0,192 M
SDS (w/v)	0,1 %
Methanol (v/v)	20 %

4.4 Färbung der transferierten Proteine mit Ponceau-Rot® nach Salinovich & Montelaro (1986)

Um die Effizienz des Proteintransfers zu überprüfen, können die transferierten Proteine mit Hilfe dieser reversiblen Färbemethode auf der Blotmembran sichtbar gemacht werden. Die Nitrocellulose Membran wird dazu kurz mit Aqua bidest gespült und dann für wenige Minuten in Ponceau-Lösung geschwenkt. Die Nachweisgrenze des Ponceau-Rot® liegt bei ca. 250 – 500 ng /Proteinbande. Anschließend kann das Ponceau-Rot® durch gründliches Spülen mit Aqua bidest wieder von der Membran gewaschen werden. Der Farbstoff Ponceau-Rot® (Sigma) wurde nach Angaben des Herstellers in Aqua bidest gelöst und direkt verwendet.

4.5 Western Blot - Entwicklung durch Antikörper-gebundene Peroxidase-Reaktion

Um unspezifische Bindungen der Antikörper auf der Membran zu verhindern, wird diese zunächst für 2 - 4 h mit Milchpulver-Lösung blockiert. Nach etwa einstündigem Waschen in TBST wird die Membran dann mit dem ersten Antikörper inkubiert. Um das Volumen zu verringern, wird die Membran dazu mit 2 - 4 ml Antikörper Lösung in Frischhaltefolie luftdicht eingeschweißt. Die Konzentrationen der Antikörper in TBST können Tab.III-1 entnommen werden. Es wird entweder für 1 - 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlraum (8 °C) inkubiert. Überschüssige Antikörper werden durch mehrfaches Waschen in TBST entfernt. Die Inkubation mit Peroxidase-konjugierten Zweitantikörpern fand bei Raumtemperatur für 1 h statt. Zum Abschluss der Antikörperbehandlung wird die Blotmembran mehrmals mit TBST für ein paar Minuten gewaschen. Zur Entwicklung des Blots dient das „Enhanced Chemiluminescence System“ (ECL, Amersham oder Pierce), welches den Angaben des Herstellers folgend verwendet wird. Anschließend wird die Blotmembran mit einem Röntgenfilm (Fuji RX) inkubiert, wobei die Expositionszeiten je nach Antikörper und Probenmenge zwischen einigen Sekunden und einigen Minuten liegen. Die Entwicklung und Fixierung des Films erfolgt mit GBX-Entwickler und – Fixierer für jeweils 2 min.

TBST (Tris buffered saline plus Tween®-20)

Tris-HCl, pH 8,0	10 mM
NaCl	150 mM
Tween®-20 (v/v)	0,05 %

Milchpulver-Lösung

5% Milchpulver in TBST

Tab. III-1. Angaben über eingesetzte Antikörper und die verwendeten Verdünnungen.

	Spezifizierung/ Eingesetzte Konzentration	Firma
Maus-Anti - Troponin T, MAb	Klon JLT-12 1:1000 in TBST	Sigma
Maus-Anti - cardiac Troponin I	Klon 6F9 kreuzreagierend mit fsTnI 1:1000 in TBST	Biodesign International
Goat - anti-TnI peptide	erkennt nur cTnI 1:500 in TBST	BiosPacific
Goat - anti Troponin C (C- 20)	gegen humanes TnC 1:500 – 1:1000 in TBST	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Donkey Anti-Mouse IgG	Peroxidase-konjugierter Zweitantikörper 1:10000 in TBST	Jackson ImmunoResearch
Donkey Anti-Goat IgG	Peroxidase-konjugierter Zweitantikörper 1:10000 - 1:20000 in TBST	Jackson ImmunoResearch

5 Rekonstitution des hcTn Komplexes

Die chromatographisch gereinigten rekombinanten hcTn Untereinheiten wurden mit Hilfe eines von Potter *et al.* (1982) veröffentlichten Protokolls zu einem heterotrimeren Proteinkomplex rekonstituiert. Dazu wurden die Untereinheiten in einem Verhältnis von 1:1:3 (TnI:TnT:TnC) in Rekonstitutionspuffer gelöst und anschließend für 1 h auf Eis inkubiert. Um die Proteine langsam zu renaturieren und somit die Komplex Bildung zu ermöglichen, wurde der Harnstoff gegen eine hohe Konzentration an NaCl (1 M) ersetzt. Dazu wurde die Proteinlösung ausgiebig und wiederholt gegen NaCl Dialysepuffer 1 dialysiert (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette, Fa. Pierce). In den nachfolgenden Dialyseschritten (NaCl Dialysepuffer 2 - 4) wurde die Konzentration von NaCl wieder auf 0.3 M erniedrigt. Abschließend wurde die Proteinlösung durch erneute Dialyse in den im Austauschprotokoll verwendeten Rigor Lösung (s. III.7) gebracht. Vor der Anwendung des rekonstituierten Komplexes wurde die Proteinlösung durch einen Spritzenaufsatz filtriert, um mögliche Präzipitate zu entfernen.

Rekonstitutionspuffer

MOPS, pH 7,0	25 mM
NaCl	200 mM
CaCl ₂	500 mM
DTT	1 mM
Harnstoff	8 M

NaCl Dialysepuffer 1

MOPS, pH 7,0	25 mM
NaCl	1 M
CaCl ₂	0.5 mM
DTT	1 mM

NaCl Dialysepuffer 2

MOPS, pH 7,0	25 mM
NaCl	0.75 M
CaCl ₂	0.5 mM
DTT	1 mM

NaCl Dialysepuffer 3

MOPS, pH 7,0	25 mM
NaCl	0.5 M
CaCl ₂	0.5 mM
DTT	1 mM

NaCl Dialysepuffer 4

MOPS, pH 7,0	25 mM
NaCl	0.3 M
CaCl ₂	0.5 mM
DTT	1 mM

6 Fluoreszenzmarkierung des Troponinkomplexes

Der Troponinkomplex wurde zunächst in Reduktionspuffer gelöst (1 mg/ml) und im Wasserbad bei 30 °C für 1 h inkubiert. Anschließend wurde der DTT Überschuss durch ausgiebige Dialyse gegen Label-Dialysepuffer auf 0,1 mM reduziert. Für die Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff wurde ein 5-fach molarer Überschuss an Rhodamin (Tetramethylrhodamine-5-iodacetamid Dihydroiodid) zugegeben und die Troponinlösung für 4 h bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch einen Überschuss an DTT gestoppt. Um ungebundenen Farbstoff zu entfernen, wurde die Lösung anschließend über Nacht gegen Rigorpuffer (s.III.7) dialysiert. Der fluoreszenzmarkierte Troponinkomplex wurde lichtgeschützt verpackt im Kühlschrank (4–8 °C) bis zu einer Woche aufbewahrt.

Reduktionspuffer

KCl	100 mM
Natriumphosphat, pH 6,5 (NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄)	20 mM
EDTA	1 mM
DTT	2 mM

Label-Dialysepuffer

KCl	30 mM
Imidazol, pH 6,5	10 mM
MgCl ₂	1 mM
EGTA	1 mM
DTT	0,1 mM

7 Kraftmessungen an kardialen Myofibrillen

7.1 Präparation von Kardiomyofibrillen aus Mauserzen

Für die Isolierung von kardialen Myofibrillen wurden erwachsene, männliche Mäuse (Stamm *Him of 1*) durch Genickbruch getötet, und die noch kontrahierenden Herzen zum Ausbluten in Rigor Lösung gegeben. Auf einem vorgekühlten Präparationsblock wurden die Herzen anschließend fixiert, um zunächst die Vorhöfe, Blutgefäße und umgebendes Bindegewebe zu entfernen. Die Herzen wurden entlang des Septums aufgeschnitten und schmetterlingsförmig aufgeklappt. Aus dem linken Ventrikel wurden nun die Papillarmuskeln im Ganzen heraus präpariert und für den „Häutungsprozess“ in ein mit Rigor-Skinninglösung gefülltes Eppendorf-Gefäß gegeben. Die Fasern wurden dann bei ca. 8°C für 6-12 h chemisch gehäutet. Nach dieser Zeit wurde die Rigor-Skinninglösung durch Rigor-Lösung (ohne Triton-X-100) ersetzt. Die gehäuteten Papillarmuskeln konnten für mehrere Tage ohne Beeinträchtigung der Funktion im Kühlschrank bei ca. 8°C aufbewahrt werden.

Um einzelne Myofibrillen zu isolieren, wurden die Papillarmuskeln in einem mit kaltem aqua bidest. vorgekühlten Ultra Turrax (Ultra Turrax T25, Fa. Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik) für etwa 12-15 s in Rigor Lösung homogenisiert. Um Bindegewebsreste und Agglomerate zu entfernen, wurde diese Myofibrillen Suspension abschließend durch Filter mit einer Porengröße von 30 μm filtriert. Diese Suspension wurde vor jedem Experiment frisch hergestellt und zur weiteren Verwendung für maximal einen Tag auf Eis gelagert.

Rigor-Lösung

NaCl	132 mM
KCl	5 mM
MgCl ₂	1 mM
TRIS	10 mM
EGTA	5 mM
Natriumazid	1 mM
pH 7,1	

Inhibitorcocktail in Rigorlösung

AEBSF	0,5 mM
Leupeptin	10 μM
Antipain	10 μM
Aprotinin	5 $\mu\text{g/ml}$

Rigor-Skinninglösung

Wie Rigor Lösung + 1% (v/v) Triton-X-100

7.2 Präparation von Kardiomyofibrillen aus menschlichen Spenderherzen

Die menschlichen Herzproben wurden unserem Labor nach Herztransplantation an Patienten mit ischämischer bzw. idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie im Endstadium von der Klinik für Innere Medizin III (Direktor Prof. Dr. Erdmann) der Universität zu Köln zur Verfügung gestellt. Die Vergleichsproben entstammten Spenderherzen, welche aus technischen Gründen nicht zur Transplantation eingesetzt

werden konnten. Bei keinem verwendeten Spenderherzen bestand ein klinischer, bzw. echokardiographischer Verdacht auf eine linksventrikuläre Dysfunktion.

Alle Herzen wurden von Entnahme bis zur Präparation in eiskalter Brettschneider-Lösung gelagert. Die Präparation erfolgte in ebenfalls eiskalter Skinning-Lösung ohne Triton-X-100. Es wurden schmale Streifen aus dem linken Ventrikel sowie Streifen aus den Trabekeln des linken Ventrikels präpariert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese Präparate wurden anschließend bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Präparation von kardialen Myofibrillen wurden die tiefgefrorenen Präparate direkt in Skinning-Lösung mit Triton-X-100 gegeben, in etwa $10 \times 0,4$ mm große Streifen präpariert und für 8-12 h in der gleichen Lösung gehäutet. Die Muskelproben wurden anschließend in Skinning-Basislösung überführt und bis zu vier Tage im Kühlschrank gelagert. Die Isolation von Myofibrillen erfolgte durch Homogenisation in Skinning-Basislösung, wie in III.7 für Mauserherzen beschrieben.

Alle von uns durchgeführten Untersuchungen an humanen Herzproben entsprachen den in der Helsinki Deklaration festgelegten Bestimmungen, und wurden darüber hinaus von der lokalen Ethik Kommission geprüft und bewilligt.

Brettschneider Lösung

NaCl	15 mM
KCl	10 mM
MgCl ₂	4 mM
Histidine HCl	180 mM
Tryptophan	2 mM
Mannitol	30 mM
Kaliumdihydrogenoxoglutarat	1 mM

Skinning Basislösung

K-Phosphat, pH 6,8	5 mM
Na-Azid	5 mM
Mg-Acetat	3 mM
K ₂ EGTA	5 mM
Na ₂ ATP	3 mM
(inklusive 3 mM MgCl ₂ und 6 mM KOH)	

Na-Kreatinphosphat	47 mM
DTT	2 mM
Inhibitorcocktail (s.o)	

Skinning Lösung mit Triton-X-100

Wie Skinning Basislösung + 1 % (v/v) Triton-X-100

7.3 Austausch des Troponinkomplexes in Kardiomyofibrillen der Maus

Um den endogenen Tn Komplex gegen einen exogenen auszutauschen, wurde eine Suspension kardialer Myofibrillen in Rigor Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem Überschuss (1 mg/ml) Tn Komplex auf einem Schüttler inkubiert. Nach dieser Stunde wurde die Lösung für 3 min mit 3000 x g zentrifugiert und das Myofibrillen Pellet in Rigor Lösung resuspendiert. Für Western Blot Analysen dieses Austausches wurde das Myofibrillen Pellet 3x für 1 min. in Rigor Lösung gewaschen, um überschüssigen Tn Komplex zu entfernen, bevor es in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen wurde.

7.4 Fixierung von Myofibrillen für die Mikroskopie

Für einen Nachweis des Austausches unter Verwendung von fluoreszenzmarkiertem Troponin Komplex wurden die behandelten Myofibrillen für die Lichtmikroskopie fixiert. Dazu wurden in eine 24-well Zellkulturplatte runde Deckgläschen (Ø 12 mm, Fa. Roth) gelegt und zunächst mit steriler Gelatine (0,1 % in aqua bidest.) beschichtet. Anschließend wurde diese für 1 h bei 37°C mit sterilfiltrierter BSA-Lösung abgesättigt. Die zu fixierende Myofibrillen Suspension wurde für 3 - 6 h bei 4 - 8 °C auf die Deckgläschen gegeben, um sich abzusetzen. Nach dieser Zeit wurde der Überstand vorsichtig entfernt und die Deckgläser vorsichtig mit Rigor Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Myofibrillen für 20 min. mit 2,5 % Paraformaldehyd (in PBS) inkubiert. Zum Abschluss wurden die Deckgläschen noch ein weiteres Mal mit Rigor Lösung gewaschen, bevor sie mit Mowiol-Lösung (Gelvatol, Fa. Aldrich) auf einen Objektträger fixiert wurden. Nach

wenigen Stunden war das Präparat vollständig ausgehärtet und konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden.

Gelatine

Gelatine, pork skin	0,1 %
in aqua bidest	

BSA-Lösung

BSA	3 %
in Rigor Lösung	

Paraformaldehyd

Paraformaldehyd	2,5 %
in PSS	

PSS (physiologische Salzlösung)

NaCl	118 mM
KCl	5 mM
Na ₂ HPO ₄	1,2 mM
MgCl ₂	1,2 mM
CaCl ₂	1,6 mM
HEPES	24 mM
Glukose	10 mM

mit 1M NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

Mowiol –Lösung (= Gelvatol-Lösung)

Gelvatol
Polyvinylalkohol, 83-87% hydrolysiert
MW 13-23000
Als Fixativ angesetzt nach Heimer & Taylor (1974)

7.5 Kraftmessungen an Kardiomyofibrillen

Für die Kraftmessungen wurde die Myofibrillen - Suspension zunächst in die gekühlte, mit Relaxationslösung gefüllte Messkammer gegeben, in der sich die Myofibrillen 1–2 h absetzten. Anschließend wurde eine Myofibrille in Anwesenheit von Relaxationslösung in die Apparatur installiert. Über ein geeichtes Okularmikrometer konnte die Gesamtlänge und Dicke der Myofibrille bzw. des Myofibrillenbündels bestimmt werden, um die Sarkomerlänge durch Dehnen des Präparates über den Längengeber auf 2,3 μm

einzustellen. Über das Messprogramm wurde vor Induktion der Kontraktion ein sogenannter „slack“ auf die Myofibrille appliziert. Dabei wurde das Präparat durch den Längengeber für den Bruchteil einer Sekunde um etwa 15 % seiner Gesamtlänge gestaucht. Durch diese Verkürzung lässt sich eine passive Restkraft in Abwesenheit von Ca^{2+} registrieren und später in die Auswertung der Kraftmessung mit einbeziehen. Über die doppelkanalige Kapillare wurde die Myofibrille von dem Strom mit Ca^{2+} - freier Relaxationslösung in den mit Ca^{2+} -haltiger Aktivierungslösung überführt. Die Dauer der Aktivierung wurde über das individuelle Messprogramm festgelegt und lag zwischen 1 - 1,5 s für Myofibrillen aus Mäusen und zwischen 8 und 10 s für kardiale Myofibrillen des Menschen. Die Kraftentwicklung wurde für verschiedene Ca^{2+} -Konzentrationen registriert, um später die Ca^{2+} -Sensitivität bestimmen zu können. Dafür wurden Relaxations- und Aktivierungslösung in definierten Verhältnissen gemischt. Die Ca^{2+} -Konzentration wird als pCa ausgedrückt ($-\log[\text{Ca}^{2+}]$). Der pCa-Wert einer jeweiligen Lösung wurde mit einem Computerprogramm nach Fabiato *et al.* (1988) errechnet und mittels einer Ca^{2+} -Elektrode bestätigt. Alle in dieser Arbeit durchgeführten Kontraktions- und Relaxationsmessungen an kardialen Myofibrillen wurden bei 10°C durchgeführt.

Relaxationslösung

Imidazol, pH 6,85 bei 20°C	10 mM
EGTA	3 mM
Na_2MgATP	1 mM
MgCl_2	3 mM
Na_2CrP	47,7 mM
DTT	2 mM

Aktivierungslösung

Imidazol, pH 6,85 bei 20°C	10 mM
CaEGTA	3 mM
Na_2MgATP	1 mM
MgCl_2	3 mM
Na_2CrP	47.7 mM
DTT	2 mM

7.6 Datenanalyse

Für die Analyse der gemessenen Daten wurde das Programm LabView (National Instruments) verwendet. Die Programmierung erfolgte durch Dr. Stehle.

Aktivierungskinetik

Um k_{ACT} (bzw. k_{TR}) zu erhalten, wurden die Krafttransienten mit einer einzelnen exponentiellen Funktion angeglichen:

$$Y = A(1 - \exp(-k t)) + B$$

Dabei ist Y die Kraft, t die Zeit und A steht für die Amplitude der exponentiellen Kraftentwicklung mit den Ratenkonstanten $k = k_{ACT}$ (oder $k = k_{TR}$).

Relaxationskinetik

Die Transienten des Kraftabfalls während der Relaxation wurden durch eine Funktion angepasst, die sowohl einen ersten linearen Term beinhaltet als auch einen exponentiellen:

$$Y = A + S t + B \quad \text{für } t < t_{LIN}, \quad \text{und}$$

$$Y = (A + S t_{LIN}) \exp(-k_{REL}(t - t_{LIN})) + B \quad \text{für } t \geq t_{LIN}$$

Dabei ist Y die Kraft, A die Amplitude des gesamten Kraftabfalls, S die Steigung, B und t_{LIN} die Zeit des initialen, linearen Kraftabfalls, und k_{REL} die Ratenkonstante des exponentiell verlaufenden Kraftabfalls, der zum Zeitpunkt t_{LIN} beginnt. Um einen adäquaten Vergleich der Ratenkonstanten der linearen Phase (k_{LIN}) mit den exponentiellen Phasen zu ermöglichen, wurde die lineare Phase so behandelt, als wäre sie der initiale Teil eines exponentiellen Kraftabfalls der theoretisch zum Endwert der Kraft extrapoliert. Dementsprechend wurde k_{LIN} mit $k_{LIN} = -S/A$ berechnet.

8 Statistik

Zum statistischen Vergleich wurde ein Student's t-Test durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurden * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$ festgesetzt.

Alle Daten sind, wenn nicht anders angeführt, als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts) aus n Experimenten angegeben.

9 Bezugsquellennachweis

STOFF	HERSTELLER /VERTREIBER
9.1 Chemikalien	
5'-TMRIA	Molecular Probes
β -Mercaptoethanol	Sigma
<u>A</u> crylamid/Bisacrylamid (Rothiphorese Gel30)	Roth
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma
Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3)	
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
<u>B</u> romphenolblau	Roth
BSA (Albumin bovine Fraction V)	Sera
<u>C</u> aCl ₂ Calciumchlorid	Sigma
Coomassie BrilliantBlue R-250®	Roth
<u>D</u> i-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Applichem
<u>E</u> GTA Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Fluka
Essigsäure (Eisessig)	Merck
Ethanol DAB 96%	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka
	Fluka
<u>G</u> BX Entwickler (für Röntgenfilme)	Kodak (Sigma)
GBX Fixierer (für Röntgenfilme)	Kodak (Sigma)
Gelatine	Sigma
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
<u>H</u> arnstoff	Roth
<u>I</u> midazol	Sigma
IPTG	Applichem
<u>K</u> aliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck
di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Serva
Ketanest®	Parke-Davis GmbH
KOH	Merck
<u>L</u> ithiumchlorid (LiCl)	Calbiochem

M agermilchpulver	Heirler
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
Manganchlorid (MnCl ₂)	Fluka
Methanol	Roth
MgATP	Sigma
Mowiol	Fluka
MOPS	UBS
N,N,N',N' -tetramethyldiamin (TEMED)	Roth
Na ₂ CrP	Calbiochem
NaOH Trisitol	Merck
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumcitrat	Sigma
Natrium-Kreatinphosphat (Na ₂ CrP)	Calbiochem
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Paraformaldehyd	Sigma
Ponceau S ®	Sigma
Rompun®	BayerVital
Rubidiumchlorid (RbCl)	UBS
Tris (Tris-(hydroxymethyl)aminomethan)	Roth
Triethanolamin (TEA)	Sigma
Triton-X-100	Fluka
Tween®-20	Serva

9.2 Inhibitoren

AEBSF	Applichem
Antipain	Sigma
Aprotinin	Sigma
Leupeptin	Sigma

9.3 Zellen, Medien und Zusätze

BL21 Codon Plus® (DE3) RP kompetente E.coli	Stratagene
BL21(DE3)pLys kompetente E.coli	Stratagene
Ampicillin	Sigma
LB-Medium (<i>Luria Broth Base</i>)	Invitrogen
NZCYM-Medium	Q-Biogene
Kanamycin	Sigma
Chloramphenicol	Applichem

IV Ergebnisse

1 Austausch des Troponinkomplexes an kardialen Myofibrillen der Maus

1.1 Expression und Isolation der Troponinuntereinheiten aus *E.coli*

Die Untereinheiten des rekombinanten humanen kardialen Troponinkomplexes hcTnT, hcTnC und hcTnI wurden durch die in III-2 vorgestellten chromatographischen Verfahren weitmöglichst isoliert. Abb. IV-1 zeigt ein typisches Elutionsprofil der durchgeführten Chromatographien für hcTnT. Die Fraktionen, die nach dem ersten Reinigungsschritt (CM-Sephrose) hcTnT enthielten (Abb. IV-1 A.), wurden durch einen zweiten Reinigungsschritt über eine DEAE-Sephrose weitgehend isoliert (Abb. IV-1 B.). Im unteren Teil der Abbildung ist die Isolierung des hcTnT anhand einer coomassiegefärbten SDS-PAGE noch einmal verdeutlicht (Abb. IV-1C.).

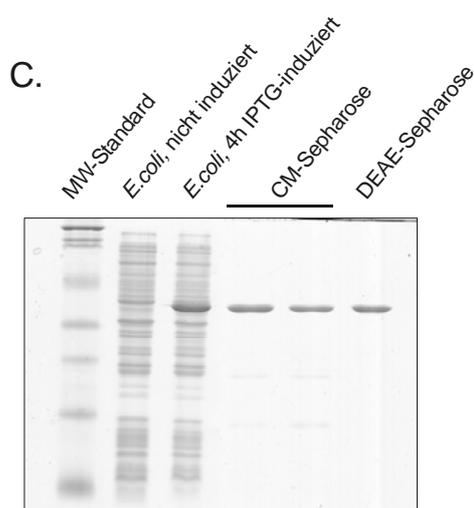
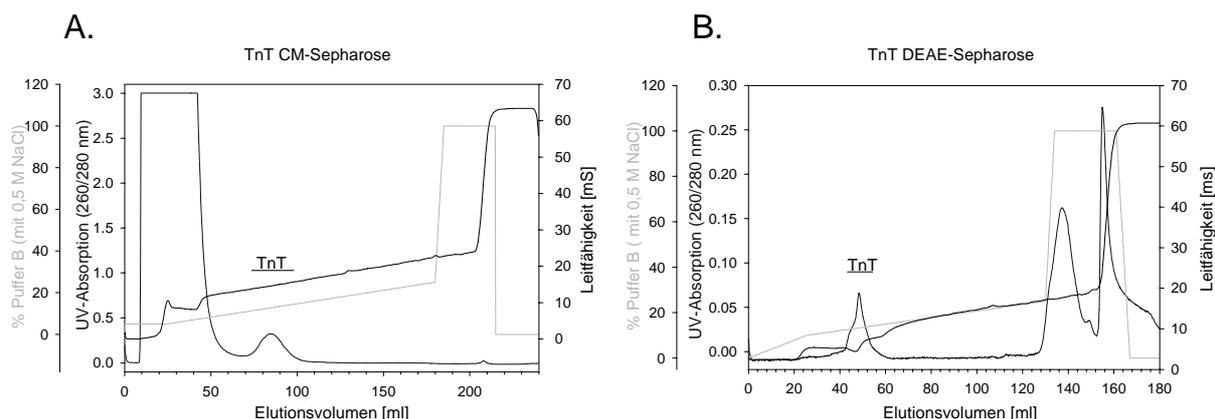


Abb. IV-1. Chromatographische Isolierung von hcTnT. Gezeigt ist ein beispielhaftes Chromatogramm des ersten Reinigungsschritts für hcTnT durch CM-Sephrose-Chromatographie (A.). Mit einem Querstrich markierte Fraktionen des UV-Absorptions-Peaks wurden für den zweiten Reinigungsschritt (DEAE-Sephrose) verwendet (B.). Die coomassiegefärbte SDS-PAGE (C.) zeigt den Verlauf der cTnT-Isolierung. Aufgetragen sind je 10 μg (*E.coli.*, nicht induziert / *E.coli.*, 4 h IPTG induziert) bzw. 5 μg zweier cTnT-haltiger Fraktionen nach der CM-Sephrose (CM-Sephrose) und der vereinigten cTnT-haltigen Fraktionen nach der DEAE-Sephrose-Chromatographie (DEAE-Sephrose).

Das Chromatogramm für die hcTnC Reinigung ist in Abb. IV-2 A. dargestellt. Die grüne Linie steht hier für den Pufferwechsel nach 55 und 125 ml. Isoliertes hcTnC ist in der Übersicht aller isolierter Troponinisformen in Abb. IV-3 dargestellt.

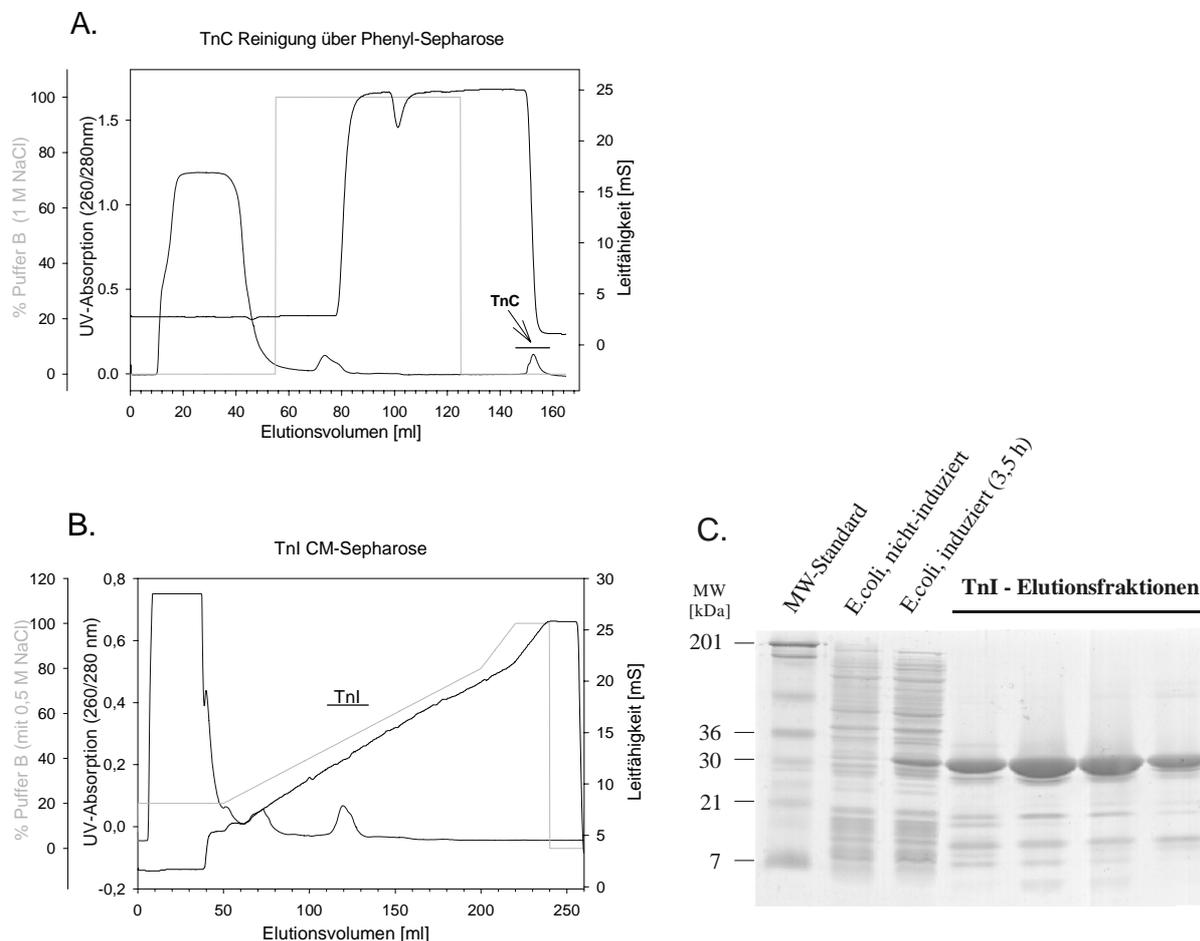


Abb. IV-2 Reinigungsprotokoll von hcTnC und hcTnI.

Das Chromatogramm der hcTnC-Reinigung zeigt die Elution des hcTnC (A.). Die grüne Linie steht hier für den Wechsel der drei Puffer nach 55 ml und 125 ml. Dem Chromatogramm der einstufigen hcTnI-Isolierung durch CM-Sepharose (B.) ist eine coomassiegefärbte SDS-PAGE (12.5 % AA) der Isolierungsschritte des hcTnI aus einer *E.coli* Kultur gegenübergestellt (C.). Für den Vergleich nicht-induzierter gegenüber IPTG-induzierter *E.coli* wurden je 10 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die analysierten TnI-Elutionsfraktionen entsprechen den markierten Fraktionen des UV-Absorptions-Peaks im dargestellten Chromatogramm. Um auch die verunreinigenden Proteine des hcTnI peaks detektieren zu können, wurde hier je 15 µg Gesamtprotein aufgetragen.

Dem Chromatogramm der hcTnI Reinigung über eine CM-Sepharose ist wie für hcTnT eine SDS-PAGE gegenübergestellt (Abb. IV-2 B.), die den gesamten Verlauf einer hcTnI – Isolierung aus *E.coli* verdeutlicht. Aufgetragen sind neben einem MW-Standard Proben der

mit dem hcTnI-Plasmid transformierten *E.coli* Bakterien vor und nach Induktion durch IPTG aufgetragen. Nach 3,5 h IPTG-Induktion ist eine starke Expression des hcTnI zu erkennen. Nach durchgeführter Chromatographie mit CM-Sepharose erscheint das rekombinante hcTnI als prominente Bande des im Chromatogramm markierten UV-Absorptionspeaks.

In Abb. IV-3 sind alle isolierten rekombinanten Troponinuntereinheiten in einer coomassiegefärbten SDS-PAGE dem aus Skelettmuskulatur gereinigten sTn gegenübergestellt. Die Menge der isolierten rekombinanten Proteine lag zwischen 20 und 40 mg pro Liter Bakterienkultur.

1.2 Isolierung von sTn aus Kaninchen Skelettmuskel

Um die Unterschiede der gewebespezifischen Isoformen der Troponinuntereinheiten zu verdeutlichen, ist den kardialen Untereinheiten in Abb. IV-3 der skelettale Gesamtkomplex gegenübergestellt. Nach Ammoniumsulfatfällung des Troponinkomplexes aus der Skelettmuskulatur eines Kaninchens zeigte die SDS-PAGE sowohl die vier im Kaninchen vorkommenden sTnT-Isoformen als auch die einzelnen Banden von sTnI und sTnC. Aus etwa 800 g Skelettmuskulatur des Kaninchens konnten etwa 120 mg sTn isoliert werden.

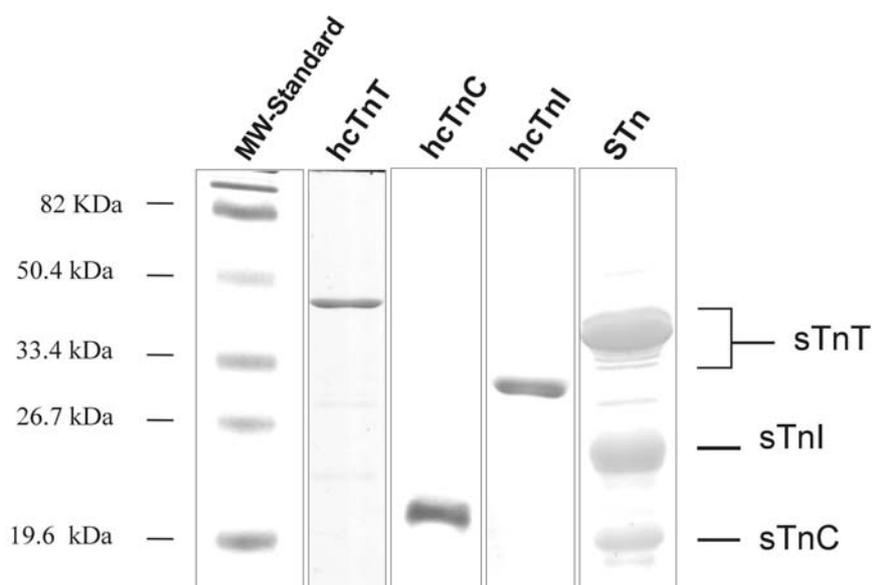


Abb. IV-3. SDS-PAGE (12,5 % AA) der gereinigten rekombinanten Untereinheiten des humanen Troponins und des aus Skelettmuskulatur isolierten Troponins (sTn). Gegenübergestellt sind Proben der gereinigten Untereinheiten hcTnT, hcTnC und hcTnI (je 3 µg Protein) und der aus Skelettmuskulatur isolierte sTn-Komplexe (10 µg).

1.3 Nachweis des Troponinkomplex-Austausches an Kardiomyofibrillen

1.3.1 Nachweis des Proteinaustausches mittels Western Blot Analyse

Bevor mit humanen Troponinisoformen ausgetauschte kardiale Myofibrillen der Maus für die Charakterisierung der Kraftentwicklung und Relaxation verwendet werden können, muss der erfolgte Troponinaustausch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Da humanes kardiiales Troponin I in der NH₂-terminalen Region eine Aminosäure weniger aufweist als das murine kardiiale Troponin I, kann mit Hilfe einer großen SDS-PAGE der Austausch der speziesspezifischen TnI-Isoformen direkt nachgewiesen werden. Wie in Abb. IV-4 zu erkennen, lässt sich in der dargestellten Western Blot Analyse kein verbleibendes mcTnI in einer mit hcTn behandelten kardialen Myofibrillensuspension aus Maus detektieren.

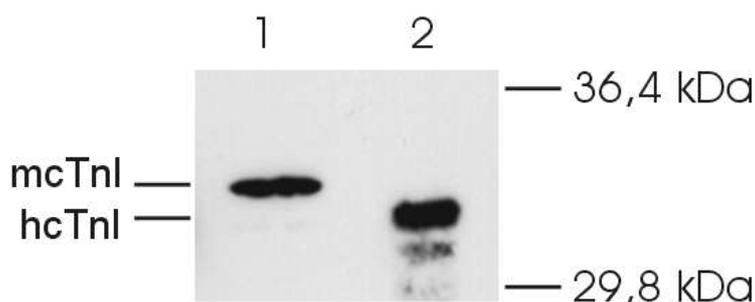


Abb. IV-4. Ausschnitt einer Western Blot Analyse. Aufgetragen sind kardiiale Myofibrillensuspensionen aus Maus-Papillarmuskel. (1) Kontrollsuspendung, (2) die gleiche Probe mit hcTn ausgetauscht. Die Balken auf der rechten Seite geben zum Vergleich den MW-Standard an. Die Proben wurden im Western Blot mit „goat-Anti-cardiac Troponin I“ Antikörper (Fa. BiosPacific) analysiert.

Da hcTnT und hcTnC jedoch das gleiche Molekulargewicht wie die endogene kardiiale Isoform der Maus aufweisen und die Isoformen von den handelsüblichen Antikörpern nicht unterschieden werden können, war ein direkter Nachweis durch Western Blot Analyse hier leider nicht möglich. Um den Austausch aller Untereinheiten des Komplexes nachzuweisen, wurde als weitere Kontrolle anstelle des später verwendeten rekombinanten hcTn Komplexes skelettales Tn verwendet, welches zuvor aus Skelettmuskeln eines Kaninchens isoliert worden war. Die skelettale Troponin I Isoform unterscheidet sich im Molekulargewicht deutlich von der kardialen Isoform, ihr fehlt eine 40 Aminosäuren lange Sequenz am N-Terminus, weshalb das Protein 5-6 kDa kleiner ist. Auch die skelettalen Isoformen des TnT haben ein deutlich

geringeres Molekulargewicht als die kardialen Isoformen. Ersetzt man nun den endogenen kardialen Troponin Komplex gegen exogenes skelettales Troponin, kann der erfolgte Austausch anhand der Unterschiede im Molekulargewicht in einer Western Blot Analyse nachgewiesen werden. Abb. IV-5 zeigt den Ausschnitt aus einem Western Blot nach einer SDS-PAGE (12,5 % AA). Der Molekulargewichtsbereich um TnI wurde für die Darstellung vergrößert. 30 und 60 min nach Beginn der Austauschprozedur mit sTn wurden Proben genommen und in gleicher Konzentration wie die Kontroll-Suspension auf das Gel aufgetragen. Die als Kontroll-Suspension bezeichnete Probe der kardialen Myofibrillen durchlief für 60 min die gleichen Austauschbedingungen, lediglich ohne Einsatz exogenen Proteins.

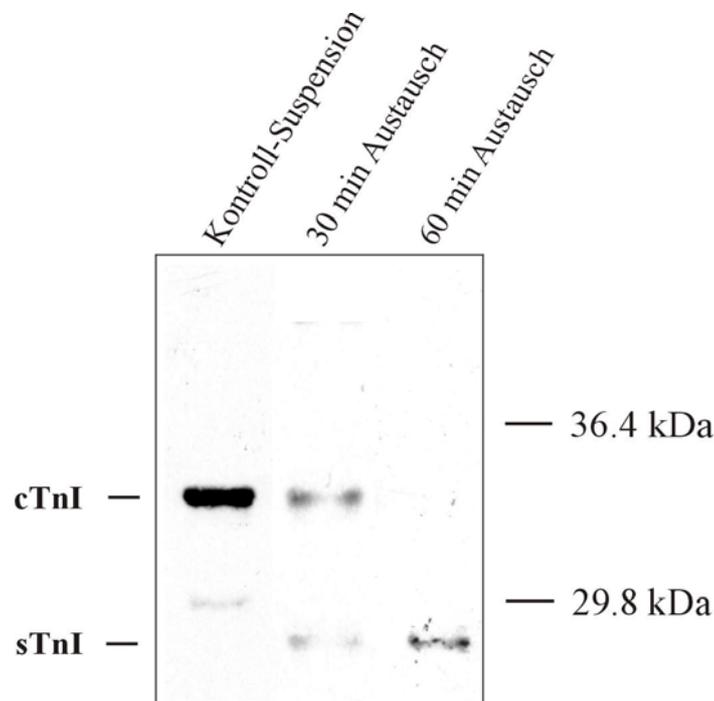


Abb. IV-5. Western Blot Analyse eines zeitabhängigen TnI Austausches. Die erste Spur zeigt eine Kontroll-Myofibrillensuspension (Kontroll-Suspension), die nächsten zwei Spuren den zeitabhängigen Austausch des Maus cTnI (ca. 32 kDa) gegen die skelettale Isoform sTnI (ca. 27 kDa) nach 30 und 60 min. Der Austausch wurde analog den für hcTn-Austausch beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die aufgetragene Proteinmenge betrug für alle 4 Proben 5 µg. Als Antikörper wurde „mouse-Anti-cardiac TnI“ der Fa. Biotools International in einer Konzentration von 1: 500 verwendet. Die Kreuzreaktion mit der skelettalen Isoform des TnI ist vom Hersteller bestätigt.

Nach 30 min. Inkubation mit sTn ist das Verhältnis zwischen endogenem und exogenem Troponin in etwa 1:1. Nach insgesamt 60 min dagegen ist das endogene kardiale cTnI in der

Myofibrillen Suspension nicht mehr nachweisbar und nur noch die skelettale Isoform zu erkennen. Dieses Ergebnis zeigt, dass es eine Zeitabhängigkeit des Austausches gibt. Diese kann jedoch auf Grund des geringen Querschnittes der Myofibrillen nicht durch die Diffusionsgeschwindigkeit der Proteine erklärt werden. Die Abbildung zeigt zudem, dass sTnI nicht nur in der Myofibrillensuspension verbleibt, sondern gleichzeitig das endogene cTnI verdrängt wird. Da der verwendete Antikörper sowohl skelettales und kardiales TnI als auch die speziesspezifischen Isoformen aus Maus und Mensch mit unterschiedlicher Affinität erkennt, lässt dieser Blot keine Aussagen über die Quantität des ausgetauschten Proteins zu.

Abb. IV-6 schließlich zeigt einen Ausschnitt im Größenbereich des TnT ebenfalls nach Austausch der endogenen mcTn Isoformen gegen sTn aus Kaninchenskelettmuskel. Spur 1 zeigt eine unbehandelte Probe kardialer Myofibrillen aus Maus. Die markierte Bande entspricht der prominenten adulten Isoform cTnT₃. Es ist deutlich zu erkennen, dass diese Isoform gegen skelettale Isoform ausgetauscht worden ist. Nach erfolgtem Austausch ist kein kardiales TnT mehr in den behandelten Proben nachweisbar.

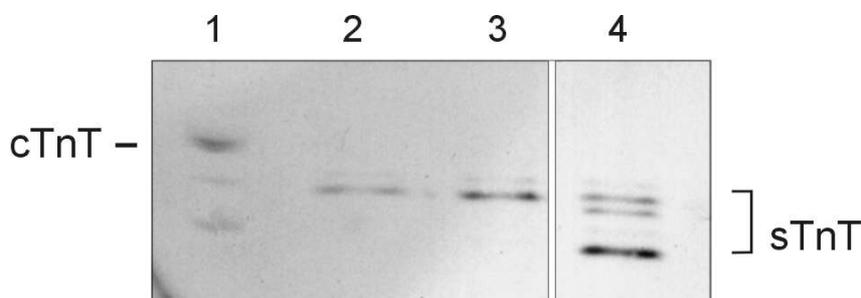


Abb. IV-6. Western Blot Analyse eines zeitabhängigen TnT Austausches. Aufgetragen ist eine unbehandelte Probe kardialer Myofibrillen der Maus (1), und eine kardiale, mit sTn behandelte Myofibrillenprobe nach 30 min Inkubation (2) und 60 min Inkubation in Überschuss an sTn (1 mg sTn/ml) (3). Der Austausch wurde analog den für hcTn-Austausch beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die letzte Spur zeigt die sTnT-Untereinheiten des aus Kaninchenskelettmuskel isolierten skelettalen Troponinkomplexes (4). Die aufgetragene Proteinmenge betrug für alle 4 Proben 5 µg. Als Antikörper wurde Maus-Anti-Troponin T (Klon JLT-12, Fa. Sigma) in einer Konzentration von 1: 1000 verwendet .

Die hier gezeigten Western Blot Analysen demonstrieren, dass sich sowohl die skelettalen als auch die kardialen Isoformen des Troponin I und T in kardiale Myofibrillen der Maus inkorporieren lassen. Dabei werden die endogenen Isoformen der Maus zeitabhängig verdrängt, es wird von einer Inkorporation der exogenen Troponinisofomen von über 75 %

ausgegangen. Da jedoch die speziesspezifischen und gewebespezifischen Isoformen des Troponin C weder durch ein unterschiedliches Molekulargewicht noch durch spezifische Antikörper mit den zur Verfügung stehenden Methoden differenziert werden konnten, kann an dieser Stelle keine Aussage über den Austausch der TnC Isoformen getroffen werden. Ein Nachweis für das Vorhandensein des TnC erfolgt hier indirekt über die funktionellen Untersuchungen an ausgetauschten kardialen Myofibrillen der Maus.

1.3.2 Nachweis des Proteinaustausches mittels Fluoreszenzmarkierung

Um weitergehend eine Aussage über die Lokalisation des ausgetauschten Komplexes treffen zu können, wurde der Austausch auch mit fluoreszenzmarkiertem sTn und cTn Komplex durchgeführt. Dazu wurde Troponinkomplex mit 5'-TMRIA markiert und eine Myofibrillensuspension nach dem oben beschriebenen Austauschprotokoll für eine Stunde inkubiert. Die derart behandelten Myofibrillen wurden auf einem Objektträger fixiert und der Proteinaustausch anhand der detektierbaren roten Fluoreszenz überprüft. Abb. IV-7 zeigt beispielhaft eine mit 5'-TMRIA markiertem sTn ausgetauschte Myofibrille (A.) und ein mit 5'-TMRIA markiertem hcTn WT ausgetauschtes Myofibrillenbündel (B.). Die periodische Verteilung der Fluoreszenz innerhalb der Myofibrillen spiegelt die bevorzugte Bindung des Troponinkomplexes in den A-Banden des Sarkomers wieder, wie bereits von She *et al.* (2000) postuliert worden ist. Anschließende Inkubation der Myofibrillen-Suspensionen mit unmarkiertem Komplex führte wieder zur Entfernung der Fluoreszenz aus den Myofibrillen. Inkubation mit den verwendeten Puffern ohne Einsatz des exogenen Troponinkomplexes konnte die Fluoreszenz dagegen nicht ändern.

Durch die hier beschriebenen Experimente wurde nachgewiesen, dass der exogene Troponinkomplex spezifisch in die kardialen Myofibrillen der Maus bindet. Das Entfernen der Fluoreszenz aus den Myofibrillen nach Durchführung eines zweiten Austauschs mit unmarkiertem Komplex belegt die Reversibilität des Austauschprozesses und bestärkt die Annahme, dass keine unspezifische Aggregation des exogenen Troponinkomplexes an die Myofilamente vorliegt.

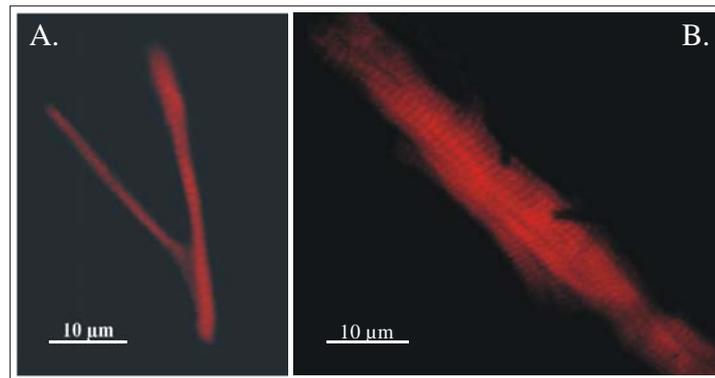


Abb. IV-7. Nachweis des Troponinaustauschs mittels Fluoreszenz. Kardiale Myofibrillen aus Maus-Papillarmuskel wurden dem oben beschriebenen Austauschprotokoll unterzogen. Dargestellt sind je beispielhaft eine mit 5'-TMRIA markiertem sTn ausgetauschte Myofibrille (**A.**), und ein mit 5'-TMRIA markiertem cTn WT ausgetauschtes Myofibrillenbündel (**B.**). Die Fluoreszenz wurde bei einer Excitation von 540 nm und einer Emission von 566 nm detektiert. Die Belichtungszeit betrug 1 s.

2 Speziesspezifische Kinetik der Kraftentwicklung und des Kraftabfalls in kardialen Myofibrillen der Maus im Vergleich zum Menschen

Da die Austauschexperimente den Austausch humaner Troponin Isoformen in die myofibrilläre Bündel von Mäusen vorsehen, wurde zunächst das Kontraktions- und Relaxationsverhalten von Myofibrillen aus Mauserzen und aus einem menschlichen Spenderherzen miteinander verglichen. Dafür wurden die Myofibrillen frisch präparierter Papillarmuskeln aus 4 Mäusen verwendet. Die in den folgenden Abschnitten verwendeten Messwerte humaner Myofibrillen entstammen dem in I-4 vorgestellten, menschlichen Spenderherzen [Stehle *et al.*, 2002b] und weiteren, innerhalb der Arbeitsgruppe daran durchgeführten Untersuchungen.

2.1 Die Kinetik der Ca²⁺-aktivierten Kraftentwicklung in murinen und humanen kardialen Myofibrillen

Wie bereits in I-4 gezeigt, weisen die murinen und humanen kardialen Myofibrillen starke Unterschiede in der Kinetik der Kraftentwicklung und Relaxation auf.

Die Aktivierungskonstante k_{ACT} wurde für menschliche und murine Präparate für verschiedene Aktivierungsstufen ermittelt. Da die Myofibrillen der Maus auf eine mehrfache Aktivierung mit starkem Kraftverlust reagierten, wurden dort lediglich zwei submaximale Aktivierungsstufen untersucht.

In Abb. IV-8 sind die Krafttransienten einer kardialen Myofibrille aus Maus für partielle Aktivierungen mit pCa 5,88 und pCa 5,64 sowie für maximale Aktivierung mit pCa 4,54 nebeneinandergestellt. Die rote Linie stellt die partielle Aktivierung mit pCa 5,88 dar, der grüne Transient zeigt die Kraftentwicklung nach Aktivierung mit pCa 5,64. Die maximale Aktivierung des Myofibrillenbündels mit pCa 4,54 wird durch den schwarzen Kurvenverlauf dargestellt. Man erkennt, dass die Kontraktion um so schneller verläuft, je höher die aktivierende Ca^{2+} -Konzentration ist. Die Krafttransienten für pCa 5,88 und 5,64 erscheinen dadurch deutlich flacher.

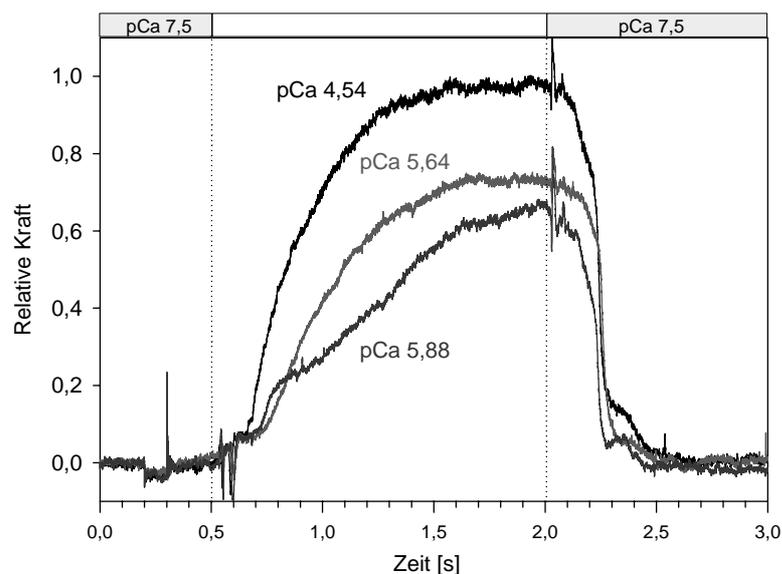


Abb. IV-8. Aktivierungskinetik in Abhängigkeit von der $[\text{Ca}^{2+}]$ an einem Beispiel kardialer Maus Myofibrillen. Aufgetragen ist die relative Kraft gegen die Zeit [s]. Gezeigt sind die Krafttransienten einer kardialen Myofibrille aus Maus-Papillarmuskel mit partieller Aktivierung durch pCa 5,88 (rot), pCa 5,64 (grün) sowie ein Krafttransient mit maximaler Aktivierung durch pCa 4,54 (schwarz). Die gepunkteten Linien markieren den Lösungswechsel von relaxierten Bedingungen (pCa 7,5) zur jeweiligen Aktivierungslösung zum Zeitpunkt 0,5 s und zurück zur Relaxationslösung zum Zeitpunkt 2,0 s.

Die Ratenkonstante k_{ACT} hängt sowohl in kardialen Myofibrillen der Maus als auch des Menschen von der gegebenen Ca^{2+} -Konzentration ab. Mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration steigt auch die Ratenkonstante des exponentiellen Kraftanstiegs k_{ACT} . Ein Vergleich der für

beide Spezies ermittelten Werte für k_{ACT} verdeutlicht, dass die Kontraktion in Präparaten der Maus um mehr als eine Größenordnung schneller abläuft als in menschlichen kardialen Myofibrillen (Abb. IV-9).

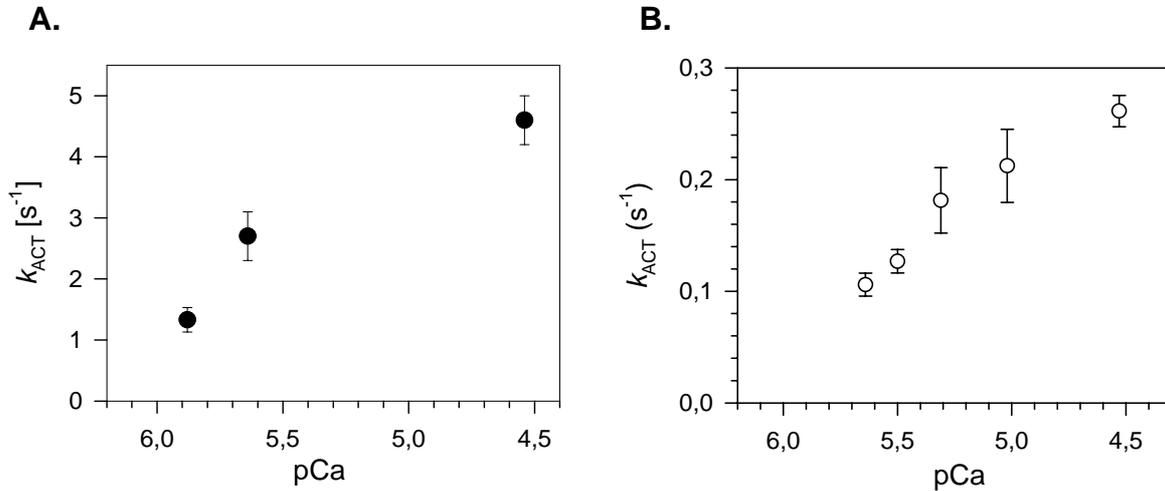


Abb. IV-9. Ca^{2+} -Abhängigkeit der Ratenkonstante k_{ACT} in kardialen Myofibrillen. Aufgetragen ist die Ratenkonstante k_{ACT} gegen den pCa für Myofibrillen aus Maus-Papillarmuskel (●) ($n = 10$) (A.) und für Myofibrillen aus einem menschlichen Spenderherz (○) ($n = 6$) (B.).

Um die Kraftentwicklung unterschiedlicher Myofibrillen zu normieren, wurde über ein geeichtes Okularmikrometer die Gesamtlänge und der Durchmesser der Myofibrille bzw. des Myofibrillenbündels bestimmt, was die Berechnung des Querschnittes (engl.: cross sectional area = CSA) ermöglichte. Dadurch konnte als standardisierte Größe für jedes verwendete Präparat die maximale Ca^{2+} -aktivierte Kraft (pCa 4,54) sowie die passive Kraft (pCa 7,5) pro Querschnitt ermittelt werden (F_{max}/CSA und F_{pass}/CSA). Es können keine signifikanten Unterschiede zwischen der entwickelten passiven Kraft und der Ca^{2+} -aktivierten maximalen Kraft in kardialen Myofibrillen beider Spezies festgestellt werden. Tab. IV-1 gibt eine Übersicht über die einzelnen Werte.

2.2 Ca^{2+} -Sensitivität der Kraftentwicklung in murinen und humanen kardialen Myofibrillen

Die Analyse der Kraftentwicklung in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Aktivierung zeigt für kardiale Myofibrillen aus Maus-Papillarmuskel eine leicht erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität. In Abb. IV-10 ist die (auf maximal Ca^{2+} -aktivierte Kraftentwicklung) normalisierte Kraft gegen den pCa aufgetragen. Dort ist zu erkennen, dass die Myofibrillen der Maus beispielsweise bei Aktivierung mit pCa 5,88 bereits etwa 80% der maximalen Ca^{2+} -aktivierte Kraft entwickeln, verglichen mit nur etwa 55% Kraftentwicklung in Myofibrillen des humanen Spenderherzens.

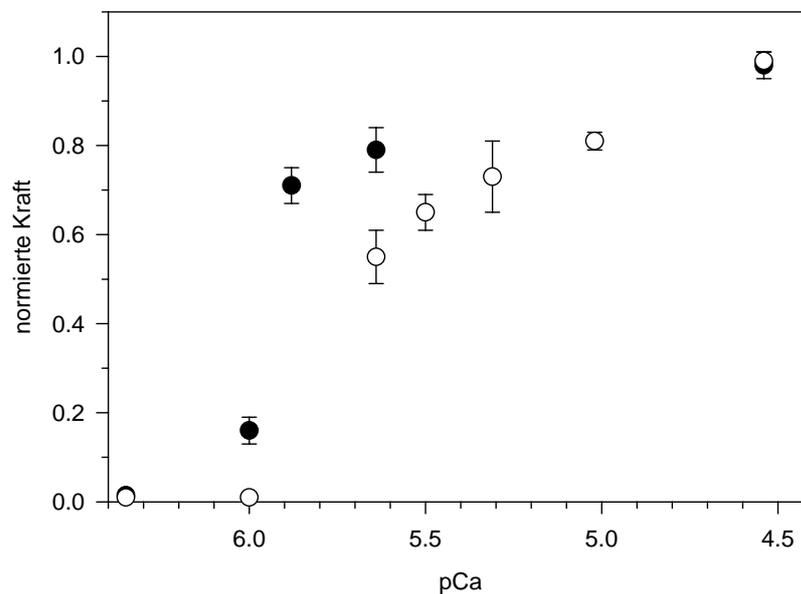


Abb. IV-10. Ca^{2+} -Sensitivität der Kraftentwicklung. Dargestellt ist die auf maximale (Ca^{2+} -induzierte) Kraftentwicklung normierte Kraft gegen den pCa für kardiale Myofibrillen der Maus (●) ($n = 10$) und für kardiale Myofibrillen aus einem menschlichem Spenderherzen (○) ($n = 6$).

2.3 Kinetische Parameter des Kraftabfalls in murinen und humanen kardialen Myofibrillen

Wie schon bei der Aktivierungskinetik beobachtet wurde, weisen die untersuchten kardialen Myofibrillen der Maus auch während der Relaxation eine schnellere Kinetik auf als die kardialen Myofibrillen aus dem menschlichen Spenderherzen (vgl. I-4). Die Mittelwerte aller Messungen von t_{LIN} , k_{LIN} und k_{REL} für kardiale Myofibrillen aus Maus-Papillarmuskel und aus dem menschlichen Spenderherzen sind in Tab. IV-1 zusammengefasst.

Tabelle IV-1

Kinetik der Kraftentwicklung und Relaxation bei maximaler Ca^{2+} -Aktivierung in humanen kardialen und murinen kardialen Myofibrillen.

Präparat	F_{max}/CSA [nN/ μm^2]	F_{passive}/CS A [nN/ μm^2]	k_{ACT} [s ⁻¹]	t_{LIN} [s]	k_{LIN} [s ⁻¹]	k_{REL} [s ⁻¹]
Kardiale Myofibrillen aus menschlichem Spenderherzen ($n = 6$)	151 ± 14	8 ± 1	0,3 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,15 ± 0,02	4,6 ± 0,3
Kardiale Myofibrillen aus Papillarmuskel der Maus ($n = 10$)	124 ± 16	6 ± 1	4,6 ± 0,4	0,03 ± 0,003	2,9 ± 0,4	39 ± 2

Die passive Kraft pro Querschnitt wurde unter relaxierten Bedingungen (pCa 7.5) bei einer Sarkomerlänge von 2,3 μm ermittelt. Werte des menschlichen Spenderherzens aus Stehle *et al.* (2002b).

3 Funktionelle Auswirkungen des Austausches mit hcTn WT

3.1 Vorbemerkungen zu den Austausch-Experimenten mit rekombinantem hcTn WT

In Abschnitt IV-2 wurde dargelegt, dass Maus und Mensch starke Unterschiede in der Kinetik der Ca^{2+} -regulierten Kraftentwicklung und Relaxation aufweisen. Bislang ist noch unklar, worauf diese speziesspezifischen Unterschiede in der myofibrillären Kinetik beruhen; eine mögliche Ursache könnte jedoch die speziesspezifische und entwicklungsabhängige Isoformexpression einiger sarkomerischer Proteine sein. Bevor also FHC-relevante Mutationen des hcTn in kardialen Myofibrillen der Maus untersucht werden konnten, musste festgestellt werden, inwieweit die Inkorporation humaner Isoformen und damit die Verdrängung der spezieseigenen mcTn Isoformen einen Effekt auf die Kraftkinetik der murinen Myofibrillen hat. Dazu wurde zunächst der Einfluss der Austauschbedingungen auf die kardialen Myofibrillen der Maus untersucht. Anders als in dem vorherigen Abschnitt findet die Präparation für die Austausch-Experimente unter Rigorbedingungen, d.h. ohne ATP, statt. Es zeigt sich, dass in Rigorlösung präparierte kardiale Myofibrillen deutlich weniger Kraft pro Querschnitt entwickeln als kardiale Myofibrillen, welche in der ATP-haltigen Skinning-Basislösung (s. Methoden) präpariert worden waren. Auch die Ratenkonstanten der Kraftentwicklung k_{ACT} und der exponentiellen Relaxation k_{REL} ist leicht verringert. Tab. IV-2 gibt einen Überblick über die ermittelten Werte.

Die in dem folgenden Abschnitt als Kontrollen bezeichneten kardialen Myofibrillen der Maus wurden daher ebenfalls in Rigorlösung präpariert und durchliefen die gleichen Versuchsbedingungen wie die mit hcTn WT ausgetauschten Myofibrillen.

Um die Unterschiede in der Größenordnung zwischen humanen kardialen Myofibrillen und murinen Myofibrillen mit hcTn zu verdeutlichen, sind in den Abbildungen die Werte des bereits in IV-2 beschriebenen humanen Spenderherzens erneut aufgeführt. Die dargestellten Mittelwerte \pm SEM ergeben sich aus 4 (Kontrolle) bzw. 7 (hcTn ausgetauscht) untersuchten Mäusen sowie einem humanen Spenderherz (Mensch) [Daten übernommen aus Stehle *et al.*, 2002b].

Tabelle IV-2

Kinetik der Kraftentwicklung und Relaxation bei maximaler Aktivierung in kardialen Myofibrillen der Maus nach Präparation in Rigor- bzw. Skinning-Basislösung.

Präparat	F_{\max}/CSA [nN/ μm^2]	F_{pass}/CSA [nN/ μm^2]	k_{ACT} [s ⁻¹]	t_{LIN} [s]	k_{LIN} [s ⁻¹]	k_{REL} [s ⁻¹]
Präparation in Rigorlösung ($n = 11$)	72 ± 11	4,0 ± 0,7	5,7 ± 0,6	0,040 ± 0,006	3,3 ± 0,5	21 ± 3
Präparation in Skinning-Basislösung ($n = 10$)	124 ± 16	6,0 ± 1,0	4,6 ± 0,4	0,03 ± 0,003	2,9 ± 0,4	39 ± 2

F_{pass}/CSA wurde unter relaxierten Bedingungen (pCa 7,5) bei einer Sarkomerlänge von 2,3 μm ermittelt.

3.2 Auswirkungen des hcTn Austausches auf F_{\max}/CSA und F_{pass}/CSA , sowie auf die Ratenkonstante der Ca^{2+} -aktivierten Kraftentwicklung k_{ACT}

Nach erfolgtem Austausch von hcTn in Myofibrillen der Maus wurde zunächst der Einfluss des hcTn auf die passive (F_{pass}/CSA) und die maximale Ca^{2+} -aktivierte Kraftentwicklung (F_{\max}/CSA) untersucht. Die passive Kraft ist in allen Präparaten in etwa gleich groß und liegt im Bereich um 10 nN/ μm^2 . Die maximale Kraftentwicklung von Kontrollmyofibrillen und solchen mit hcTn ausgetauschten liegt in der gleichen Größenordnung. Die Tatsache, dass weder die passive noch die maximale Ca^{2+} -induzierte Kraftentwicklung maßgeblich verändert sind, lässt auf funktionelle Integration aller drei Troponinisoformentypen schließen. (Abb. IV-11).

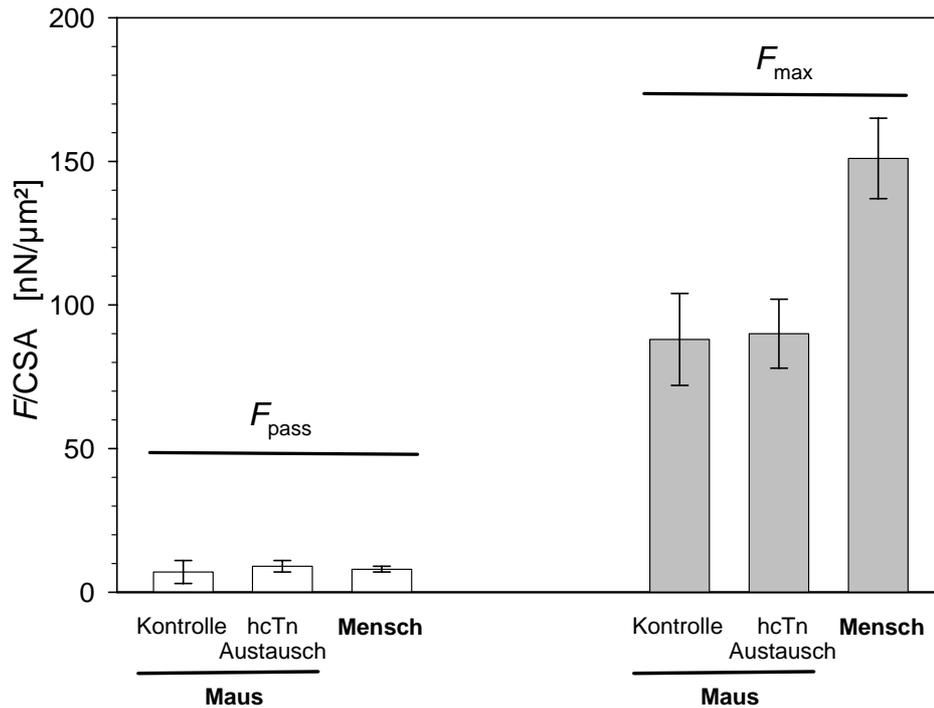


Abb. IV-11. F_{pass}/CSA und F_{max}/CSA bei hcTn ausgetauschten Mausmyofibrillen im Vergleich zu Kontrollen und zu kardialen Myofibrillen des Menschen. Die linke Seite zeigt F_{pass}/CSA , die rechte Seite F_{max}/CSA . Die Mittelwerte \pm SEM ergeben sich aus Messungen an $n = 11$ (Kontrolle), $n = 6$ (hcTn Austausch) sowie $n = 6$ (Mensch) Myofibrillen.

Abb.IV-12 A. zeigt die Beziehung der Ratenkonstante k_{ACT} und pCa für unbehandelte und ausgetauschte kardiale Myofibrillen der Maus. Es ist kein signifikanter Unterschied in der Ca^{2+} -Abhängigkeit der Ratenkonstante k_{ACT} in Kontrollmyofibrillen und in mit hcTn ausgetauschten Myofibrillen zu erkennen. Auch die Ca^{2+} -Sensitivität der Kraftentwicklung wird durch den Austausch der murinen gegen die humanen Troponinisoformen nicht signifikant verändert.

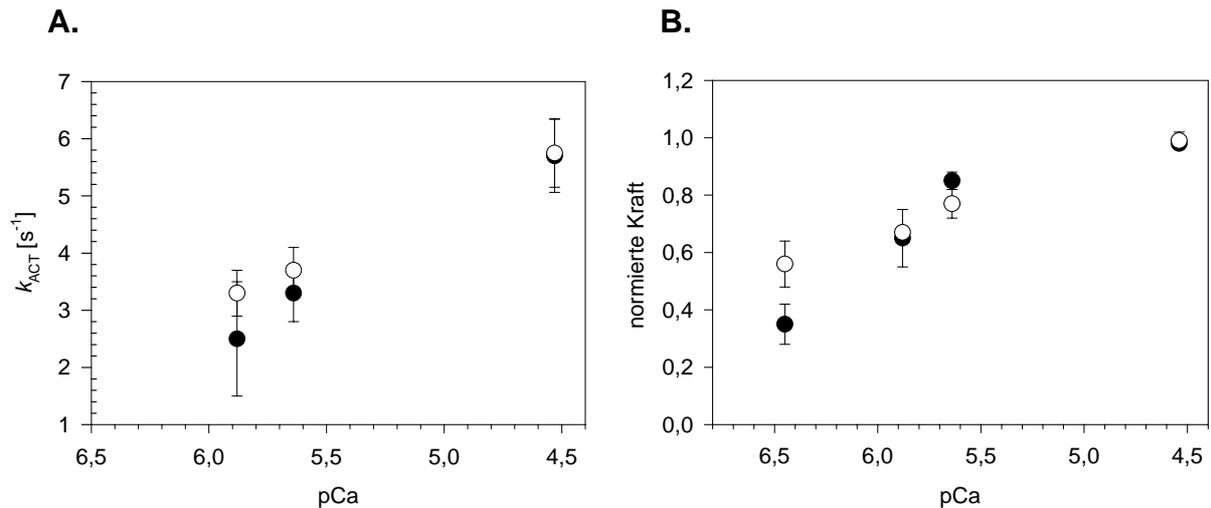


Abb. IV-12. Verhältnis von k_{ACT} zu pCa in hcTn ausgetauschten Myofibrillen und in Kontrollen. Aufgetragen ist k_{ACT} [s⁻¹] gegen den pCa (A.) sowie die auf F_{max} normierte Kraft gegen den pCa (B.) Die schwarzen Kreise stehen für Kontrollmyofibrillen (●), die offenen Kreise für hcTn ausgetauschte Präparate (○). Die dargestellten Werte ergeben sich aus $n = 6$ (hcTn Austausch) und $n = 11$ (Kontrolle) ausgewerteten Messungen.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass die Kraftentwicklung der murinen kardialen Myofibrillen nicht durch den Austausch mit hcTn beeinflusst worden ist. Der Austauschprozess hat weder signifikante Auswirkungen auf die Entwicklung der maximalen Ca^{2+} -induzierten und der passiven Kraft noch auf die Ratenkonstante der Kraftentwicklung k_{ACT} .

3.3 Auswirkungen des hcTn Austausches auf die kinetischen Parameter des Kraftabfalls in kardialen Myofibrillen der Maus

Wie Abb. IV-13 A zeigt, kann kein Unterschied in der Dauer der linearen Phase zwischen nativen und mit hcTn ausgetauschten Myofibrillen der Maus nach maximaler Ca^{2+} -Aktivierung festgestellt werden. Die ermittelten Werte sind in beiden Präparatgruppen nahezu identisch.

Auch die Gegenüberstellung der Werte für k_{REL} nach maximaler Ca^{2+} -Aktivierung zeigen, dass der Austausch des murinen Troponin Komplexes zu keiner maßgeblichen Verlangsamung in der Kinetik des Kraftabfalls führte (Abb. IV-13 B.).

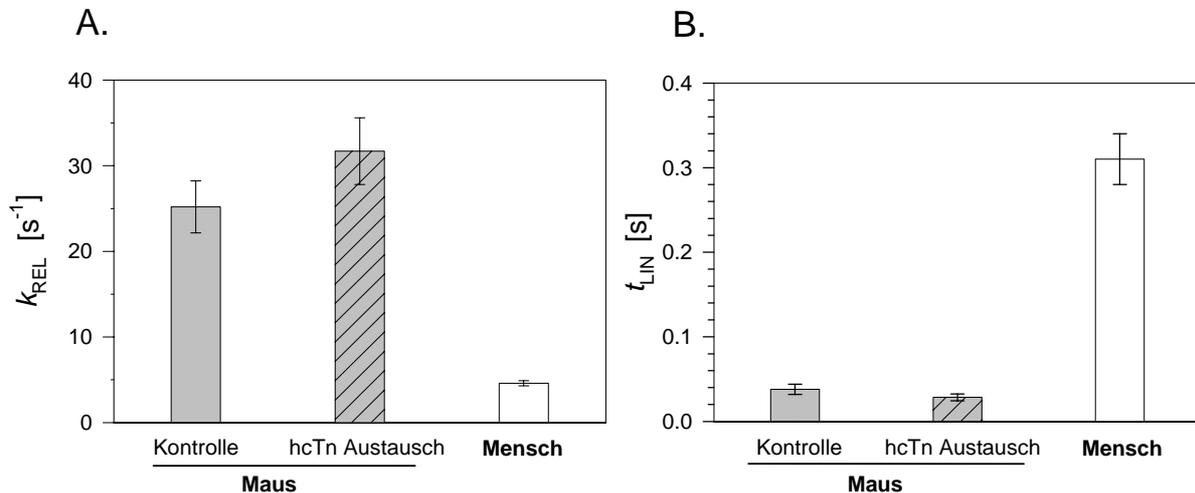


Abb. IV-13. Beeinflussung der Relaxationskinetik durch den hcTn Austausch. Gegenübergestellt sind t_{LIN} (A.) und k_{REL} (B.) von kardialen Kontrollmyofibrillen aus Maus (Kontrolle, graue Balken), hcTn ausgetauschten Myofibrillen aus Maus (hcTn Austausch., grau schraffierte Balken) sowie kardialen Myofibrillen aus einem menschlichen Spenderherzen (Mensch, weiße Balken) nach maximaler Aktivierung mit pCa 4,54. Die dargestellten Werte ergeben sich aus $n = 6$ (hcTn Austausch), $n = 11$ (Kontrolle) und $n = 6$ (Mensch) ausgewerteten Krafttransienten.

Für die Ratenkonstante des Kraftabfalls t_{LIN} , k_{LIN} und k_{REL} wurde auch die Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Aktivierung untersucht (Abb. IV-14 A-C.). Anders als für die Ratenkonstante der Kraftentwicklung k_{ACT} findet sich für die Myofibrillen aus Maus-Papillarmuskel keine deutliche Abhängigkeit der kinetischen Parameter des Kraftabfalls von der Ca^{2+} -Aktivierung. Eine solche Abhängigkeit von k_{REL} und t_{LIN} war zuvor an kardialen Myofibrillen aus Meerschweinchen und an menschlichen Spenderherzen beobachtet worden [unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe]. Die Werte von hcTn ausgetauschten kardialen Myofibrillen und den kardialen Kontrollmyofibrillen weichen zwar stellenweise voneinander ab, die Abweichung ist jedoch statistisch nicht signifikant.

Es zeigt sich also, dass der Austausch des endogenen mcTn gegen das rekombinante hcTn in kardiale Myofibrillen der Maus nicht zu einer signifikanten Veränderung in der Kinetik der Ca^{2+} -induzierten Kraftentwicklung und Relaxation führt. Diese Daten lassen den Schluss zu,

dass die speziesspezifischen Troponin Isoformen nicht für die kinetischen Unterschiede in den Krafttransienten von Maus und Mensch verantwortlich sind.

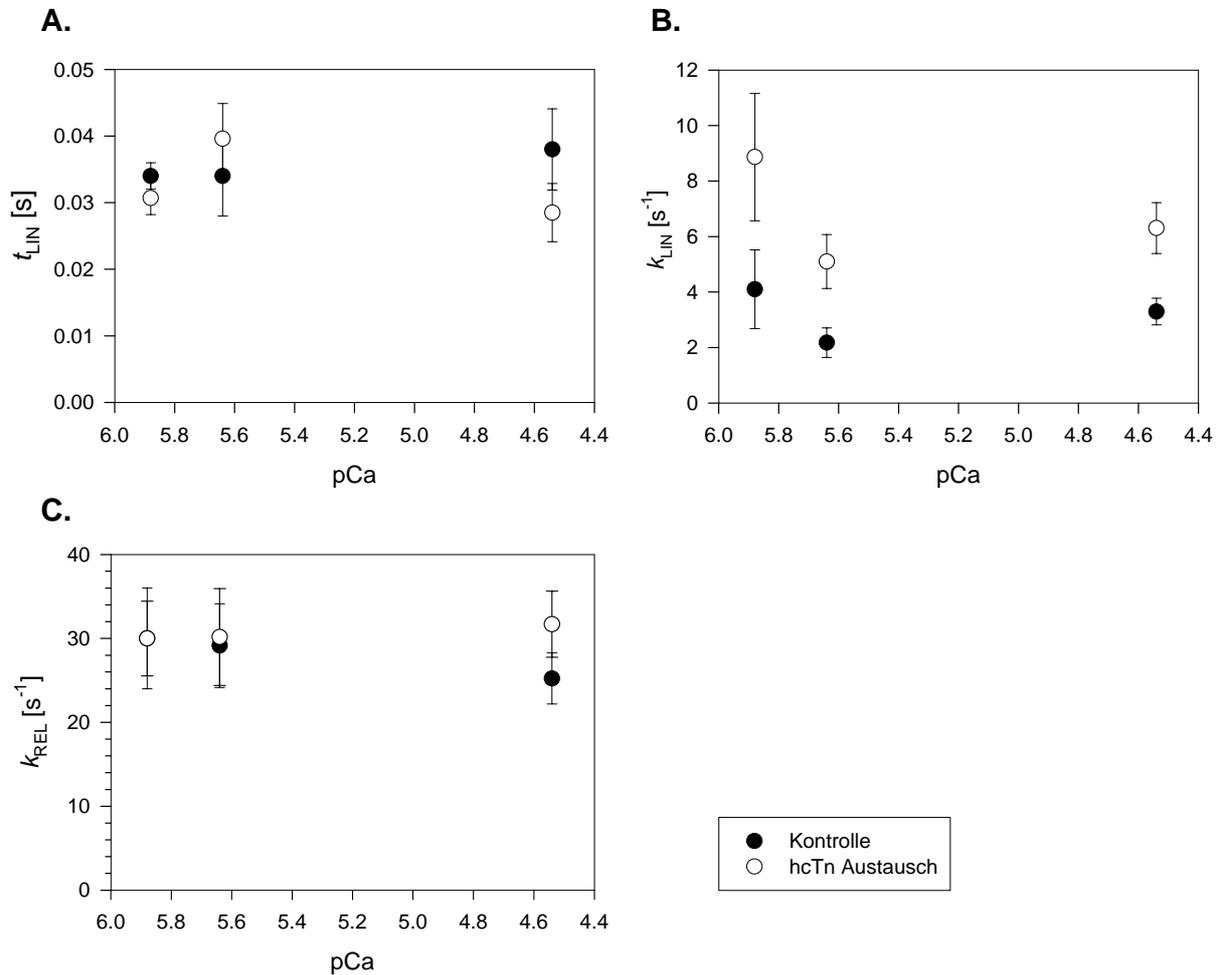


Abb. IV-14. Kinetik des Kraftabfalls in Abhängigkeit von $[Ca^{2+}]$.

Aufgetragen sind t_{LIN} (A.), k_{LIN} (B.) und k_{REL} (C.) für Kontrollmyofibrillen der Maus (●) und für hcTn ausgetauschte Myofibrillen (○) in Abhängigkeit des pCa. Die dargestellten Werte ergeben sich aus $n = 6$ (hcTn Austausch) und $n = 11$ (Kontrolle) ausgewerteten Krafttransienten.

4 Funktionelle Auswirkungen der hcTnI R145G Mutante auf die Kraftentwicklung und Relaxation kardialer Myofibrillen der Maus

4.1 Vorbemerkungen zu den Austausch-Experimenten mit hcTnI Mutanten

Kardiale Myofibrillen der Maus wurden mit rekombinantem humanen Troponinkomplex behandelt, in dem das hcTnI die Mutation G203S bzw. R145G trug. Dabei wurden die Troponinisoformentypen nahezu vollständig ausgetauscht. Der Austausch wurde jeweils mittels Western Blot Analyse bestätigt. Die Ergebnisse der in IV-3 beschriebenen Austauschexperimente mit hcTn WT hatten gezeigt, dass die Austauschbedingungen teilweise zu einer recht hohen Variabilität der Einzelwerte führen können, verdeutlicht durch die großen Standardfehler. Geringe Unterschiede zwischen Mäusen aus verschiedenen Würfen bzw. unterschiedlichen Alters werden dadurch verstärkt. Um die Versuchsbedingungen für die Untersuchungen an den hcTnI-Mutanten R145G und G203S möglichst konstant zu halten, wurden daher für die parallel durchgeführten Kontroll (WT)- und Mutantenaustausche nahezu ausschließlich gleichaltrige Mäuse aus einem Wurf verwendet. Darüber hinaus wurde sichergestellt, dass die rekombinanten Troponinuntereinheiten in den beiden parallel rekonstituierten Komplexen aus demselben Reinigungsprotokoll stammen. Auch bei der Auswertung wurden die Daten der Austausch mit den hcTnI Mutanten jeweils nur mit den Daten der hcTn WT-Austausche aus der aktuellen Versuchsreihe verglichen. Dies begründet die teilweise auftretenden Unterschiede in den Mittelwerten und Standardfehlern zwischen den Gruppen der hcTn WT-Austausche in den Abschnitten IV-2, IV-3, VI- 4 und VI-5.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 4 Mäusen für den hcTn G203S Austausch, 5 Mäusen für den hcTn R145G Austausch und je 4 Mäusen für den jeweils dazu durchgeführten hcTn WT Austausch.

4.2 Auswirkungen der hcTnI R145G Mutante auf $F_{\text{pass}}/\text{CSA}$ und $F_{\text{max}}/\text{CSA}$ sowie auf die Ratenkonstante der Ca^{2+} -aktivierten Kraftentwicklung k_{ACT}

Aus Abb. IV-15 wird ersichtlich, dass in Myofibrillen, deren endogener Troponinkomplex durch einen humanen Troponinkomplex mit hcTnI R145G ausgetauscht wurde, die passive Kraft $F_{\text{pass}}/\text{CSA}$ mit $15,4 \pm 2,9$ nN/ μm^2 gegenüber der Kontrollgruppe mit einem mittleren

Wert von $9,0 \pm 2,4 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$ deutlich erhöht ist. Aufgrund der starken Streuung der Einzelwerte ergibt sich daraus jedoch keine statistische Signifikanz. Anders verhält es sich mit der Ca^{2+} -induzierten maximalen Kraftentwicklung $F_{\text{max}}/\text{CSA}$. Nach maximaler Aktivierung mit pCa 4,54 entwickeln die mit hcTnI R145G ausgetauschten Myofibrillen im Mittel nur Kräfte von $45 \pm 10 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$, verglichen mit $83 \pm 7 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$ in der Gruppe der mit hcTnI WT ausgetauschten Myofibrillen. Damit ist die Ca^{2+} -induzierte Kraftentwicklung in den hcTnI R145G behandelten Myofibrillen in signifikantem Maße um nahezu 50 % reduziert, verglichen mit den Myofibrillen nach Austausch mit hcTnI WT.

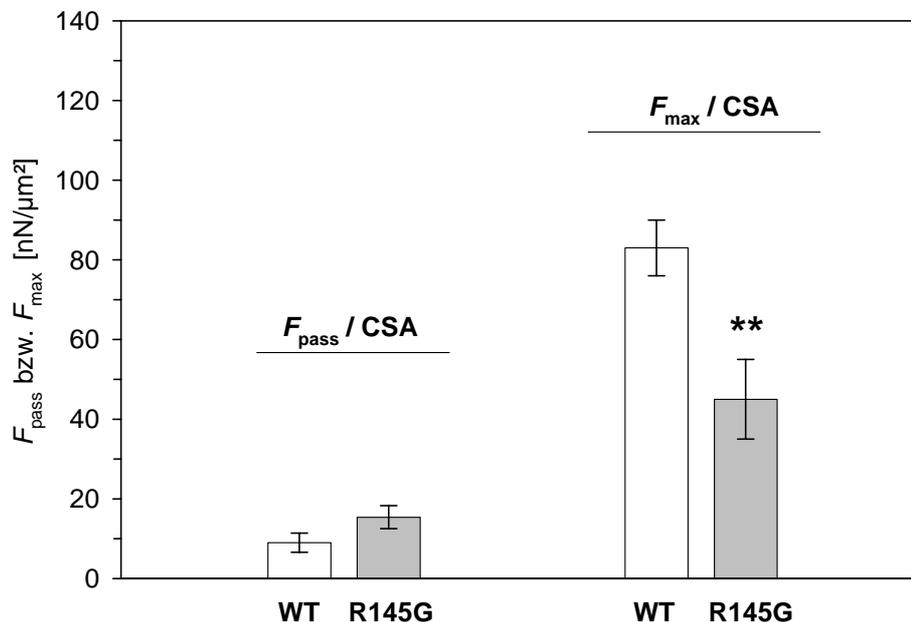


Abb. IV-15. $F_{\text{pass}}/\text{CSA}$ und $F_{\text{max}}/\text{CSA}$ in hcTnI WT und hcTnI R145G ausgetauschten Myofibrillen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der passiven Kraft und der maximalen Kraftentwicklung pro Querschnitt in $\text{nN}/\mu\text{m}^2$. Weiße Balken zeigen die Werte für hcTnI WT (WT), graue Balken die Werte für hcTnI R145G (R145G) ausgetauschte Myofibrillen. Die passive Kraft pro Querschnitt wurde unter relaxierten Bedingungen (pCa 7,5) bei einer Sarkomerlänge von $2,3 \mu\text{m}$ ermittelt. Die dargestellten Werte ergeben sich aus $n = 9$ (WT) und $n = 10$ (R145G) Kraftmessungen (** $P < 0,01$).

Abb. IV-16 A. zeigt, dass die mit hcTnI R145G ausgetauschten Myofibrillen bei partieller Aktivierung mit pCa 5,88 und 5,64 nahezu identische Werte erreichen wie die mit hcTnI WT ausgetauschten Myofibrillen. Bei maximaler Ca^{2+} -Aktivierung allerdings ist die Ratenkonstante der Ca^{2+} -induzierten Kraftentwicklung k_{ACT} mit $4,9 \pm 0,5 \text{ s}^{-1}$ um etwa 40 % erniedrigt, verglichen mit den hcTn WT tragenden Myofibrillen, bei denen $k_{\text{ACT}} = 6,8 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$ erreichte.

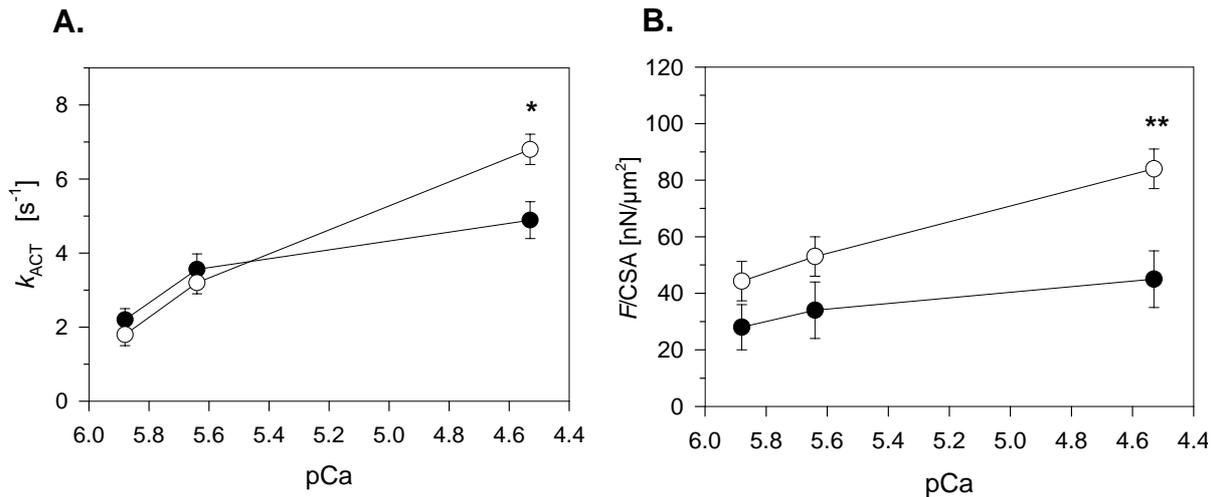


Abb. IV-16. Ca^{2+} -Sensitivität der Kraftentwicklung und der Ratenkonstante der Ca^{2+} -induzierten Kraftentwicklung k_{ACT} .

Gegenübergestellt ist die Ca^{2+} -Sensitivität der Ratenkonstante der Kraftentwicklung k_{ACT} (A.), und die Kraftentwicklung F/CSA [nN/μm²] nach Ca^{2+} -Aktivierung mit pCa 5,88, pCa 5,64 und pCa 4,54 (B.) für mit hcTn I WT ausgetauschte (o) und mit hcTnI R145G (●) ausgetauschte Myofibrillen. Die dargestellten Werte ergeben sich aus je $n = 4 - 9$ Messungen (* $P < 0,05$ und ** $P < 0,01$).

Die starke Reduktion von k_{ACT} bei maximaler Ca^{2+} -Aktivierung mit pCa 4,54 steht in Zusammenhang mit der ebenfalls deutlich verringerten Kraftentwicklung. Abb. IV-16 B. zeigt die nach partieller und nach maximaler Ca^{2+} -Aktivierung entwickelten Kräfte F/CSA [nN/μm²]. Bereits bei den partiellen Aktivierungen weichen die von hcTnI R145G ausgetauschten Myofibrillen entwickelten Kräfte von denen mit hcTnI WT ausgetauschter Myofibrillen ab. Die Daten verdeutlichen, dass der Austausch mit hcTnI R145G dazu führt, dass die Kraftentwicklung nach partieller Aktivierung mit pCa 5,64 nur noch leicht durch maximale Aktivierung gesteigert werden kann.

4.3 Auswirkungen der hcTnI R145G Mutante auf die kinetischen Parameter der Relaxation

Die Auswertung des initialen linearen Kraftabfalls nach Aktivierung mit pCa 5,88, 5,64 und 4,54 in hcTnI R145G ausgetauschten Myofibrillen zeigt, dass die größten Abweichungen auch hier für die Werte nach maximaler Ca^{2+} -Aktivierung (pCa 4,54) zu finden sind. Die Dauer der linearen Phase t_{LIN} ist dort bei hcTnI R145G ausgetauschten Myofibrillen mit $t_{\text{LIN}} = 0,060 \pm 0,020$ s verlängert, verglichen mit $t_{\text{LIN}} = 0,037 \pm 0,004$ s bei den mit hcTnI WT ausgetauschten Myofibrillen (Abb. IV-17). Auch die Ratenkonstante k_{LIN} der linearen Phase ist nach maximaler Ca^{2+} -Aktivierung mit $k_{\text{LIN}} = 1,9 \pm 08$ s⁻¹ verändert, verglichen mit den hcTnI WT ausgetauschten Myofibrillen mit $k_{\text{LIN}} = 3,9 \pm 1,1$ s⁻¹. Es lässt sich also eine Tendenz zu einem längeren und flacheren initialen Kraftabfall in den mit hcTnI R145G ausgetauschten Myofibrillen feststellen. Aufgrund der großen Streuung der Einzelwerte sind die Veränderungen von t_{LIN} und k_{LIN} in der initialen linearen Phase jedoch nicht signifikant.

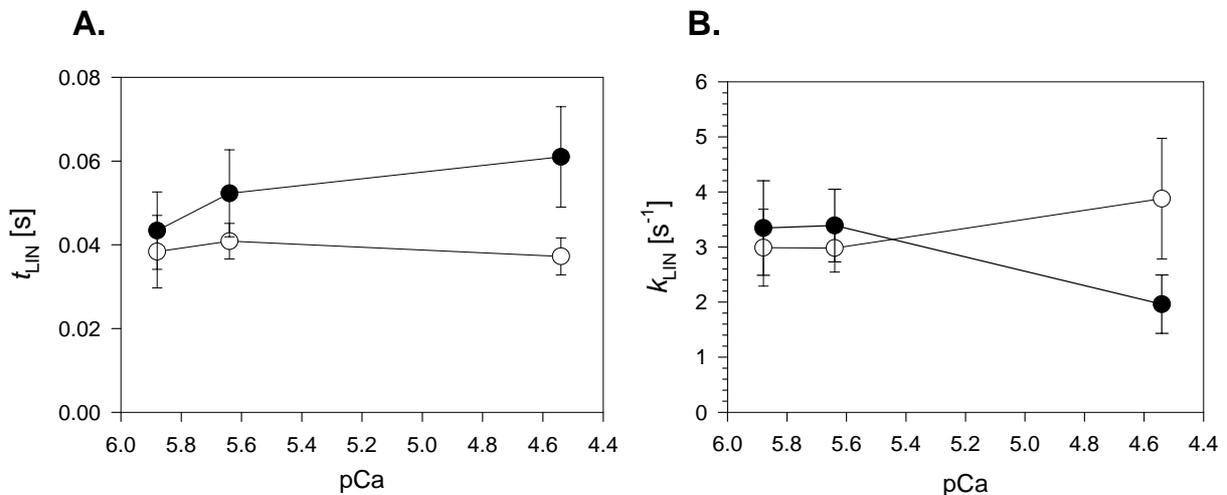


Abb. IV-17. Ca^{2+} -Abhängigkeit der linearen Phase des Kraftabfalls nach Austausch mit hcTnI R145G. Aufgetragen sind die ermittelten Werte für t_{LIN} (A.) und k_{LIN} (B.) in Abhängigkeit der Ca^{2+} -Konzentration (pCa). Die Werte für hcTnI WT ausgetauschte Myofibrillen sind durch die weißen Kreise (o) symbolisiert, die der mit hcTnI R145G ausgetauschten Myofibrillen durch schwarze Kreise (•). Die gezeigten Werte ergeben sich aus $n = 5-9$ Messungen.

Abb. IV-18 zeigt den Effekt der hcTnI R145G Mutation auf die exponentielle Phase des Kraftabfalls, beschrieben durch k_{REL} . Die mit hcTnI R145G ausgetauschten Myofibrillen

zeigen sowohl nach partieller Ca^{2+} -Aktivierung mit pCa 5,88 und pCa 5,64 als auch nach maximaler Ca^{2+} -Aktivierung mit pCa 4,54 eine verlangsamte exponentielle Relaxation. Eine statistische Signifikanz ergibt sich jedoch nur bei maximaler Aktivierung mit pCa 4,54. Hier ist die Ratenkonstante k_{REL} der mit hcTnI R145G ausgetauschten Myofibrillen mit nur $12,5 \pm 1,6 \text{ s}^{-1}$ um etwa 45 % reduziert, verglichen mit $23,4 \pm 2,6 \text{ s}^{-1}$ in den mit hcTnI WT ausgetauschten Kontrollen.

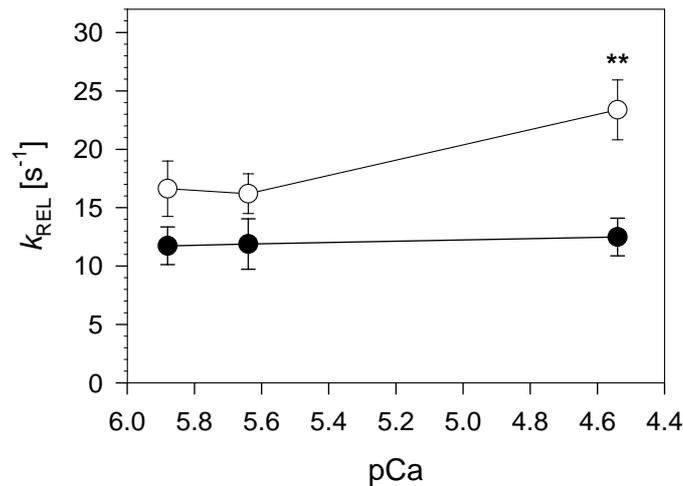


Abb. IV-18. Ca^{2+} -Abhängigkeit der Ratenkonstante k_{REL} des exponentiellen Kraftabfalls. Aufgetragen ist die Ratenkonstante k_{REL} gegen den pCa für hcTnI WT ausgetauschte Myofibrillen (o) und hcTnI R145G ausgetauschte Myofibrillen (●). Die Werte ergeben sich aus $n = 5-9$ Messungen (** $P < 0,01$).

Durch Reduktion der Ratenkonstante k_{REL} führt die FHC assoziierte Mutation R145G des hcTnI also zu einer signifikanten Verlangsamung des gesamten Kraftabfalls.

5 Funktionelle Auswirkungen der hcTnI G203S Mutante auf die Kraftentwicklung und Relaxation kardialer Myofibrillen der Maus

5.1 Auswirkungen der hcTnI G203S Mutante auf $F_{\text{pass}}/\text{CSA}$ und $F_{\text{max}}/\text{CSA}$ sowie auf die Ratenkonstante der Ca^{2+} -aktivierten Kraftentwicklung k_{ACT}

Die mit hcTnI G203S behandelten Präparate zeigen mit $F_{\text{pass}}/\text{CSA} = 14,6 \pm 2,6 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$ eine leicht erhöhte passive Kraft im Vergleich zu $F_{\text{pass}}/\text{CSA} = 13,0 \pm 2,0 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$ in den hcTnI WT ausgetauschten Myofibrillen. Bei der Betrachtung der Einzelwerte fällt dabei auf, dass wie bereits bei den mit hcTnI R145G ausgetauschten Myofibrillen beobachtet, manche der untersuchten Myofibrillen eine passive Kraft von etwa $20\text{-}30 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$ entwickeln, andere dagegen lediglich $5\text{-}10 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$. Obwohl sich für die Abweichungen dieser Daten keine statistische Signifikanz ergibt, kann eine tendenzielle Erhöhung der passiven Kraft nicht ausgeschlossen werden. Überraschenderweise findet man dagegen einen signifikanten Effekt bei Analyse der passiven Kraft in Abhängigkeit von der Sarkomerlänge. Für diese Bestimmung wird das zwischen Längengeber und Kraftaufnehmer befestigte Myofibrillenbündel in Abwesenheit von Ca^{2+} auf eine definierte Sarkomerlänge gedehnt, und die resultierende Auslenkung des Kraftaufnehmers in ein passives Kraftsignal übersetzt. Wie Abb.IV-19 zeigt, entwickeln die mit hcTnI G203S ausgetauschten Myofibrillen (●) dabei stets etwa doppelt so viel passive Kraft als die mit hcTnI WT ausgetauschten Myofibrillen (○).

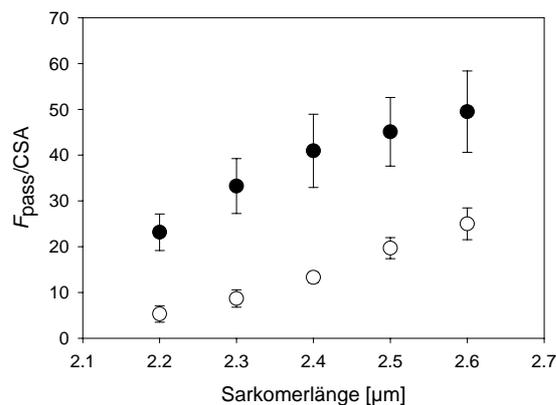


Abb. IV-19. Passive Kraft im Verhältnis zur Sarkomerlänge. Aufgetragen ist die passive Kraft $F_{\text{pass}}/\text{CSA}$ [nN/ μm^2] gegen die Sarkomerlänge [μm]. Weiße Kreise repräsentieren die erhaltenen Daten für hcTnI WT behandelte Myofibrillen (○), schwarze Kreise die Daten für hcTnI G203S behandelte Myofibrillen (●). Die dargestellten Werte ergeben sich aus Messungen an $n = 3$ (WT) und $n = 9$ (G203S) Myofibrillen.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht erklärbar, warum bei der Bestimmung der passiven Kraft über den sog. „*preslack*“, also einer kurzen Entdehnung der auf eine Sarkomerlänge von 2,3 μm vorgedehnten Myofibrille, keine signifikanten Abweichungen der passiven Kraft $F_{\text{pass}}/\text{CSA}$ festgestellt werden konnten.

In Abb. IV-20A ist die passive Kraft $F_{\text{pass}}/\text{CSA}$ beider Austauschgruppen und die maximale Ca^{2+} -induzierte Kraft $F_{\text{max}}/\text{CSA}$ aufgetragen. Die Kraftentwicklung als Antwort auf maximale Ca^{2+} -Aktivierung mit pCa 4,54 ist in den hcTnI G203S enthaltenden Myofibrillen leicht erniedrigt; auch hier sind die Abweichungen von mit hcTnI WT ausgetauschten Myofibrillen jedoch nicht statistisch signifikant.

Nahezu identisch zeigt sich die Ca^{2+} -Sensitivität der Kraftentwicklung in den untersuchten Myofibrillen. Abb. IV-20B zeigt die Beziehung zwischen der auf F_{max} normierten Kraft und dem pCa. Sowohl mit hcTnI WT als auch mit hcTnI G203S ausgetauschte Myofibrillen weisen dabei die gleiche Kraft- $[\text{Ca}^{2+}]$ -Beziehung auf.

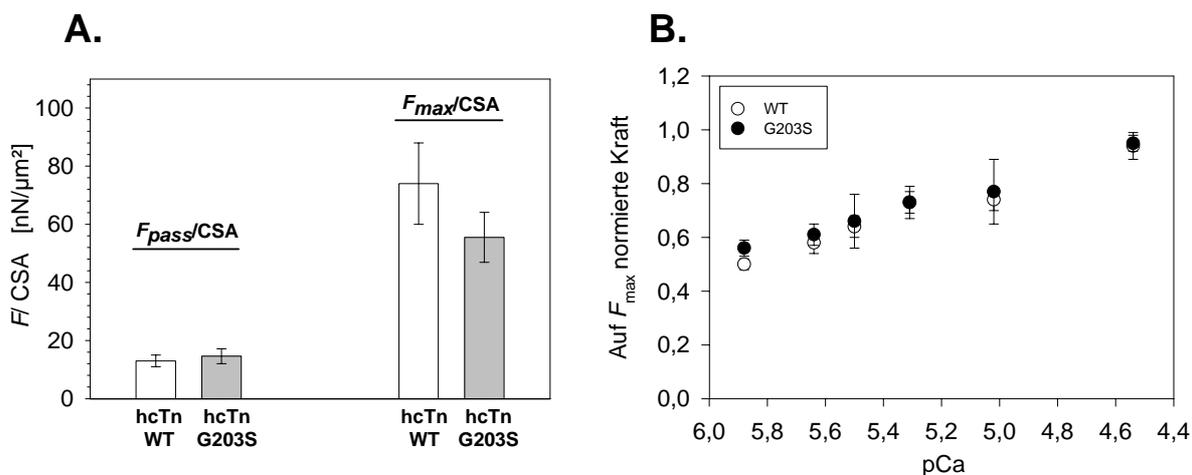


Abb. IV-20. Ca^{2+} -aktivierte Kraftentwicklung nach Austausch mit hcTn G203S. Dargestellt sind die passive Kraft $F_{\text{pass}}/\text{CSA}$ und die maximale Ca^{2+} -aktivierte Kraft pro Querschnitt ($F_{\text{max}}/\text{CSA}$) für kardiale Myofibrillen der Maus mit hcTnI WT (weiße Balken) bzw. hcTnI G203S ausgetauscht (graue Balken) (A.). Passive und aktive Kraft wurden bei einer Sarkomerlänge von 2,3 μm bestimmt. Im rechten Teil der Abbildung ist die auf F_{max} normierte Kraft gegen den pCa aufgetragen (B.). Weiße Kreise repräsentieren die erhaltenen Daten für hcTnI WT behandelte Myofibrillen (○), schwarze Kreise die Daten für hcTnI G203S behandelte Myofibrillen (●). Die dargestellten Werte ergeben sich aus Messungen an $n = 5-7$ (WT) und $n = 6-12$ (G203S) Myofibrillen.

In Abb. IV-21 ist die Ratenkonstante der Ca^{2+} -induzierten Kraftentwicklung k_{ACT} gegen den pCa aufgetragen. Weder bei partieller noch bei maximaler Ca^{2+} -Aktivierung kann eine

signifikante Veränderung festgestellt werden, die durch Inkorporation des mutierten hcTnI bedingt sein könnte.

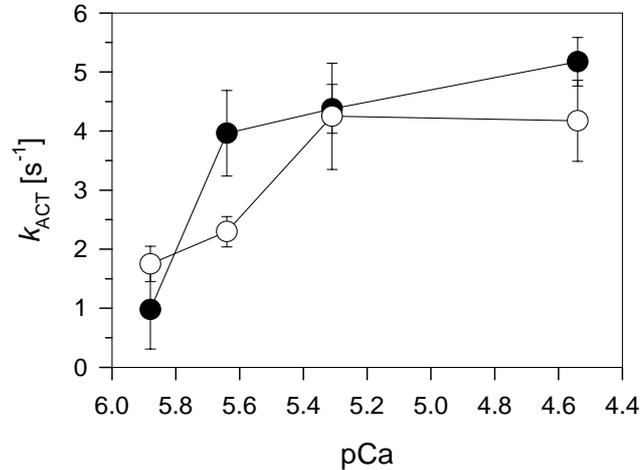


Abb. IV-21. Ca^{2+} -Sensitivität der Ratenkonstante Ca^{2+} -aktivierter Kraftentwicklung k_{ACT} . Aufgetragen ist die Ratenkonstante der Kraftentwicklung k_{ACT} gegen den pCa für hcTn WT ausgetauschte Myofibrillen (o) und für hcTn G203S ausgetauschte Myofibrillen der Maus (●). Die dargestellten Werte ergeben sich aus Messungen an $n = 4-7$ (WT) und $n = 6-12$ (G203S) Myofibrillen.

5.2 Auswirkungen der hcTnI G203S Mutante auf die kinetischen Parameter der Relaxation

Die mit G203S hcTn ausgetauschten Proben wurden auch auf ihre Relaxationskinetik hin untersucht. Dazu wurden die Parameter t_{LIN} , k_{LIN} und k_{REL} in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Aktivierung untersucht (Abb. IV-22 A-C.).

Sowohl die Dauer (t_{LIN}) als auch die Ratenkonstante (k_{LIN}) der linearen Phase zu Beginn der Relaxation werden durch die Inkorporation des hcTnI G203S nicht signifikant verändert. Ebenso verhält es sich mit der Ratenkonstante des schnellen, exponentiellen Kraftabfalls k_{REL} , auch sie wird durch den Troponinaustausch nicht in signifikantem Maß beeinflusst.

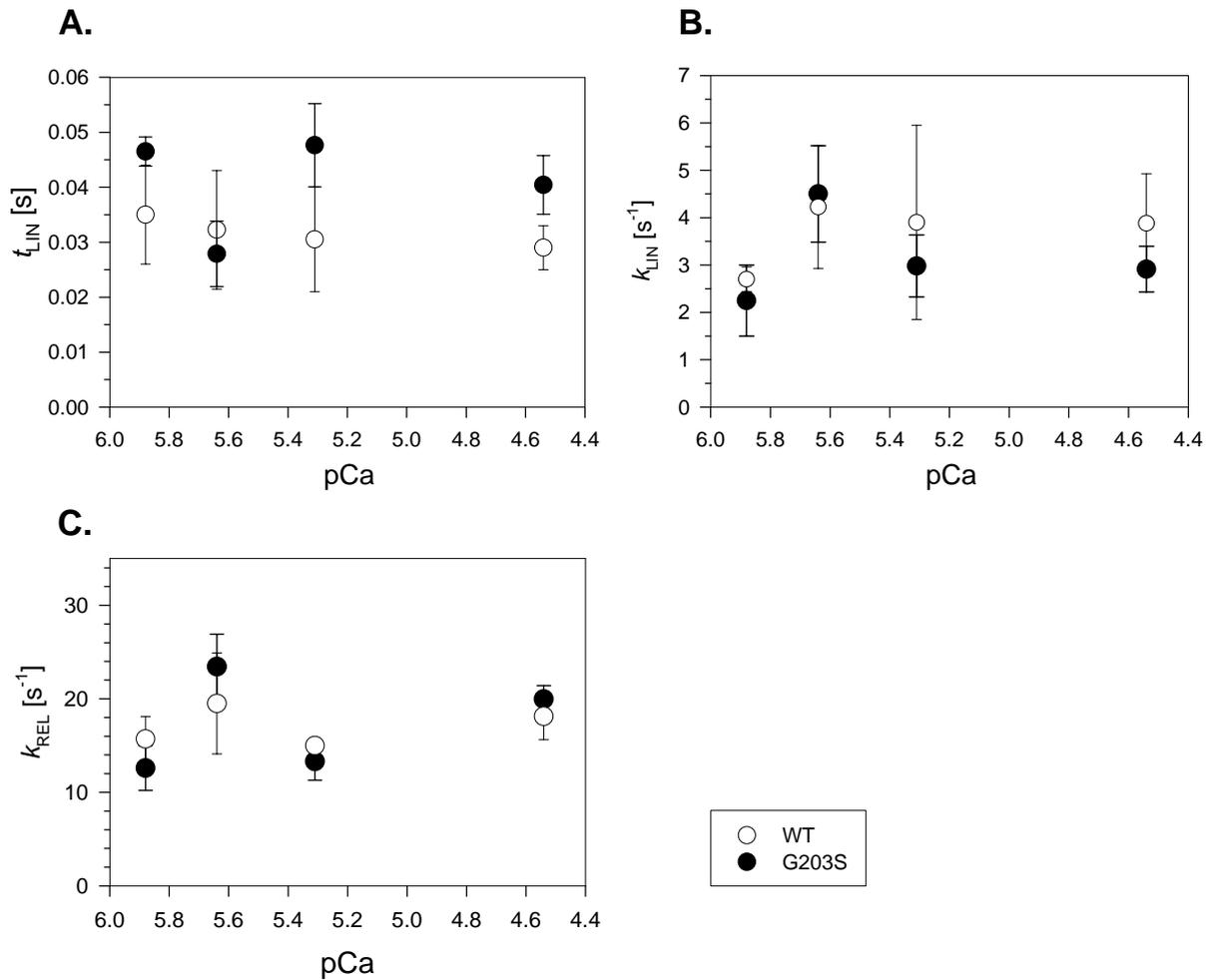


Abb. IV-22. Einfluss der hcTnI G203S Mutante auf die kinetischen Parameter des Kraftabfalls. Dargestellt ist die Ca^{2+} -Abhängigkeit für die Dauer der linearen Phase t_{LIN} (A.), für die Ratenkonstante der linearen Phase k_{LIN} (B.) und für die Ratenkonstante des exponentiellen Kraftabfalls k_{REL} (C.). Weiße Kreise symbolisieren die erhaltenen Werte aus hcTnI WT ausgetauschten Myofibrillen (○), schwarze Kreise die aus hcTnI G203S behandelten Myofibrillen (●). Die dargestellten Werte ergeben sich aus $n = 4-7$ (WT) und $n = 6-12$ (G203S) Messungen.

6. Kinetische Untersuchungen an humanen pathologischer Herzproben

6.1 Vorbemerkungen zur Untersuchung humaner Herzproben

Anders als bei den Studien an Papillarmuskeln von Mäusen, sind die Proben der humanen Spenderherzen und der humanen insuffizienten Herzen nicht direkt nach der Präparation zur Messung verwendet worden, sondern wurden nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff für längere Zeit (drei Monate bis zu drei Jahren) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Je nach klinischem Fall ist auch die medikamentöse Vorbehandlung der Patienten verschieden, so dass in der vorliegenden Studie nicht von einer identischen Vorbehandlung der einzelnen Herzen ausgegangen werden kann. Des Weiteren ist zu beachten, dass die untersuchten terminal insuffizienten Herzen lediglich auf Grund ihres klinischen Erscheinungsbildes in DCM- und ICM-Herzen eingeteilt wurden. Bedenkt man dabei die vielfältigen Ursachen, die im jeweiligen Fall zur dilatativen bzw. ischämischen Kardiomyopathie führen können, so ist bei der geringen Anzahl der hier analysierten Herzproben zusätzlich auch von einer unterschiedlichen Ätiologie, d.h. Ursächlichkeit der Erkrankung, auszugehen.

Auf Grund all dieser Überlegungen soll die hier vorliegende Studie in erster Linie zeigen, inwiefern sich die aus menschlichen Spenderherzen isolierten Myofibrillen für kinetische Analysen eignen, und ob sich möglicherweise auf Ebene der Querbrückenkinetik Unterschiede zwischen nicht-pathologischen und terminal insuffizienten Herzen ermitteln lassen.

Die drei nicht-pathologischen Spenderherzen werden im folgenden stets als „Spenderherzen“ bezeichnet werden, in Einzelaufstellungen erhielten sie die Kürzel NF 1 - NF 3 (NF = engl. „*non-failing*“). In der Gruppe der insuffizienten Herzen wurde zwischen ICM-Herzen (ischämische Kardiomyopathie) und DCM-Herzen (dilatare Kardiomyopathie) unterschieden. In Einzelaufstellungen erhielten die Gewebeproben die Kürzel ICM 1 - ICM 3, bzw. DCM 1 - DCM 2.

6.2 Die passive Kraft $F_{\text{pass}}/\text{CSA}$ und die maximale Ca^{2+} -induzierte Kraft $F_{\text{max}}/\text{CSA}$ von ICM- und DCM-Herzen

Wie bereits für die Studien an Papillarmuskeln der Maus wurden hier zunächst die passiven und aktiven Eigenschaften der Kraftentwicklung untersucht. Abb. IV-23 A. zeigt die

Mittelwerte und Standardfehler der Daten für F_{pass}/CSA und F_{max}/CSA . Wie aus der Abbildung ersichtlich wird, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der passiven und der maximalen Kraft in Proben aus nicht-pathologischen und insuffizienten Herzen festgestellt werden.

Um an einem Beispiel die teils deutliche Streuung der Einzelwerte zu zeigen, sind den Mittelwerten und Standardfehlern von F_{max}/CSA in Abb. IV-23B. die Einzelwerte der Messungen gegenübergestellt.

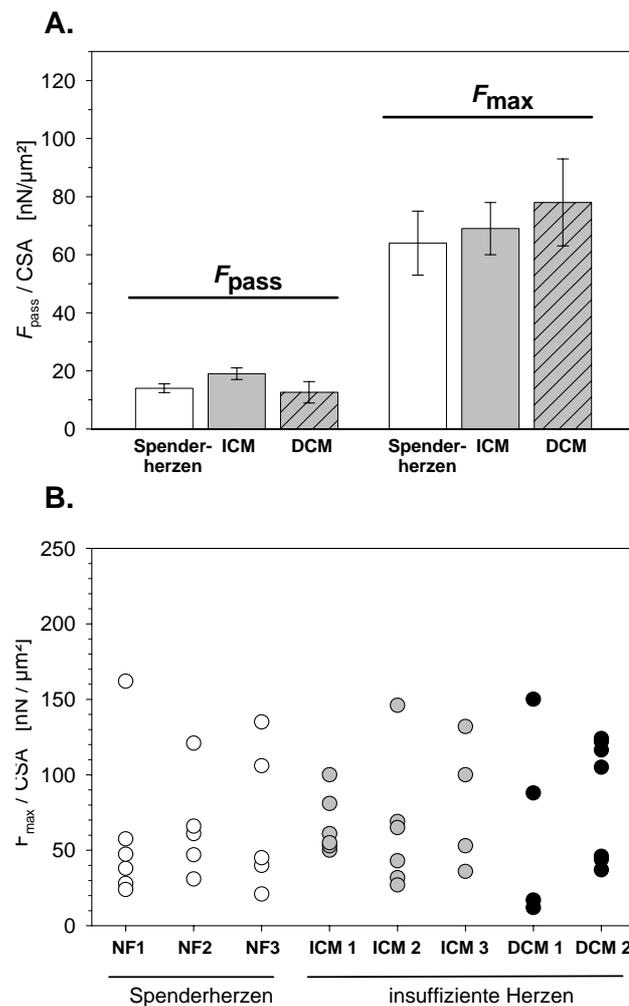


Abb. IV-23. F_{pass}/CSA und F_{max}/CSA in Spenderherzen und in insuffizienten Herzen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler der passiven Kraft F_{pass}/CSA und der Kraftentwicklung nach maximaler Ca^{2+} -Aktivierung F_{max}/CSA (A.). Dem sind Einzelwerte für F_{max}/CSA der Myofibrillen aus den Herzproben gegenübergestellt (B.). Dargestellt sind die Werte für $n = 16$ (NF1 - NF3; nichtpathologische Spenderherzen), $n = 16$ (ICM1-ICM3; Herzen mit ischämische Kardiomyopathie) und $n = 11$ (DCM1 - DCM2; Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie) Messungen.

6.3 Die Ratenkonstanten der Ca^{2+} -induzierten Kraftentwicklung k_{ACT} und des Kraftwiederanstiegs k_{TR}

Untersuchungen der maximalen Ca^{2+} -induzierten Kraftentwicklung in Myofibrillen der humanen Proben zeigten, dass die Kraftentwicklung in den ICM-Herzen deutlich schneller ist als in den Spenderherzen. Die Myofibrillen der ischämischen Herzen kontrahierten im Mittel mit einer Ratenkonstante k_{ACT} von $0,78 \pm 0,07 \text{ s}^{-1}$ verglichen mit einem Wert von $0,56 \pm 0,04 \text{ s}^{-1}$ in den untersuchten Spenderherzen. Die für DCM-Herzen ermittelten Werte waren ebenfalls gegenüber den Spenderherzen erhöht, lagen jedoch im Mittel bei einem nicht signifikanten Wert von $k_{\text{ACT}} = 0,7 \pm 0,08 \text{ s}^{-1}$ (Abb. IV-24). Der Ratenkonstante der Ca^{2+} -induzierten Kraftentwicklung k_{ACT} ist die Ratenkonstante des Kraftwiederanstiegs k_{TR} nach lastfreier Verkürzung während der Aktivierung gegenübergestellt. Die Werte für die Proben aus ICM- und DCM-Herzen sind auch hier gegenüber den nicht-pathologischen Spenderherzen leicht erhöht, die für k_{ACT} gefundene signifikante Erhöhung bei ICM-Herzen kann für k_{TR} jedoch nicht bestätigt werden.

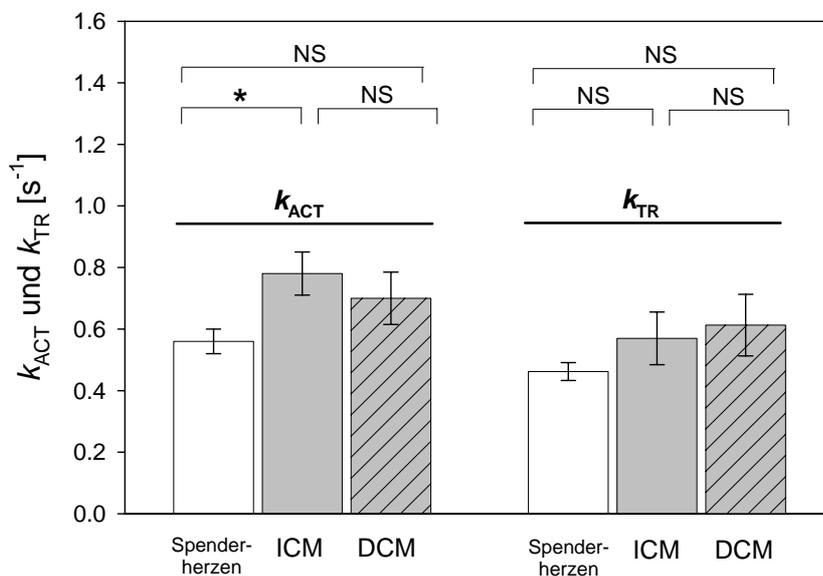


Abb. IV-24. Die Ratenkonstanten der Ca^{2+} -induzierten Kraftentwicklung k_{ACT} und des Kraftwiederanstiegs k_{TR} Gegenübergestellt sind die Werte für k_{ACT} (linke Seite) und k_{TR} (rechte Seite) für Spenderherzen, ICM-Herzen und DCM-Herzen bei maximaler Ca^{2+} -Aktivierung. Dargestellt sind die Werte für $n = 10$ (Spenderherzen), $n = 10$ (ICM) und $n = 11$ (DCM) Messungen. (NS = nicht signifikant, * $P < 0,05$ und ** $P < 0,01$)

Auch die Ca^{2+} -Sensitivität der Ratenkonstante k_{ACT} ist in den insuffizienten Herzen leicht erhöht. In Abb. IV-25 ist k_{ACT} gegen den pCa aufgetragen, die Sterne weisen auf starke Abweichungen der Daten pathologischer Herzen von den Daten nicht-pathologischer Spenderherzen hin. Am deutlichsten sind die Unterschiede bei partieller Ca^{2+} -Aktivierung mit pCa 5,64 bzw. 5,31 und bei maximaler Ca^{2+} -Aktivierung. Es wurden keine Werte für DCM- Herzen bei Aktivierung mit pCa 5,64 ermittelt.

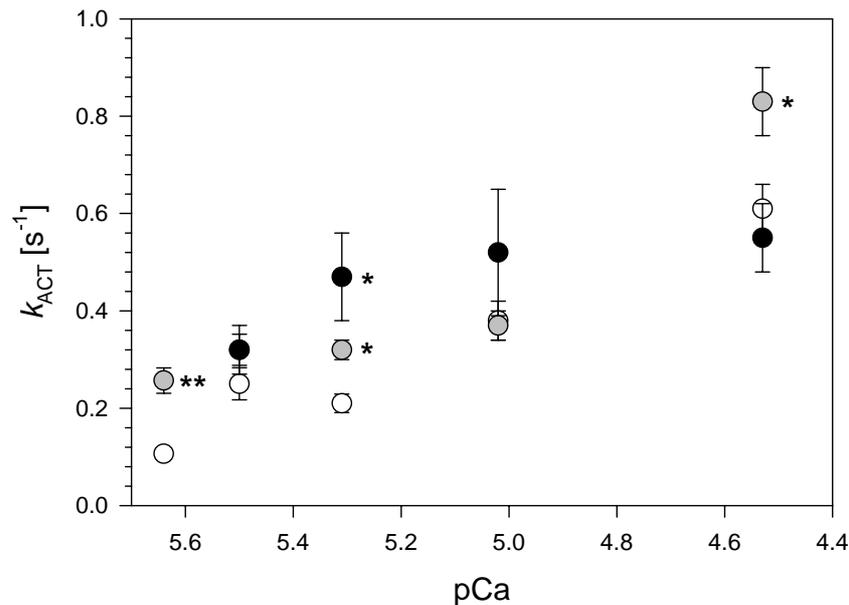


Abb. IV-25. Ca^{2+} -Abhängigkeit der Ratenkonstante k_{ACT} in humanen Herzen. Aufgetragen ist die Ratenkonstante k_{ACT} gegen den pCa für nicht-pathologische Spenderherzen (o), ICM-Herzen (◐) und DCM-Herzen (●). Die Sterne markieren signifikant abweichende Werte von Myofibrillen der ICM- bzw. DCM-Herzen gegenüber den ermittelten Werten aus Myofibrillen der Spenderherzen. Die dargestellten Werte ergeben sich aus $n = 4-16$ (Spenderherzen), $n = 4-16$ (ICM) und $n = 3-13$ (DCM) Messungen. (* $P < 0,05$ und ** $P < 0,01$)

Unterschiede in der Ca^{2+} -Abhängigkeit der Kraftentwicklung werden ebenfalls bei partieller Aktivierung mit niedrigen Kalziumkonzentrationen (pCa 5,88 und 5,64) deutlich. Abb. IV-26 zeigt die auf F_{max} normierte Kraftentwicklung isolierter Myofibrillen aus ICM- und DCM- Herzen in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Aktivierung (pCa). Signifikante Abweichungen der Werte für pathologische Herzen von den Werten der nicht-pathologischen Herzen sind in der Abbildung durch einen Stern gekennzeichnet. Die Ca^{2+} -aktivierte Kraftentwicklung in Myofibrillen aus DCM- und ICM-Herzen ist tendenziell Ca^{2+} -sensitiver als in Myofibrillen aus Spenderherzen.

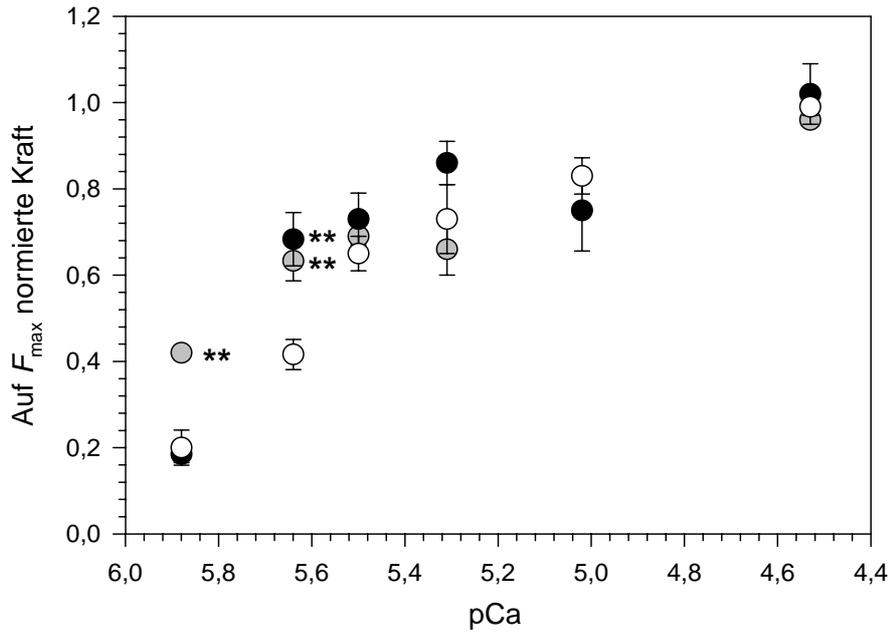


Abb. IV-26. Ca^{2+} -Sensitivität der Kraftentwicklung. Aufgetragen ist die auf F_{\max} normierte Kraft gegen den pCa. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von Myofibrillen aus nicht-pathologischen Spenderherzen (o), ICM-Herzen (◐) und DCM-Herzen (●). Signifikante Abweichungen der Werte für ICM- und DCM-Herzen von den Werten der nicht-pathologischen Herzen sind in der Abbildung durch einen Stern gekennzeichnet. Die dargestellten Werte ergeben sich aus $n = 4-16$ (Spenderherzen), $n = 4-16$ (ICM) und $n = 3-13$ (DCM) Messungen (** $P < 0,01$).

6.4 Die kinetischen Parameter der Relaxation in ICM- und DCM-Herzen

Bei der Analyse des initialen Kraftabfalls zeigt sich, dass nach maximaler Ca^{2+} -Aktivierung sowohl die Dauer der linearen Phase t_{LIN} als auch die Ratenkonstante des langsamen Kraftabfalls k_{LIN} bei den untersuchten DCM-Herzen verändert ist. Die Werte für t_{LIN} liegen bei den Myofibrillen aus nicht-pathologischen Spenderherzen sowie bei denen aus ICM-Herzen im Bereich von 0,3 s. Die Rate dieses langsamen Kraftabfalls betrug in beiden Gruppen etwa $0,2 \text{ s}^{-1}$. Die ermittelten Werte für die untersuchten Proben aus DCM-Herzen lagen dagegen deutlich über den Werten der ICM- und der Spenderherzen. Die lineare Phase t_{LIN} zeigte sich dort mit Werten um 0,45 s signifikant verlängert. Doch nicht nur die Länge der linearen Phase, sondern auch die Rate des Kraftabfalls ist hier mit Werten von $k_{\text{LIN}} \approx 0,4 \text{ s}^{-1}$ deutlich gegenüber den Werten von Spenderherzen und ICM-Herzen erhöht.

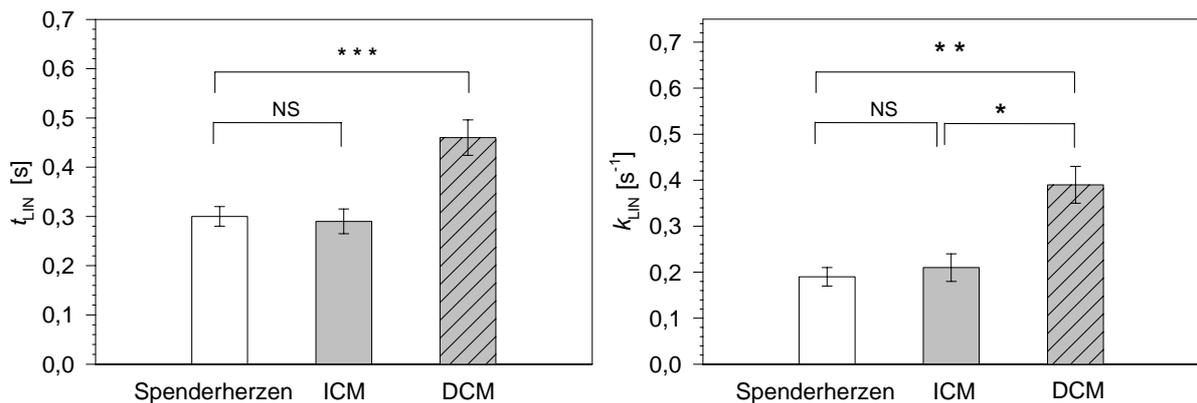


Abb. IV-27. Kinetik der linearen Phase der Relaxation. Dargestellt sind t_{LIN} (A.) und k_{LIN} (B.) für Spenderherzen (weiße Balken), ICM Herzen (graue Balken) und DCM Herzen (gestreifte graue Balken) nach maximaler Ca^{2+} -Aktivierung. Die dargestellten Werte ergeben sich aus analysierten Messungen von $n = 14$ (Spenderherzen), $n = 14$ (ICM) und $n = 13$ (DCM) Myofibrillen (NS = nicht signifikant, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$).

Für den exponentiellen Kraftabfall zeigen sich ebenfalls Unterschiede zwischen insuffizienten und nicht-pathologischen Herzen (Abb. IV-28). Die Myofibrillen der DCM- und der Spenderherzen relaxieren nach maximaler Ca^{2+} -Aktivierung in der exponentiellen Phase mit einer Rate k_{REL} von $3,57 \pm 0,35 \text{ s}^{-1}$ (DCM) bzw. $3,34 \pm 0,30 \text{ s}^{-1}$ (Spenderherzen). Mit Werten

von $k_{\text{REL}} = 2,22 \pm 0,21 \text{ s}^{-1}$ dagegen ist die Ratenkonstante des exponentiellen Kraftabfalls in Myofibrillen der insuffizienten ICM-Herzen maßgeblich reduziert.

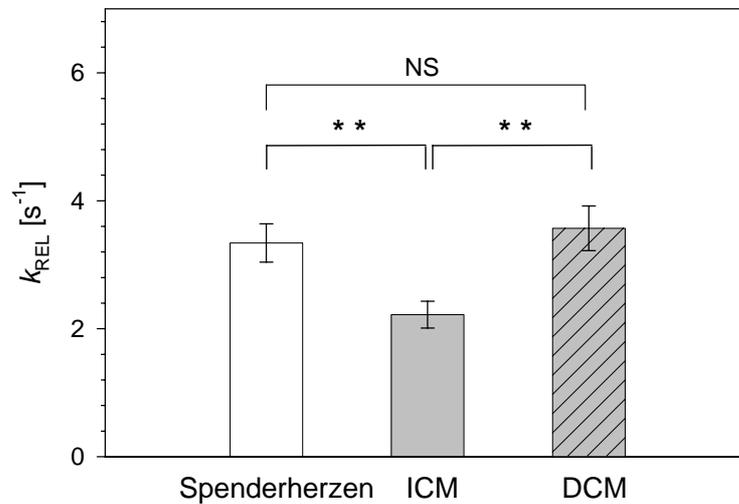


Abb. IV-28. Ratenkonstante k_{REL} in humanen Herzproben. Gegenübergestellt sind die Werte der Ratenkonstante k_{REL} nach maximaler Ca^{2+} -Aktivierung von Myofibrillen aus Spenderherzen (weißer Balken), ICM-Herzen (grauer Balken) und DCM-Herzen (grauer schraffierter Balken). Die dargestellten Werte ergeben sich aus $n = 14$ (Spenderherzen), $n = 14$ (ICM) und $n = 13$ (DCM) Messungen (NS = nicht signifikant, ** $P < 0,01$).

Anders als die Ratenkonstante der Ca^{2+} -induzierten Kraftentwicklung k_{ACT} unterliegt die Kinetik des biphasischen Kraftabfalls nur einer schwachen Ca^{2+} -Abhängigkeit. Untersuchungen zur Ca^{2+} -Sensitivität des Kraftabfalls konnten in der vorliegenden Arbeit zudem keine signifikanten Unterschiede zwischen den insuffizienten und den nicht-pathologischen Herzen aufzeigen.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass sowohl die Myofibrillen aus DCM- als auch ICM-Herzen langsamer relaxieren als die der nicht-pathologischen Spenderherzen. Dabei sei hervorgehoben, dass sich innerhalb der insuffizienten Herzen deutliche Unterschiede zwischen DCM und ICM hinsichtlich der kinetischen Parameter herausstellen lassen. In DCM-Herzen beruht der Effekt auf einer verlängerten linearen Phase, in ICM-Herzen hingegen auf einer verlangsamten exponentiellen Phase.

V Diskussion

1 Der hcTn Austausch in kardialen Myofibrillen der Maus

1.1 Die kardiale Myofibrille als „Mini-Modell“ des Herzmuskels

Bevor die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse in den folgenden Abschnitten im Einzelnen diskutiert werden, sollen kurz die Unterschiede zwischen dem hier verwendeten Muskelmodell der Myofibrille und dem seit längerem etablierten Modell der permeabilisierten multizellulären Präparate erläutert werden.

Das Prinzip der beiden Messtechniken ist dabei eigentlich das gleiche: Ein gehäutetes und damit von der intrazellulären Ca^{2+} -Regulation unabhängiges Muskelpräparat wird zwischen einem Längengeber und einem Kraftaufnehmer fixiert und kann durch gezielten Lösungswechsel entweder mit Ca^{2+} aktiviert oder durch Entfernen des Ca^{2+} relaxiert werden. Da es sich bei den gehäuteten Faserpräparaten im Gegensatz zu den isolierten Myofibrillen um ein multizelluläres Präparat handelt, unterliegen diese Messungen einigen Limitationen. Durch die Größe des Präparates und vor allem durch seinen Durchmesser (etwa 200-250 μm) ist eine schnelle Äquilibration der kontraktilen Proteine mit der umgebenden aktivierenden, bzw. relaxierenden Lösung nur bedingt möglich. Eine Modifikation der klassischen „skinned fiber“-Methode ist die der Blitzlichtphotolyse, bei der Ca^{2+} -Ionen oder Ca^{2+} -Chelatoren als sogenannte „caged compounds“ durch einen Lichtblitz schnell freigesetzt werden können. Dadurch können beispielsweise Ca^{2+} -Ionen schnell aus der Lösung entfernt werden, was eine Relaxation des Muskelpräparates einleitet. Die Diffusionsgeschwindigkeit der Substrate (Ca^{2+} , ADP, P_i) in das Muskelpräparat kann durch diese Methode jedoch nicht beschleunigt werden, diese bleibt weiterhin ein limitierender Faktor. Eine weitere Limitierung der Kraftmessungen an mehrzelligen Faserpräparaten besteht in einer möglichen Substratakkumulation in dem Zellverbund des untersuchten Präparates. Dadurch kann zu keinem Zeitpunkt der Messung von einer vollständigen Kontraktion und insbesondere von einer vollständigen Relaxation des Muskelpräparates ausgegangen werden. Hinzu kommt, dass die Orientierung der Myofilamente innerhalb der untersuchten Muskelfaser ebenso unkontrollierbar ist, wie die konkrete Sarkomerlänge innerhalb der einzelnen Myofibrillen. Dadurch unterliegen Messungen an mehrzelligen Präparaten einer starken Variabilität, was insbesondere Untersuchungen an pathologischem Material deutlich limitiert.

Anders ist es bei dem Modell der Myofibrillen. Diese aus dem Zellverbund herausgelösten, kleinsten kontraktile Einheiten haben einen Durchmesser von lediglich 2-3 μm , was die Diffusionslimitierung weitgehend aufhebt. Durch die Verwendung einer doppelkanäligen Mikrokapillare ist der Lösungswechsel hier innerhalb von 10-20 ms abgeschlossen.

Die Möglichkeit, zu jedem Zeitpunkt der Messung über eine CCD-Kamera das Sarkomverhalten verfolgen zu können, bietet weitere Vorteile. So können nicht nur partielle Aktivierungen oder Beschädigungen der Myofibrillen vor und während einer Messung protokolliert werden, es ermöglicht darüber hinaus auch eine Vordehnung der Myofibrillen auf eine definierte Sarkomerlänge. Durch das stark reduzierte kontraktile System können Änderungen im Verhalten der Kraftentwicklung und Relaxation in diesem Modell direkt auf Änderungen in der Aktomyosin-Interaktion zurückgeführt werden.

Ein weiterer Vorteil dieser Messtechnik ist die Möglichkeit, die Kinetik nicht nur der Kraftentwicklung, sondern auch der Relaxation zu untersuchen. Durch den schnellen Lösungswechsel und der Fähigkeit kardialer Myofibrille äußerst schnell mit der umgebenden Lösung zu äquilibrieren, konnte ein biphasischer Verlauf des Kraftabfalls nach Entfernen der Ca^{2+} -Ionen beobachtet werden. Bei Kraftmessungen an mehrzelligen, kardialen Faserpräparaten ist eine solche Biphasizität durch den diffusionslimitierten, langsamen Kraftabfall nicht erkennbar. Das Myofibrillen-Modell ermöglicht es also erstmals, die Kinetik des Kraftabfalls in die Untersuchung von Muskelpräparaten mit einzubeziehen.

Trotz der Vorteile, die das Mini-Modell der Myofibrillen mitbringt, sollen die hier vorgestellten Daten auch kritisch betrachtet werden. Dazu ist es nötig, die möglicherweise limitierenden Schritte dieser Methode zu erläutern.

In Vorversuchen wurde untersucht, inwiefern der hier verwendete Lösungswechsel einen ratenlimitierenden Schritt der Myofibrillenaktivierung bzw. -relaxation darstellt. Der piezogesteuerte Positionswechsel der doppelkanäligen Mikrokapillare erfolgt sehr schnell (innerhalb von 10-20 ms), durch Verwendung unterschiedlicher Ca^{2+} bzw. Ca^{2+} -EGTA-Konzentrationen konnte ausgeschlossen werden, dass es während des Positionswechsels zu einer Vermischung der beiden Lösungsströme, und so zu einer Aktivierung bzw. Relaxation der Myofibrillen kommt [Stehle *et al.*, 2002b]. Eine Ratenlimitierung der Aktivierung bzw. Relaxation der Myofibrillen durch den Lösungswechsel kann durch diese Analysen somit ebenfalls ausgeschlossen werden.

Wird eine kardiale Myofibrille in einen Ca^{2+} -haltigen Lösungsstrom gebracht, kommt es zu einem monoexponentiellen Verlauf des Kraftanstiegs. Wird Ca^{2+} wieder aus der Lösung entfernt, fällt die Kraft in einem biphasischen Kurvenverlauf ab, der aus einer linearen und einer sich anschließenden exponentiellen Phase des Kraftabfalls besteht. Es ist anzunehmen, dass Änderungen in der Kinetik entweder auf Veränderungen in der Ca^{2+} -Regulation durch den Troponinkomplex beruhen, oder auf Veränderungen in der Aktin-Myosin-Interaktion selbst.

Es gibt mehrere Schritte, die dabei möglicherweise ratenlimitierend auf die Kinetik der Kraftentwicklung und Relaxation wirken könnten. Als erster Schritt der Ca^{2+} -Aktivierung steht die Ca^{2+} -Bindung an den Troponinkomplex. Im nächsten Schritt wird diese Ca^{2+} -Bindung auf die anderen Troponinuntereinheiten weitergeleitet, was die in II-1.5.2 beschriebenen komplexen Konformationsänderungen initiiert, welche in letzter Konsequenz zu einer Freigabe der Myosinbindestelle auf Aktin führen. Ist diese Bindestelle freigelegt, kommt es zur Aktomyosin-Interaktion und als Folge davon zur Bildung kraftgenerierender Querbrücken.

Wird Ca^{2+} entzogen, läuft dieser Prozess quasi rückwärts ab, und die inhibitorische Funktion des Troponinkomplexes sollte weitere Aktomyosininteraktionen verhindern. Die Komplexität dieser Interaktionen verdeutlicht, dass Veränderungen in der Querbrückenkinetik also durch primäre Veränderungen der Aktomyosininteraktion oder aber durch eine beeinträchtigte regulatorische Funktion des Tn verursacht werden kann.

Die folgenden Kapitel sollen nun diskutieren, inwiefern die an dem Modell der Myofibrillen angewendeten Troponinaustauschexperimente Einfluss auf die kinetischen Parameter der Kraftentwicklung und Relaxation, und somit auf die Querbrückenkinetik haben.

Des Weiteren wird diskutiert werden, ob sich humanes pathologisches Spendermaterial zur Untersuchung am System isolierter Myofibrillen eignet, und inwiefern Veränderungen in der Querbrückenkinetik in Zusammenhang mit dem beobachteten klinischen Krankheitsbild stehen könnten.

1.2 Der hcTn Komplex lässt sich in kardialen Myofibrillen der Maus austauschen

Die Untereinheiten des hcTn wurden in *E.coli* überexprimiert, chromatographisch isoliert und zu einem funktionellen Proteinkomplex rekonstituiert. Dieser Troponin Komplex wurde in subzelluläre Myofibrillenbündel aus Mausherzen inkorporiert. Western Blot Analysen ausgetauschter Myofibrillen-Suspensionen machten deutlich, dass die Inkorporation von sTn in die Myofibrillen gleichzeitig die Dissoziation des endogenen cTn Komplexes zur Folge hatte.

Durch vorangegangene Austauschexperimente mit fluoreszenzmarkiertem sTn konnte gezeigt werden, dass das exogene Troponin präferentiell in den A-Banden der Sarkomere bindet [Abb.IV-7]. Die Ergebnisse des Austausches mit fluoreszenzmarkiertem Protein zeigten darüber hinaus auf lichtmikroskopischem Niveau, dass der Austausch nicht zu einer Veränderung in der Sarkomerstruktur, insbesondere zu einer Überkontraktion führt.

Diese Daten werden unterstützt durch die Beobachtungen von She *et al.*, (2000) und Brenner *et al.*, (1999a und 1999b) an skelettalen Myofibrillen, bei denen exogener Tn Komplex vornehmlich in den Überlappungsregionen von Aktin- und Myosinfilamenten ausgetauscht wird, und spezifisch in den A-Banden des Sarkomers bindet.

Die hier vorgestellten Daten für den Proteinaustausch verdeutlichen weiter, dass die Troponin - Isoformen nach 30 Minuten Austausch in ungefähr gleichem Verhältnis in der Myofibrille vorhanden sind, und erst nach etwa 60 min. ein nahezu vollständiger Austausch stattgefunden hat. Die Dauer des Austauschprozesses kann also nicht allein durch eine langsame Diffusion des exogenen Troponins in die Myofibrille bedingt sein, sondern wird höchstwahrscheinlich, wie von She *et al.* (2000) vorgeschlagen, durch eine langsame Dissoziationskinetik des endogenen Komplexes limitiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der hier vorliegenden Arbeit der endogene Tn Komplex in kardialen Myofibrillen der Maus vollständig durch exogenen Tn Komplex ersetzt werden konnte, ohne dass die strukturelle Integrität, wie z.B. die Sarkomerstruktur der Myofibrille gestört wurde.

1.3 Mit hcTn ausgetauschte kardiale Myofibrillen bleiben vollständig Ca^{2+} -reguliert

Nach Ca^{2+} -Aktivierung entwickelt sich die Kraft sowohl in Kontrollmyofibrillen als auch in hcTn ausgetauschten Myofibrillen in einem monoexponentiellen Kurvenverlauf (beschrieben durch k_{ACT} [IV-Abb.12A]), bis sie schließlich ein Plateau erreicht. Normiert man diese maximale Ca^{2+} -aktivierte Kraft F_{max} auf den jeweiligen Myofibrillenquerschnitt ($\text{CSA} = \text{cross-sectional area}$) wird deutlich, dass hcTn ausgetauschte Myofibrillen die gleiche Ca^{2+} -aktivierte Kraft entwickeln wie nicht ausgetauschte Myofibrillen [IV-Abb.12B]. Zudem führt der Troponin - Austausch nicht zu einer Erhöhung der passiven Kraft F_{pass} pro Querschnitt ($F_{\text{pass}}/\text{CSA}$). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die Myofibrillen der Maus nach einem Troponin - Austausch vollständig Ca^{2+} -reguliert bleiben, was darauf hinweist, dass die rekombinanten Troponinuntereinheiten als funktioneller Komplex in die Myofibrillen integriert wurden.

1.4 HcTn Isoformen zeigen keinen Einfluss auf die speziesspezifische Kontraktions- und Relaxationskinetik kardialer Myofibrillen der Maus

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt und von uns bereits publiziert wurde, ist die Kinetik der Kraftentwicklung und der Relaxation in kardialen Myofibrillen von Maus, Meerschweinchen und Mensch stark verschieden [Stehle *et al.*, 2002b]. Zwar zeigen sowohl die myofibrilläre Kraftentwicklung als auch die Relaxation in allen drei Spezies einen exponentiellen, bzw. biphasischen Verlauf, die Ratenkonstanten der einzelnen Phasen sind in den humanen Proben jedoch im Mittel um ein 5-faches bzw. ein 10- bis 15-faches langsamer als in Myofibrillen aus Meerschweinchen bzw. Mäusen. Diesbezügliche speziesspezifischen Unterschiede in der Kinetik wurden auch von anderen Arbeitsgruppen in Triton-X-100 gehäuteten multizellulären Präparaten gemessen [Palmer & Kentish, 1998]. Die Unterschiede in der Kraftkinetik korrelieren mit den physiologischen Messwerten des Herzschlags. Dieser liegt für den Menschen in Ruhe bei $\sim 70 \text{ min}^{-1}$, für Meerschweinchen bei $\sim 250 \text{ min}^{-1}$ und für Mäuse sogar bei $\sim 550 \text{ min}^{-1}$. Es lässt sich also folgern, dass die Querbrückenkinetik in höchstem Grade an die speziesspezifische Dynamik des Herzens angepasst sein muss. Welche Faktoren an der speziesspezifischen Ausprägung der Kraftkinetik beteiligt sind, ist noch weitgehend unklar.

Kinetische Studien an isolierten regulatorischen Proteinen des Sarkomers hatten zuvor gezeigt, dass die Ca^{2+} -Bindung an und der Ablöseprozess von der Bindestelle II des cTnC bei niedrigen Temperaturen (4°C) mit einer Ratenkonstante von mehreren hundert pro Sekunde stattfindet [Hazard *et al.*, 1998]. Bindungsraten, die für fluoreszenzmarkiertes cTnC bestimmt wurden, waren jedoch um einiges niedriger [Hazard *et al.*, 1998, Dong *et al.*, 1996]. Eine noch langsamere Kinetik der Ca^{2+} -Bindung wurde in Studien beobachtet, bei denen cTnC mit cTnI oder cTnT komplexiert [Dong *et al.*, 1997], oder in ein vollständiges dünnes Filament gebunden war [Miki *et al.*, 1993]. Diese Daten werfen die ungeklärte Frage auf, ob mit weiterer Zunahme der Komplexität, d.h. die Integration des TnC in die Struktur der Myofibrille, der Troponinkomplex einen ratenlimitierenden Einfluss auf die Kraftentwicklung oder die Relaxation ausübt. Da für die kardialen Troponinuntereinheiten darüber hinaus speziesspezifische Isoformen gefunden wurden, stellt sich weiter die Frage, ob der Troponinkomplex direkt an den beobachteten speziesspezifischen Unterschieden in der Kinetik der Kraftentwicklung und Relaxation beteiligt sein könnte.

Die vorliegende Studie demonstriert, dass die Inkorporation des humanen kardialen Tn Komplexes in kardiale Myofibrillen der Maus, keinen verlangsamenden Effekt auf die Ratenkonstante k_{ACT} hat. Unter der Annahme, dass der humane Troponinkomplex in einer

Myofibrille der Maus die gleiche intrinsische Kinetik aufweist wie in einer menschlichen Myofibrille, könnten diese Daten ein Beleg dafür sein, dass die Kraftentwicklung in humanem Myokard nicht durch die Schalterfunktion des Tn Komplexes ratenlimitiert wird. Einen weiteren Hinweis darauf liefert der Befund, dass sowohl bei menschlichen als auch bei murinen Präparaten die Ratenkonstante der Kraftentwicklung nach Ca^{2+} -Aktivierung (k_{ACT}) die gleiche ist wie die des Kraftwiederanstiegs (k_{TR}) nach einer lastfreien Verkürzung in kontinuierlicher Anwesenheit von Ca^{2+} [Stehle *et al.*, 2002b]. Stellt man dies in den Kontext des momentan vornehmlich akzeptierten Querbrücken-Modells [Brenner *et al.*, 1988] wird deutlich, dass in kardialen Myofibrillen die schnelle Vermittlung der Ca^{2+} -Induktion durch den regulatorischen Troponinkomplex nicht der ratenlimitierende Schritt der Muskelkontraktion sein kann. Dadurch werden die Vermutungen unserer und anderer Arbeitsgruppen unterstützt, dass es die Ratenkonstanten der Aktin-Myosin Interaktion sind, also die der kraftgenerierenden Zustände des Querbrückenzyklus, welche die Kinetik der Kraftentwicklung maßgeblich bestimmen [Stehle *et al.*, 2002b; Colomo *et al.*, 1998; Palmer & Kentish *et al.*, 1998; Tesi *et al.*, 2002].

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass der Austausch des mcTn gegen hcTn in murinen Myofibrillen auch keinen maßgeblichen Einfluss auf die myofibrilläre Kinetik des Kraftabfalls hat. Weder die Länge der linearen Phase (t_{LIN}), deren Ratenkonstante (k_{LIN}), noch die Ratenkonstante des exponentiellen Kraftabfalls (k_{REL}) wurden durch den Troponinaustausch verlangsamt [Abb.IV-14]. Leider gibt es bisher keine Daten über das kinetische Verhalten der speziesspezifischen Tn Isoformen, es ist also nicht bekannt, ob hcTn generell eine langsamere „off-Kinetik“ aufweist als mcTn (murines cTn), und ob diese ratenlimitierend für die Relaxation sein könnte. Die hier präsentierten Daten lassen jedoch den Schluss zu, dass auch die Kinetik des Kraftabfalls in den untersuchten Myofibrillen der Maus nicht durch die Kinetik der humanen cTn Isoformen limitiert wird.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass weder die Kinetik der Kraftentwicklung noch die der Relaxation in kardialen Myofibrillen der Maus einer Ratenlimitierung durch die humanen cTn Isoformen unterliegt. Da es bisher keine Daten über einen Unterschied in der „on-off-Kinetik“ der speziesspezifischen Troponinkomplexe gibt, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass innerhalb einer Myofibrille der Maus die Aktivierungs- bzw. Inaktivierungskinetik des murinen Troponinkomplexes ratenlimitierend auf die Kraftentwicklung und Relaxation wirkt. Auch mögliche Rückkopplungseffekte der Querbrückenkinetik auf die Aktivierungs- bzw.

Inaktivierungskinetik des Troponinkomplexes können durch den hier vorgestellten Austausch von Troponinisoformen unterschiedlicher Spezies nicht geklärt werden.

Die Kinetik des Kraftanstiegs reflektiert direkt die Querbrückenkinetik, welche wiederum stark von der Aktivität der Myosin ATPase abhängt. Im Myokard sind bislang zwei Isoformen der MHC bekannt, α -MHC und β -MHC, welche beide unterschiedliche ATPase Aktivitäten aufweisen. Innerhalb einer Spezies kommt jedoch in der Regel nur eine der Isoformen vor. Beispielsweise enthalten Ventrikel aus menschlichen Herzen nahezu ausschließlich β -MHC, Ventrikel aus Mäuseherzen dagegen nur α -MHC [Reiser *et al.*, 1998]. Das legt zunächst die Vermutung nahe, dass Unterschiede in der Kinetik der Kraftentwicklung und Relaxation möglicherweise in der Verteilung der MHC-Isoformen begründet liegt. Dagegen spricht jedoch eine bereits von uns publizierte Studie in der gezeigt wurde, dass die Kinetik der Kraftentwicklung und Relaxation in kardialen Myofibrillen des Meerschweinchens 3-5-fach schneller abläuft als im Menschen [Stehle *et al.*, 2002b], obwohl die Meerschweinchen ebenfalls fast ausschließlich die β -Isoform der MHC besitzen [Reiser *et al.*, 1998]. Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass die Isoformen der MHC alleine für die beobachteten speziesspezifischen Unterschiede in der Querbrückenkinetik verantwortlich sind. Eine konkrete Erklärung des speziesspezifischen Kontraktions- bzw. Relaxationsverhaltens kardialer Myofibrillen steht zum jetzigen Zeitpunkt noch aus.

2 Der hcTnI R145G Austausch in kardialen Myofibrillen der Maus

2.1 HcTnI R145G führt zu einer tendenziell erhöhten passiven Kraftentwicklung und zu einer Verminderung der maximalen Ca^{2+} -induzierten Kraftentwicklung

Die Mutation R145G liegt in der zentralen Inhibitorregion (Position 137-148) des cTnI. Die Proteinsequenz innerhalb dieser Region ist strikt konservativ, und 100 % homolog zu dem entsprechenden Bereich von Position 104-115 auf dem TnI der schnellen Skelettmuskulatur (fsTnI). Diese vollständige Homologie findet man auch in unterschiedlichen Spezies wie Maus, Meerschweinchen, Kaninchen und Mensch. *In vitro* Studien konnten zeigen, dass eine kurze synthetische Peptidsequenz aus dieser Inhibitorregion (Position 128 - 148) an das Aktin-Tropomyosin-Filament binden kann und bereits eine Inhibition der Aktomyosin ATPase verursacht [Tripet *et al.*, 1997]. Wie wichtig jede einzelne Aminosäure in diesem Abschnitt für die Proteinfunktion ist, zeigte eine Studie in der ein Austausch jeder der 12 auf dem Inhibitorpeptid lokalisierten Aminosäuren durch Glycin zu einer verminderten Inhibition der Aktomyosin ATPase führte [Van Eyk *et al.*, 1988]. Für die FHC Mutation R145G auf hcTnI konnte dieser Effekt sowohl für die Aktomyosin ATPase [Elliot *et al.*, 2000] als auch für die myofibrilläre ATPase [Takahashi-Yanaga *et al.*, 2001] bestätigt werden. Innerhalb der inhibitorischen Region liegt die Mutation R145G im COOH-terminalen Bereich. In vorangegangenen Studien war bereits berichtet worden, dass diese argininreiche Hälfte der inhibitorischen Region direkt für die Interaktion des TnI mit Aktin verantwortlich ist [Talbot & Hodges 1981; Szczechsna *et al.*, 1999; Grand *et al.*, 1982]. Eine Mutation in diesem Bereich könnte möglicherweise signifikante Effekte auf die TnI-Aktin-Interaktion hervorrufen. Eine eingeschränkte inhibitorische Funktion des TnI und somit eine fehlgeleitete Regulation der Aktin-Myosin-Interaktion würde dieser Hypothese nach zu dauerhaft „aktivierten“ Aktinfilamenten führen. Das würde weiter bedeuten, dass Sarkomere nicht mehr vollständig relaxieren können, was wiederum in einer Erhöhung der passiven Kraft einer Myofibrille resultieren müsste.

In der vorliegenden Arbeit wurde tatsächlich bei den mit hcTnI R145G ausgetauschten Myofibrillen eine deutlich erhöhte passive Kraft ($F_{\text{pass}} / \text{CSA}$) beobachtet. Dieser Befund wird durch Untersuchungen unterstützt, welche durch Austauschexperimente die hcTnI R145G Mutation in gehäutete Trabekel aus Meerschweinchen (Burton *et al.*, 2002) bzw. Kaninchen (Takahashi - Yanaga *et al.*, 2001) einbrachten. Dort führte die Inkorporation der hcTnI R145G Mutation zu einer signifikant erhöhten passiven Kraftentwicklung in Abwesenheit von Ca^{2+} .

Takahashi-Yanaga *et al.* (2001) finden in Untersuchungen an isolierten, hcTnI R145G ausgetauschten Myofibrillen darüber hinaus, dass in Abwesenheit von Ca^{2+} auch die ATPase-Aktivität signifikant erhöht ist. Dabei wurde deutlich, dass die Mutation zwar die maximale inhibitorische Aktivität des cTnI verändert, die Menge an cTnI, die in Abwesenheit von Ca^{2+} für die Reduktion der ATPase Aktivität um 50% benötigt wird jedoch gleich bleibt. Das deutet darauf hin, dass die R145G Mutation lediglich die intrinsische inhibitorische Funktion der inhibitorischen Region des cTnI beeinträchtigt, die Affinität zu Aktin aber gleich bleibt. Die erhöhte maximale ATPase Aktivität in Abwesenheit von Ca^{2+} könnte auch eine Erklärung für die beobachtete erhöhte passive Kraft $F_{\text{pass}}/\text{CSA}$ sein. Diese Daten sind also eindeutige Hinweise darauf, dass sich die hcTnI Mutation R145G direkt auf die Regulation der Aktomyosin-Interaktion auswirkt.

In den hier durchgeführten Austauschexperimente führt die Inkorporation der hcTnI Mutation R145G in kardiale Myofibrillen der Maus zu einer Verringerung der maximalen Kraftentwicklung ($F_{\text{max}}/\text{CSA}$) um mindestens 45 % (Abb.IV-15). Die oben beschriebenen Studien von Burton *et al.* (2002) und Takahashi-Yanaga *et al.* (2001) konnten in gehäuteten Faserpräparaten dagegen keine Beeinflussung von $F_{\text{max}}/\text{CSA}$ durch die hcTnI R145G Mutation beobachten. Um den Troponinkomplex auszutauschen, wendeten Takahashi-Yanaga *et al.* (2001) eine Methode an, mit Hilfe deren sie zunächst durch Inkubation mit einem Überschuss an cTnT den nativen Komplex aus dem Zellverband herauslösen, um ihn anschließend durch einen rekombinanten cTn Komplex zu ersetzen [Methode siehe Shiraishi *et al.*, 1992]. Die so erreichte Austauschrate liegt nach Angaben der Arbeitsgruppe bei etwa 65%. Das könnte eine Ursache dafür sein, dass die maximale Ca^{2+} -aktivierte Kraftentwicklung in ihrer Studie nicht beeinträchtigt wurde. In dem hier vorgestellten isolierten System kardialer Myofibrillen ist es möglich gewesen, in mit hcTnI R145G durchgeführten Experimenten eine Inkorporation von weit über 70 % des mutierten Proteins zu erreichen. Der stärkere Austauschgrad könnte zum einen in der Isolation der Myofibrillenbündel aus dem hochkomplexen, mehrzelligen Verbund von Myofilamenten und Zytoskelett begründet sein, was sicherlich den Austauschprozess deutlich vereinfacht. Zum anderen ist das hier verwendete Protokoll des Troponin-Austauschs besonders schonend für die Muskelpräparate, da die Myofilamente zu jedem Zeitpunkt der Versuchsdurchführung im Besitz aller drei Tn Untereinheiten sind. Eine konkrete Erklärung für die beobachtete Verringerung der maximalen Ca^{2+} -induzierten Kraftentwicklung steht zu diesem Zeitpunkt jedoch noch aus.

2.2 HcTnI R145G verlangsamt die Kinetik der Ca²⁺-induzierten Kraftentwicklung

Die Analyse der Ca²⁺-aktivierten Kraftentwicklung zeigte, dass kardiale Myofibrillen mit hcTnI R145G bei maximaler Ca²⁺-Aktivierung mit pCa 4,54 nicht nur deutlich weniger Kraft entwickeln, sondern zudem auch noch langsamer mit einer um etwa 40 % verringerten Ratenkonstante der Kraftentwicklung k_{ACT} (Abb.IV-16).

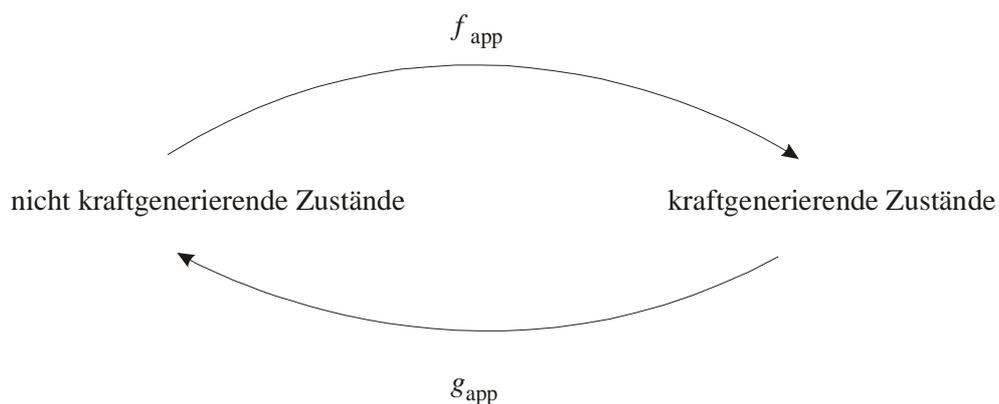
Unter den hier angewendeten experimentellen Bedingungen ist die Ratenkonstante der Ca²⁺-induzierten Kraftentwicklung k_{ACT} identisch mit der Ratenkonstante k_{TR} des Kraftwiederanstiegs bei fortwährender Ca²⁺-Aktivierung, welche die isometrische Ca²⁺-aktivierte Querbrückenkinetik reflektiert [Brenner & Eisenberg, 1986]. Daraus kann gefolgert werden, dass auch k_{ACT} die durch k_{TR} definierte isometrische Umsatzkinetik des Querbrückenzyklus widerspiegelt [Stehle *et al.*, 2002b]. Das bedeutet weiter, dass die Ca²⁺-induzierte Kraftentwicklung normalerweise ausschließlich durch die Querbrückenkinetik, und nicht durch die vorangehende Ca²⁺-induzierte Aktivierung des regulatorischen Systems ratenlimitiert wird. Die hier beobachtete reduzierte Ratenkonstante k_{ACT} in Myofibrillen mit hcTnI R145G kann also keine veränderte „on-off-Kinetik“ des Troponinkomplexes beschreiben, sondern spiegelt einen verlangsamteten Querbrückenzyklus wieder. Unterstützt wird diese Hypothese von Interaktionsstudien an IAANS-markiertem⁶ cTnC in binärem Komplex mit cTnI, die zeigen, dass die cTnI R145G Mutation keinen Einfluss auf die Ca²⁺-Affinität der regulatorischen Bindestelle II des cTnC ausübt [Takahashi-Yanaga *et al.*, 2001]. Da die „on-off-Kinetik“ des Troponinkomplexes durch die Mutation zumindest nicht ratenlimitierend verändert zu sein scheint, kann die Verringerung der Ratenkonstante k_{ACT} nur durch Veränderungen in der inhibitorischen Funktion des hcTnI R145G verursacht werden. Diese Vermutung wird durch weitere Daten von Takahashi-Yanaga *et al.* (2001) unterstützt, wonach die maximale ATPase Aktivität in hcTnI R145G ausgetauschten Myofibrillen ebenfalls signifikant reduziert ist, was seinerseits wiederum auf eine beeinträchtigte inhibitorische Funktion der cTnI Mutante hindeutet.

⁶ IAANS = 2-(4'-(iodoacetamido)anilino)naphtalin-6-sulfonsäure. Dieser Farbstoff wird oft für Interaktionsstudien von TnC-TnI verwendet. Die Interaktion von TnI mit TnC verursacht eine starke Konformationsänderung des TnC-Moleküls, die sich in veränderter Fluoreszenz des Farbstoffs widerspiegelt.

2.3 HcTnI R145G verlangsamt die Kinetik des Kraftabfalls

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die initiale lineare Phase des Kraftabfalls in hcTnI R145G ausgetauschten Myofibrillen der Maus tendenziell etwas länger (t_{LIN}) und mit einer niedrigeren Ratenkonstante (k_{LIN}) verläuft, als in der untersuchten hcTnI WT-Kontrollgruppe. Des weiteren zeigte sich eine starke Beeinträchtigung der sich anschließenden exponentiellen Relaxation. Für die Ratenkonstante k_{REL} wurde in hcTnI R145G ausgetauschten Myofibrillen eine Reduktion von nahezu 50 % beobachtet (Abb.IV-18).

Um die Querbrückenkinetik nach Ca^{2+} -Entfernung zu verstehen, sollte man das von Brenner *et al.* (1988) vorgeschlagene Zwei-Zustands-Modell der Querbrückeninteraktion zugrundelegen, welches die Umwandlung der nicht-kraftgenerierenden Zustände in die kraftgenerierende Zustände (und zurück) durch die Konstanten f_{app} und g_{app} beschreibt (siehe Gleichung).



Dabei ergibt sich für die Kinetik des Kraftwiederanstiegs als Summe der am Querbrückenzyklus beteiligten Konstanten $k_{\text{TR}} = f_{\text{app}} + g_{\text{app}}$ [Brenner *et al.*, 1988]. Wichtig dabei ist, dass nur f_{app} eine Abhängigkeit von der aktivierenden Ca^{2+} -Konzentration zeigt [Brenner *et al.*, 1988]. Nimmt man nun an das 1) f_{app} durch schnelles Abschalten des regulatorischen Systems nach Ca^{2+} -Entfernen sehr schnell reduziert wird und 2) g_{app} sich während der initialen linearen Phase nicht verändert, dann sollte der Kraftabfall generell mit einer Ratenkonstante von g_{app} erfolgen. Da während der initialen linearen Phase die Sarkomere in einem isometrischen Zustand verbleiben kann angenommen werden, dass k_{LIN} die gleiche Querbrückenkinetik widerspiegelt, die auch während isometrischer Kraftentwicklung in beinahe relaxiertem Zustand zu finden ist [Stehle *et al.*, 2002a].

Sollte durch reduzierte inhibitorische Funktion des cTnI eine unvollständige Relaxation vorliegen bedeutet dies, dass auch nach Initiation der Relaxation durch Entfernen der Ca^{2+} -Ionen

noch neue, kraftgenerierende Querbrücken gebildet werden können. Dadurch würde sich der Gesamtumsatz der Querbrücken (erhöhtes f_{app}) erhöhen, was weiter zu einer Reduktion der Ratenkonstante k_{LIN} und einer Verlängerung der isometrischen Phase (t_{LIN}) führt [Tesi *et al.*, 2002].

Die gleiche Argumentationskette könnte auch die in hcTnI R145G ausgetauschten Myofibrillen beobachtete signifikante Reduktion der Ratenkonstante k_{REL} in der sich anschließenden exponentiellen Relaxationsphase erklären. Zum Zeitpunkt t_{LIN} endet die isometrische Phase der Relaxation; das „schwächste“ Sarkomer wird verlängert, was zu einer Kettenreaktion führt, die sich von Sarkomer zu Sarkomer fortsetzt und schließlich den exponentiellen Kraftabfall hervorruft [Stehle *et al.*, 2002a]. Die unvollständige Inhibition der Aktomyosin Interaktion durch das mutierte hcTnI, und die damit verbundene Neubildung kraft-generierender Zustände würde nach dieser Hypothese dem Effekt der Kettenreaktion entgegenarbeiten und so die Ratenkonstante k_{REL} deutlich verlangsamen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die hcTnI Mutation R145G in kardialen Myofibrillen der Maus zu leicht erhöhter passiver Kraftentwicklung in Abwesenheit von Ca^{2+} führt. Gemeinsam mit den beobachteten Effekten auf die Kinetik des Kraftabfalls legen diese Daten die Vermutung nahe, dass die Mutation R145G zu einer unvollständigen Inhibition der Aktomyosinfilamente durch cTnI führt. Eine konkrete Erklärung für die Reduktion der maximalen Kraftentwicklung durch die Mutation kann zu diesem Zeitpunkt nicht gegeben werden.

2.4 Die Mutation hcTnI R145G im transgenen Tiermodell

In FHC-Patienten führt die hcTnI Mutation R145G zu einer leichten Hypertrophie des linken Ventrikels, jedoch ohne ausgesprochen maligne Prognose [Kimura *et al.*, 1997]. Angenommen, die hier im Modell der isolierten Myofibrillen beobachteten Effekte auf k_{ACT} und k_{REL} spiegeln die Vorgänge innerhalb des intakten Herzmuskels wieder, stellt sich nun die Frage, wie der Organismus auf diese prinzipiell gegenteiligen Beeinträchtigungen reagieren könnte. Würden Anpassungsmechanismen des Herzens versuchen, die verringerte Kontraktionsgeschwindigkeit auszugleichen, könnte dies die beobachtete Verlangsamung der Relaxation weiter verstärken.

Richtet sich der Kompensationsmechanismus jedoch auf eine Beschleunigung der Relaxationsfähigkeit, könnte wiederum die Aktivierungskinetik stärker beeinträchtigt werden.

Eine Möglichkeit, solche Adaptationsprozesse gezielt zu untersuchen, ist die Etablierung eines transgenen Mausmodells. Für die hcTnI R145G Mutation wurde von James *et al.* (2000) ein solches Tiermodell etabliert. Da es mit der hier vorgestellten Methode des Troponinaustauschs in isolierten kardialen Myofibrillen nur möglich ist, die primären Effekte der FHC-assoziierten hcTnI Mutationen auf die Kinetik der Kraftentwicklung und Relaxation zu untersuchen, könnte ein direkter Vergleich mit einem transgenen Mausmodell interessante Informationen über mögliche sekundäre Adaptationsprozesse liefern.

Bei funktionellen Untersuchungen an Herzen („*working heart analysis*“) transgener hcTnI R145G Mäuse (TG Linie 121, 40 % cTnI R145G Expression) wurde eine um etwa 19 % beschleunigte Rate des systolischen Druckanstiegs dP/dt (mmHg/ms) festgestellt (James *et al.*, 2000). Unter der Annahme, dass Änderungen in dP/dt im gesamten Herzen in etwa Änderungen der Rate der Kraftentwicklung in isolierten kardialen Myofibrillen entsprechen, ist diese beschleunigte Druckanstiegsrate quasi der gegenteilige Effekt der hier in isolierten Myofibrillen beobachteten Reduktion von k_{ACT} . Beim Vergleich dieser Daten muss klar zwischen dem *in-vitro* System der isolierten und mit mutiertem Protein behandelten Myofibrillen und den Messungen an intakten Herzen des transgenen Mausmodells unterschieden werden. Histologische Analysen der Herzen aus den transgenen R145G Mäusen hatten zwar keine pathologischen Auffälligkeiten in Größe und Anordnung der Myozyten gezeigt, es wäre jedoch denkbar, dass die leicht beschleunigte Rate des Druckanstiegs dP/dt ein Anpassungsmechanismus des gesamten Herzmuskels an die verminderte Kontraktilität einzelner Myofilamente ist, beispielsweise durch ein erhöhtes Verhältnis zwischen (verstärkter) Wanddicke des Ventrikels und (unverändertem) Ventrikelvolumen. Dafür würde die um das 1,5-fache erhöhte mRNA Menge des atrialen natriuretischen Faktors (ANF) sprechen, ein häufig beobachteter Effekt bei Patienten mit starker linksventrikulärer Hypertrophie [James *et al.*, 2000].

Quantifizierende mRNA-Analysen einer weiteren transgenen Mauslinie, welche bis zu 60% des hcTnI R145G exprimierte, sprechen jedoch dafür, dass es sich bei dem Adaptationsprozess der Herzen um eine Veränderung der Ca^{2+} -Homöostase handelt. Diese Mäuse entwickeln bereits wenige Tage nach der Geburt eine schließlich letale Hypertrophie des linken Ventrikels. James *et al.* (2000) fanden dort eine signifikante Reduktion der für die ATP-getriebene Ca^{2+} -Pumpe des sarkoplasmatischen Reticulums (SERCA). Unter basalen Bedingungen interagiert dephosphoryliertes Phospholamban (PLN) mit der SERCA, um dessen Ca^{2+} -Affinität zu

reduzieren, was zu einer verringerten Pumpaktivität bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen führt [Übersicht in MacLennan & Kranias, 2003]. Auf der anderen Seite führt die Phosphorylierung von PLN zur Stimulierung des SERCA vermittelten Ca^{2+} -Transports in das Lumen des SR und erhöht so die Rate der Relaxation. Je mehr Ca^{2+} in den SR-Speicher transportiert wurde, desto mehr Ca^{2+} steht für die Induktion einer nächsten Muskelkontraktion zur Verfügung. Wird jedoch die Menge an exprimierter SERCA reduziert, verringert sich das Verhältnis von der SERCA zu seinem „Regulatorprotein“ PLN, was schließlich zu einer erhöhten Inhibition der SERCA führt. Als zusätzlicher Faktor könnte dabei die Phosphorylierung des PLN eine Rolle spielen: bei insuffizienten Herzen wird oft ein latent erhöhter Phosphorylierungsgrad des PLN beobachtet, wodurch seine inhibitorische Funktion zusätzlich noch verstärkt wird [Cornea *et al.*, 1997]. Als Folge einer erhöhten SERCA-Inhibition verringern sich die im SR gespeicherte Menge an Ca^{2+} -Ionen und somit auch die verfügbare Ca^{2+} -Menge, die bei einer Kontraktion zusätzlich aus dem SR freigesetzt werden kann. Als Adaptationsprozess könnte dies während der Systole zu einer kompensatorisch erhöhten Kontraktilität der Myofilamente führen. Gleichzeitig wird jedoch durch die erhöhte SERCA-Inhibition die basale intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht, was während der Diastole möglicherweise eine unvollständige Erschlaffung und damit unzureichende Füllung des linken Ventrikels bedingt. Es wird vermutet, dass in dem komplizierten Zusammenspiel zwischen PLN und SERCA oft die kausale Ursache für einen plötzlichen Herztod in FHC-Patienten liegt [Fatkin & Graham, 2002]. In dem hier diskutierten Fall der transgenen Maus wäre also denkbar, dass die beobachtete Erhöhung der linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit um 19 % durch eben diese Veränderungen in der Ca^{2+} -Homöostase erklärt werden kann.

Betrachtet man im Modell der isolierten Myofibrillen die verlängerte Dauer der linearen Phase und den verlangsamten exponentiellen Kraftabfall als ein gemeinsames Phänomen, ergibt sich eine signifikant verlängerte gesamte Relaxationsdauer. Diese wird in funktionellen Untersuchungen am intakten Herzen auch als τ [ms], eine Zeitkonstante der Relaxation definiert. In klinischen Studien wird sie neben $-\text{dP}/\text{dt}$ (entsprechend einer Ratenkonstante) oft als druckunabhängiges Maß der diastolischen Funktion verwendet. In einer von James *et al.* (2000) generierten transgenen Mauslinie (etwa 40 % hcTnI R145G) der R145G Mutation wurde neben der Rate des diastolischen Druckabfalls $-\text{dP}/\text{dt}$ auch τ bestimmt. Dieses τ entspricht in etwa der Ratenkonstante des exponentiellen Kraftabfalls k_{REL} in isolierten Myofibrillen. Verglichen mit nicht-transgenen Tieren zeigte sich in den transgenen Tieren eine signifikante Verlängerung der Zeitkonstante τ [James *et al.*, 2000]. Die Inkorporation dieser TnI Mutante scheint also nicht nur

primär auf myofibrillärer Ebene, sondern auch im intakten Herzen zu einer starken Beeinträchtigung der Relaxationskinetik bzw. der diastolischen Funktion zu führen.

Bisherige Studien an *in vitro* und *in vivo* Modellen der familiären hypertrophen Kardiomyopathie (FHC) haben ihre Schwerpunkte meistens auf die Untersuchung veränderter Ca^{2+} -Homöostase und die damit verbundene beeinträchtigte Kontraktilität unter *steady-state* Bedingungen gelegt. Die hier vorgestellten Daten weisen darauf hin, dass neben signifikant veränderten Eigenschaften der Kraftentwicklung auch die Beeinträchtigung des Relaxationsverhaltens eine maßgebliche Rolle bei der Ausprägung des klinischen Bildes einer FHC spielen kann. Die hier angewendete Methode der Kraftmessung an isolierten Myofibrillenbündeln bietet für diese Untersuchungen ein vielversprechendes Modell.

3 Der hcTnI G203S Austausch in kardialen Myofibrillen der Maus

3.1 HcTnI G203S führt zu keiner signifikanten Veränderung in der Kinetik der Kraftentwicklung und Relaxation

Untersuchungen an hcTnI G203S ausgetauschten kardialen Myofibrillen der Maus zeigen bei eingehender Analyse der passiven Kraft in Abhängigkeit von der Sarkomerlänge eine leichte Erhöhung der entwickelten passiven Kräfte $F_{\text{pass}}/\text{CSA}$ (Abb.IV-19). Wie bereits bei den mit hcTnI R145G behandelten Myofibrillen beobachtet, ist auch hier die maximale Ca^{2+} -induzierte Kraftentwicklung $F_{\text{max}}/\text{CSA}$ deutlich verringert. Eine statistische Signifikanz ergibt sich jedoch weder für diese Abweichungen noch für die erhaltenen Daten der Ca^{2+} -Abhängigkeit der Kraftentwicklung und deren Ratenkonstante k_{ACT} . Die hier beobachteten Abweichungen in der passiven Kraftentwicklung deuten, wie bereits bei der R145G Mutante diskutiert, auf eine unvollständige Inhibition der Aktomyosin-Interaktion hin. In mit hcTnI R145G ausgetauschten Myofibrillen hatte dies eine starke Beeinträchtigung des Kraftabfalls zur Folge. Die Analyse des biphasischen Kraftabfalls konnte jedoch keine Abweichungen zeigen, die durch die hcTnI G203S Mutante verursacht sein könnten. Weder die Dauer der linearen Phase t_{LIN} , deren Ratenkonstante k_{LIN} , noch die Ratenkonstante des exponentiellen Kraftabfalls k_{REL} waren in den untersuchten Myofibrillen maßgeblich verändert (Abb.IV-22).

Die hcTnI G203S Mutation ist ein Punktmutation, bei der eine hydrophobe Glycinseitenkette gegen eine aliphatische Hydroxylgruppe in der Serinseitenkette ausgetauscht wird [Kimura *et al.*,

1997]. Bislang gibt es keine Studien über mögliche Effekte dieser Punktmutation auf die Struktur des cTnI selbst oder auf Störungen in der Interaktion innerhalb des Troponinkomplexes oder mit Aktin. Die Punktmutation liegt an Position 203 und somit am C-terminalen Ende des cTnI Moleküls. Welche physiologische Aufgabe diesem C-Terminus zukommt, ist noch nicht vollständig geklärt. Rekombinantes hcTnI auf dem die 12 Aminosäuren dieses C-terminalen Bereiches deletiert worden waren, zeigte zumindest keine veränderte Ca^{2+} -Abhängigkeit der myofibrillären ATPase gegenüber dem hcTnI-Wildtyp [Rarick *et al.*, 1997]. Inzwischen sind zwei weitere Mutationen in dieser Region bekannt, welche mit FHC assoziiert sind; K206Q und R204K [Kimura *et al.*, 1997; <http://www.cardiogenomics.org>].

Die Mutanten hcTnI G203S und K206Q wurden im Rahmen einer Studie von Takahashi-Yanaga *et al.* (2001) bereits untersucht. Weder in TnI-TnC-Bindungsstudien noch in Kraftmessungen an mit hcTnI G203S bzw. K206Q ausgetauschten, mehrzelligen Faserpräparaten kann eine Beeinflussung der inhibitorischen Aktivität des cTnI und der Interaktion mit cTnC beobachtet werden. HcTnI G203S zeigt jedoch eine schwache Tendenz die Ca^{2+} -Sensitivität der ATPase-Aktivität in ausgetauschten Myofibrillen sowie die Ca^{2+} -Sensitivität der Kraftentwicklung in ausgetauschten Faserpräparaten zu erhöhen. Weiterhin stellt die Arbeitsgruppe eine signifikante Erhöhung der passiven Kraftentwicklung fest.

Die Punktmutation hcTnI G203S wurde auch in Trabekeln von Meerschweinchen untersucht, aus denen endogenes Troponin zunächst durch Vanadat extrahiert [Methode siehe Strauss *et al.*, 1992], und anschließend durch rekombinante Untereinheiten ersetzt wurde [Burton *et al.*, 2002]. Kraftmessungen an derart behandelten Faserpräparaten demonstrieren eine erniedrigte Ca^{2+} -Sensitivität der Kraftentwicklung, was unseren Beobachtungen widerspricht, dass die hcTnI G203S Mutante keinen maßgeblichen Effekt auf die Ca^{2+} -Sensitivität der Kraftentwicklung und deren Ratenkonstante k_{ACT} hat. Übereinstimmend mit unseren Untersuchungen ist dagegen die von Burton *et al.* (2002) beobachtete Tendenz der mit G203S ausgetauschten Muskelpräparate, eine reduzierte Ca^{2+} -aktivierte Kraftentwicklung zu zeigen. Burton *et al.* (2002) finden in ihren Untersuchungen der G203S Mutante eine teilweise bis zu 40% verringerte Ca^{2+} -induzierte Maximalkraft.

Es wird deutlich, dass die mit der Mutante hcTnI G203S erhaltenen Daten in den hier vorgestellten Studien teilweise recht widersprüchlich sind. Findet die eine Arbeitsgruppe eine leicht erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität der Kraftentwicklung [Takahashi-Yanaga *et al.*, 2001] erscheint sie im Versuchssystem einer anderen Arbeitsgruppe signifikant verringert [Burton *et al.*, 2002].

Die für Ca^{2+} -induzierte Kraftentwicklung beobachteten Befunde sind teilweise widersprüchlich, weshalb der Einfluss der Mutation zu diesem Zeitpunkt noch unklar bleibt. Alle hier vorgestellten Studien untersuchen die primären Effekte der Punktmutation G203S auf die Funktionalität der Muskelkontraktion. Eine *in vivo* Studie an transgenen Mäusen mit der hcTnI R145G Mutation gibt es für die Mutation G203S bislang jedoch nicht.

Patienten, bei denen eine G203S Mutation auf cTnI gefunden wurde, zeigten eine kardiale Hypertrophie, die lediglich am Apex deutlich ausgeprägt war. Es wurde spekuliert, dass sich die sogenannte AHCM (AHCM = apikale hypertrophe Kardiomyopathie), auch bekannt als *japanese-type* FHC, sowohl genetisch als auch klinisch stark von der FHC unterscheidet [Kimura *et al.*, 1997]. So ist das familiäre Auftreten äußerst selten und die klinische Prognose ist bei den AHCM Patienten meistens besser als bei FHC Patienten [Maron *et al.*, 1987]. Die Häufigkeit, mit der bei AHCM Patienten sowohl im cTnI als auch im kardialen Myosinbindeprotein C Gen (cMBP-C) Mutationen gefunden wurden, führten letztlich dann doch zu einer Einordnung in die Gruppe der FHC. Leider liegen für diese Patientengruppe keine weiteren klinischen oder strukturbiochemischen Studien vor, so dass über die Ursachen für die Entstehung einer apikalen Hypertrophie nur spekuliert werden kann. Da eine Beeinträchtigung der Interaktion innerhalb des Tn-Komplexes durch die von Takahashi-Yanaga *et al.* (2001) durchgeführten Bindungsstudien weitgehend ausgeschlossen wurde, muss der Defekt entweder auf der Ebene der Myofilamente selber, oder aber in einer Adaptation der Ca^{2+} -Homöostase liegen. Auch eine möglicherweise erhöhte interstitielle Fibrose könnte, wie bereits für die Mutation hcTnI R145G an der Ausprägung des klinischen Bildes der apikalen Hypertrophie beteiligt sein.

Die bisher erhaltenen Daten deuten demnach darauf hin, dass die durch hcTnI G203S hervorgerufenen primären Beeinträchtigungen der sarkomerischen Funktion nur äußerst gering, und mit den bisher angewendeten Methoden nicht eindeutig analysierbar sind. Da diese Punktmutation jedoch zu einem sehr spezifischen Phänotyp in betroffenen Patienten führt, sollten weiterführende Untersuchungen versuchen, die sekundären Effekte der Mutante zu analysieren. Es ist bekannt, dass Patienten mit einer ventrikulären Hypertrophie häufig an einer Azidose, also einer pH-Verringerung im Blut leiden, ausgelöst durch kardiale Insuffizienz. Es wäre also prinzipiell denkbar, dass sich im Untersuchungsmodell der (mehrzelligen) Faserpräparate bzw. der isolierten Myofibrillen erst bei veränderten pH-Bedingungen ein Effekt auf die Ca^{2+} -induzierte Kraftentwicklung und Relaxation feststellen lässt. Eine transgenen Mauslinie, welche die Mutante G203S exprimiert, würde darüber hinaus die Möglichkeit bieten, sekundäre Adaptationsprozesse während der Entwicklung der apikalen Hypertrophie zu analysieren. Daraus

könnten wertvolle Erkenntnisse beispielsweise über Entwicklung der Hypertrophie und Einfluss der G203S Mutation auf die Ca^{2+} -Homöostase gewonnen werden.

4 Aktivierungs- und Relaxationskinetik terminaler ICM und DCM

4.1 Die myofibrilläre Aktivierungs- und Relaxationskinetik humaner Spenderherzen lässt sich mit der hier vorgestellten Methode charakterisieren

Die aus humanem Spendermaterial isolierten Myofibrillen stellen auf Grund ihrer unterschiedlichen Vorbehandlung und der oft unbekanntem Ätiologie ein höchst variables Untersuchungsobjekt dar. Darüber hinaus sind Kardiomyopathien Krankheitsbilder, die durch ihre klinischen Auswirkungen auf das gesamte Herz und nicht auf zelluläre Funktionen definiert werden. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit stellte sich somit die Frage, inwiefern kinetische Untersuchungen am reduzierten Modell der Myofibrillen hier überhaupt zu aussagekräftigen Ergebnissen führen können. Die hier vorgestellten Daten machen jedoch deutlich, dass sich sowohl aus nicht-pathologischen als auch aus pathologischen Spenderherzen funktionelle Myofibrillen isolieren lassen, deren Kinetik der Kraftentwicklung und Relaxation gut analysierbar ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich die Aktivierungs- und Relaxationskinetik der Myofibrillen aus insuffizienten Herzen deutlich von denen aus nicht-pathologischen Spenderherzen unterscheiden. Auch zwischen Myofibrillen aus ICM- und DCM- Herzen konnten in mehreren kinetischen Parametern deutliche Unterschiede festgestellt werden. Obwohl die vorliegende Studie durch die limitierte Anzahl untersuchter Spenderherzen zum jetzigen Zeitpunkt lediglich Modellcharakter besitzt, soll in den folgenden Abschnitten etwas genauer auf die beobachteten Abweichungen in der Kinetik von pathologischen und nicht-pathologischen Spenderherzen eingegangen werden.

4.2 Myofibrillen aus insuffizienten Herzen zeigen keine signifikante Beeinträchtigung von F_{\max}/CSA und F_{pass}/CSA

Die Analyse der passiven Kraftentwicklung F_{pass}/CSA in humanen Myofibrillen lässt erkennen, dass lediglich in Myofibrillen aus ICM Herzen eine tendenzielle Erhöhung der entwickelten passiven Kräfte feststellbar ist. Da die Einzelmessungen teilweise stark streuen, ergibt sich für diese Abweichung allerdings keine statistische Signifikanz (Abb.IV-23). Brixius *et al.* (2002) fanden an gehäuteten Faserpräparaten aus insuffizienten Herzen ebenfalls eine erhöhte Kraftentwicklung in Abwesenheit von Ca^{2+} . Wie bereits unter V-2.1 diskutiert, könnte diese erhöhte passive Kraftentwicklung ein Hinweis auf aktivierte Querbrücken in Abwesenheit von

Ca^{2+} sein. Ein möglicher Grund dafür könnte wiederum eine unvollständige Regulation der Aktomyosin-Interaktion durch den Troponinkomplex sein.

Keine auffälligen Abweichungen wurden für die maximale Ca^{2+} -induzierte Kraftentwicklung F_{\max} / CSA beobachtet; nach Aktivierung mit $\text{pCa } 4,54$ entwickeln alle untersuchten insuffizienten und nicht-pathologischen Spenderherzen eine Kraft von etwa 65 bis 80 $\text{nN}/\mu\text{m}^2$. Eine ähnliche Beobachtung wurde von Van der Velden *et al.* (2003) an isolierten Myozyten aus Spenderherzen und insuffizienten Herzen gemacht. Die Arbeitsgruppe untersuchte die kontraktilen Eigenschaften gehäuteter Herzmuskelzellen und fand auch hier keine Veränderungen in der maximalen Kraftentwicklung [Van der Velden *et al.*, 2003]. Das lässt den Schluss zu, dass die in terminal insuffizienten Herzen beobachtete ventrikuläre Dysfunktion nicht primär durch eine verringerte Kraftentwicklung der Myofilamente verursacht wird.

4.3 Myofibrillen aus insuffizienten Herzen haben eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität der Kraftentwicklung und deren Ratenkonstante k_{ACT}

In der hier vorgelegten Arbeit wurden bei Myofibrillen aus ICM und DCM Herzen Veränderungen in der Ca^{2+} -Sensitivität der Kraftentwicklung gefunden. Bei partieller Aktivierung mit $\text{pCa } 5,99$ und $5,64$ ist die entwickelte Kraft in den insuffizienten Herzen signifikant erhöht (Abb.IV-26). Diese Ca^{2+} -Sensitivierung konnte auch für die Ratenkonstante der Ca^{2+} -induzierten Kraftentwicklung k_{ACT} beobachtet werden, partielle Aktivierung führte in den insuffizienten Herzen zu teilweise signifikant erhöhten Werten.

Mehrere Studien haben sich bereits mit der Ca^{2+} -Sensitivität der Kraftentwicklung in humanem Patientenmaterial beschäftigt. Für ventrikuläres Myokard wurde eine deutlich erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität der Kraftentwicklung an Triton-X-gehäuteten Faserpräparaten [z.B. Brixius *et al.*, 2002] und isolierten kardialen Myozyten [Van der Velden *et al.*, 2001] aus terminal insuffizienten DCM und ICM Herzen beobachtet. Um mögliche Ursachen für die erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität insuffizienter Herzen zu finden, wurde in weiterführenden Studien die Expression und Phosphorylierung von Proteinen des Sarkomers eingehender untersucht. Beispielsweise wird cTnI als Antwort auf β_1 -adrenerge Stimulation durch die PKA an den beiden Serinresten S22 und S23 phosphoryliert [Mittmann *et al.*, 1990]. Die Phosphorylierung dieser beiden Serine führt zu einer Reduktion der apparenten Ca^{2+} -Affinität des cTnC [Robertson *et al.*, 1982] und zu einer reduzierten Ca^{2+} -Sensitivität der Kraftentwicklung [Zhang *et al.*, 1995]. Zuvor hatten Studien

bereits gezeigt, dass die Phosphorylierung von TnI eine Verringerung der myofibrillären Ca^{2+} -Sensitivität und einen beschleunigten Querbrückenzyklus verursacht [Kranias & Solaro, 1982; Wattanapernpool *et al.*, 1995], Phosphorylierung der MLC-2 dagegen zu einer Ca^{2+} -Sensitivierung der Kraftentwicklung führt [Morano I., 1992]. In Muskelpräparaten aus insuffizienten Herzen konnten sowohl Änderungen in der Phosphorylierung von TnI als auch im Phosphorylierungszustand der MLC-2 [Wolff *et al.*, 1996, Van der Velden *et al.*, 2001], sowie erneute Expression der atrialen Myosin leichten Kette 1 (LC1) [Morano *et al.*, 1997] und der fetalen Isoform des TnT [Van der Velden *et al.*, 1999] mit einer erhöhten Ca^{2+} -Sensitivität der Kraftentwicklung in Verbindung gebracht werden. Van der Velden *et al.* (2001) fanden kürzlich, dass sich in terminal insuffizienten Herzen die Phosphorylierung der MLC-2 und des cTnI invers zu der erhöhten Ca^{2+} -Sensitivität verhält; je größer die Ca^{2+} -Sensitivität der Kraftentwicklung in einer untersuchten Herzmuskelprobe, desto geringer die Menge an phosphorylierter MLC-2 und cTnI. In diesem Zusammenhang könnten cTnI- und MLC-2-Dephosphorylierung einen potentiellen kompensatorischen Mechanismus als Antwort auf erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität und gestörte Ca^{2+} -Homöostase in insuffizienten Herzen darstellen. Die Frage, inwiefern der regulatorische Troponinkomplex oder aber Myosin selbst an der veränderten Ca^{2+} -Sensitivität der Kraftentwicklung beteiligt ist, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden.

Prinzipiell wäre denkbar, dass veränderte Phosphorylierung der MLC-2 und des cTnI auch die Kinetik der Kraftentwicklung und Relaxation beeinflussen, konkrete Daten liegen darüber jedoch noch nicht vor.

Ein weiteres Protein, das an veränderter Ca^{2+} -Sensitivität der Kraftentwicklung beteiligt sein könnte ist das Titin. Es ist das bisher größte bekannte Protein (3000-3700 kDa), für das in den letzten Jahren mehrere essentielle Funktionen innerhalb des Muskels festgestellt werden konnten. So dirigiert es die Assemblierung der kontraktilen Elemente und sorgt für die Elastizität der Myofilamente [Gregorio *et al.*, 1999]. Weiterhin gibt es Hinweise, die auf eine Beteiligung Titins in der Signalkaskaden der Muskelzelle hinweisen⁷. Es wird diskutiert, dass Titin durch seine Auswirkungen auf die Elastizität der Myofilamente auch für die Abhängigkeit der Ca^{2+} -Sensitivität der Kraftentwicklung von der Sarkomerlänge verantwortlich ist. Ist das der Fall, könnten *Missense*-Mutationen des Titins auch den Frank-Starling-Mechanismus maßgeblich beeinträchtigen. Dieser beschreibt die Abhängigkeit der Kontraktilität von dem Vordehnungszustand des Muskels. Auf einige Mutationen des Titins, denen man eine direkte

⁷ Titin besitzt neben einer Kinasedomäne an seinem C-Terminus mehrere Phosphorylierungsstellen und ein Calpain-3-protease-Bindemotiv. [Trinick & Tskhovrebova, 1999; Centner *et al.*, 2001].

Beteiligung an der Ausprägung von ICM bzw. DCM nachweisen konnte, wird in den nächsten Abschnitten kurz eingegangen.

Die Vielfalt der hier diskutierten Veränderungen auf der Ebene des Sarkomers macht wahrscheinlich, dass die erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität der Kraftentwicklung das Resultat eines Zusammenspiels modifizierter kontraktiler und regulatorischer Proteine des Sarkomers in terminal insuffizienten Herzen ist. Um dies für die hier auf myofibrillärer Ebene untersuchten humanen Herzproben weiter zu untersuchen wäre es sinnvoll, beispielsweise auch die Phosphorylierungsstadien von cTnI und der MLC-2 zu analysieren.

4.4 Nur Myofibrillen aus ICM-Herzen zeigen eine stark beschleunigte Ratenkonstante k_{ACT} bei maximaler Ca^{2+} -Aktivierung

In den hier vorgestellten Daten wurde gezeigt, dass die Ratenkonstante k_{ACT} der exponentiellen Kraftentwicklung in Myofibrillenbündeln aus ICM-Herzen im Vergleich zu solchen aus nicht-pathologischen Spenderherzen um etwa 40 % erhöht ist. In DCM-Herzen sind dagegen keine Anzeichen auf eine beschleunigte myofibrilläre Kontraktion gefunden worden. ICM-Herzen zeigen parallel zur erhöhten Ratenkonstante k_{ACT} eine deutliche (wenn auch nicht signifikante) Erhöhung der passiven Kraft $F_{\text{pass}}/\text{CSA}$, die auf eine unvollständige Inhibition der Aktomyosin-Interaktion in Abwesenheit von Ca^{2+} hinweisen könnte. In Anbetracht des in V-2.2 diskutierten Querbrückenmodells [Brenner & Eisenberg, 1986] wäre dann jedoch eher eine Reduktion der Ratenkonstante k_{ACT} zu erwarten. Da es sich bei den hier untersuchten Präparaten um isolierte Myofibrillen aus einem intakten Organ handelt, ist es jedoch durchaus möglich, dass die erhöhte Ratenkonstante der Kraftentwicklung k_{ACT} Teil eines komplexen Adaptationsprozesses ist.

Während des sogenannten „remodelling“-Prozesses bei einer ischämischen Kardiomyopathie kommt es zu vielfältigen Kompensations- und Adaptationsreaktionen der Herzmuskulatur, die auch Veränderungen in sarkomerischen und Sarkomer-assoziierten Proteinen nach sich ziehen können [Weber *et al.*, 1993]. So wurde beispielsweise gefunden, dass Titin in zwei unterschiedlichen Isoformen vorkommen kann; als N2B, die etwas steifere, und N2BA, die längere und elastischere der beiden Isoformen [Freiburg *et al.*, 2000]. Neagoe *et al.* (2002) zeigen, dass in Abhängigkeit vom Stadium der Erkrankung, ischämische Herzen eine deutlich verstärkte Expressionsrate der N2BA Isoform aufweisen, wogegen die der N2B Isoform deutlich reduziert ist. Parallel zu diesem Isoformwechsel wurde eine verstärkte Einlagerung von Kollagen

und Desmin in das Muskelgewebe des linken Ventrikels beobachtet. Untersuchungen zur passiven Kraft isolierter Myofibrillen im Verhältnis zu ihrer Sarkomerlänge stellten heraus, dass die Herzen mit erhöhter ventrikulärer Wandsteifigkeit eine stark vergrößerte Elastizität der Myofibrillen haben [Neagoe *et al.*, 2002]. Prinzipiell wäre also denkbar, dass Titin durch Veränderungen in der myofibrillären Elastizität ischämischer Herzen auch die aktiven kontraktilen Eigenschaften verändern könnte. In den späteren Stadien einer Herzinsuffizienz wird eine vermehrte Degradation sarkomerischer Proteine und des Titins beobachtet, zur Kompensation dieses Verlustes kommt es dann zu weiterer Akkumulation von Mikrotubuli und Desmin in den Regionen der Z-Scheiben [Übersicht geben Hein *et al.* 2000 und Weber K.T., 1997]. Ob es sich jedoch bei den eben beschriebenen Prozessen um primäre Effekte oder aber um Adaptationsprozesse handelt, ist noch nicht abschließend geklärt.

Die Vielfalt der bei ICM beobachteten sekundären Adaptationsprozesse lassen vermuten, dass es sich auch bei der erhöhten Kontraktilität der hier untersuchten ICM-Proben um einen Kompensationseffekt handelt, beispielsweise mit dem Ziel eine durch Kollageneinlagerung hervorgerufene erhöhte Wandsteifigkeit ausgleichen könnte.

4.5 Nur Myofibrillen aus DCM-Herzen zeigen eine veränderte lineare Phase des Kraftabfalls

Bei den Untersuchungen an Myofibrillen aus insuffizienten Herzen hatte sich gezeigt, dass bei Proben aus DCM-Herzen die lineare Phase des Kraftabfalls deutlich länger und steiler, d.h. t_{LIN} länger und k_{LIN} größer ist als bei ICM- und Spenderherzen (Abb.IV-28). Dagegen bleibt der exponentielle Kraftabfall von Myofibrillen aus DCM-Herzen scheinbar unverändert.

Die lineare Phase der Relaxation schließt sich direkt an das Abschalten der regulatorischen Proteine durch Entfernen der Ca^{2+} -Ionen aus der Lösung an. Durch Inkorporation des humanen Troponinkomplexes in murine Myofibrillen konnte hier gezeigt werden, dass Dauer und Verlauf dieser Phase nicht durch die „on-off-Kinetik“ der regulatorischen Proteine ratenlimitiert wird (s.Abschnitt IV-3). Vielmehr befinden sich die Sarkomere für die gesamte Dauer dieser Phase in einem isometrischen und bereits sehr früh in einem inaktivierten Zustand. Stehle *et al.* (2002a) konnten zeigen, dass erst zum Zeitpunkt t_{LIN} die Sarkomere in einer Art Kettenreaktion nacheinander gedehnt werden, was letztlich zur vollständigen Relaxation der Muskelfilamente führt. Eine verlängerte lineare Phase würde dieser Hypothese nach also bedeuten, dass die

Fähigkeit der Querbrücken von kraftgenerierenden in nicht-kraftgenerierende Zustände überzugehen deutlich beeinträchtigt ist. Ein Grund dafür könnte wieder eine unvollständige Inhibition der Aktomyosin-Interaktion durch den Troponinkomplex sein. Dagegen spricht jedoch, dass für Proben aus DCM-Herzen keine erhöhte passive Kraft $F_{\text{pass}}/\text{CSA}$ gefunden werden konnte, was ein weiterer Anhaltspunkt für anhaltende Querbrückenbildung in Abwesenheit von Ca^{2+} gewesen wäre. Ungeklärt bleibt auch die gleichzeitig mit der Verlängerung von t_{LIN} beobachtete Erhöhung der Ratenkonstante k_{LIN} .

Eine nahe liegende Begründung für die Veränderungen in der Aktomyosin-Interaktion wäre eine Fehlfunktion des Myosins selbst. In Muskelbiopsien von Herzen im Endstadium einer DCM wurden deutlich geringere Mengen der RLC-2 gefunden als in der Kontrollgruppe nicht-pathologischer Herzen. Gleichzeitig wurde in den untersuchten Herzen die Expression einer Protease detektiert, welche für die spezifische Degradation der RLC-2 verantwortlich gemacht werden konnte [Margossian *et al.*, 1992]. Welche Auswirkungen diese Degradation der regulatorischen Myosin leichten Kette auf die Kinetik der Kraftentwicklung und Relaxation haben könnte, ist bislang noch nicht weiter untersucht worden.

Bei Familien, in denen DCM bereits in jungen Jahren (< 25 Jahren) auftritt, wurden in genetischen Studien auch Mutationen der β -MHC identifiziert [Kamisago *et al.*, 2000]. Eine der Mutationen (Ser532Pro) liegt in einer konservativen α -helikalen Struktur einer kleineren Domäne und wird für eine Unterbrechung der Aktin-Myosin-Bindung verantwortlich gemacht. Die andere Mutation liegt in der Region zwischen dem Myosinkopf und der Halsregion. Kamisago *et al.* (2000) vermuten, dass diese Mutation den Betrag und die Polarität der Querbrückenbewegung beeinflusst, und somit auch die Effizienz der Kontraktion beeinträchtigen kann.

Dass bei der beobachteten kardialen Dysfunktion mancher dilatativen Kardiomyopathien auch das Zytoskelett eine große Rolle spielen kann, zeigen wiederum Studien an Titin. Gerull *et al.* (2002) belegten, dass Mutationen in dem Titin-kodierenden Gen (TTN) zu autosomal dominant vererbter DCM führen können. Dabei wurde sowohl eine Punktmutation (Trp930Arg) als auch eine Deletionsmutation isoliert, bei der ein größerer C-terminaler Abschnitt fehlt. Wie genau diese Mutationen zum klinischen Bild einer DCM führen können ist noch ungeklärt. Da Titin für die passive myofibrilläre Elastizität verantwortlich ist, könnte es möglicherweise auch die aktiven, mechanischen Eigenschaften des Myokards beeinflussen, und somit die myofibrilläre Kinetik der Kraftentwicklung und der Relaxation verändern.

In jüngster Zeit gewinnen neben Desmin und Titin immer mehr Z-Scheiben-assoziierte Proteine an Bedeutung in Zusammenhang mit dilatativen Kardiomyopathien. Die Z-Scheiben sind nicht nur eine Schnittstelle zwischen Sarkomer, Zytoskelett und Signaltransduktion, sondern vermitteln darüber hinaus auch Dehnungsreize von einem Sarkomer zum nächsten. Es wäre also denkbar, dass Veränderungen in den Proteinen der Z-Scheiben auch für eine veränderte Sarkomerdynamik während des linearen Kraftabfalls verantwortlich sein könnten [Übersicht in Faulkner *et al.*, 2001]

Die Frage ob eine der hier beschriebenen Mutationen an der veränderten Kinetik des initialen Kraftabfalls beteiligt ist, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden. Inwiefern die starken morphologischen Veränderungen auf zellulärer bzw. zytoskelettaler Ebene, welche letztlich zur Dilatation des linken Ventrikels führen, auch einen direkten oder indirekten Effekt auf die Interaktion von Aktin und Myosin haben, bleibt ebenso unklar.

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten aus DCM-Herzen entstammen Patienten, bei denen der Auslöser der Erkrankung nicht bekannt ist (idiopathische DCM). Das bedeutet weiter, dass die Ursache nicht in allen untersuchten Proben die gleiche sein muss, weshalb die hier diskutierten Beeinträchtigungen der initialen Relaxationsphase lediglich als ein den DCM-Herzen gemeinsames Phänomen betrachtet werden können. Erst weiterführende Studien, die sowohl den genetischen Hintergrund der untersuchten Probe, histologische Veränderungen in der Gewebsstruktur als auch die Kinetik der Kraftentwicklung und Relaxation untersuchen, werden möglicherweise Aufschluss über die Zusammenhänge zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp des Krankheitsbildes einer DCM liefern.

4.6 Die exponentielle Phase der Relaxation ist nur in ICM Herzen deutlich verlangsamt

Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben aus ICM-Herzen konnten keine Veränderungen in der linearen Phase der Relaxation nachgewiesen werden, dagegen wurde eine signifikante Verringerung der Ratenkonstante des exponentiellen Kraftabfalls k_{REL} beobachtet (Abb. V-29). Zuvor hatte sich herausgestellt, dass die passive Kraft in Abwesenheit von Ca^{2+} in Proben aus ICM-Herzen leicht erhöht ist. Das deutet darauf hin, dass die Interaktionen von Aktin und Myosin möglicherweise keiner geordneten Regulation mehr unterliegen, so dass sich auch in

Abwesenheit von Ca^{2+} neue Querbrücken ausbilden können, welche letztlich nicht nur die passive Kraft erhöhen, sondern auch der exponentiellen Phase der Relaxation entgegen wirken könnten. Worin die Ursache für die beeinträchtigte exponentielle Relaxation im Einzelnen liegt, kann durch die hier vorgestellten Daten leider nicht erklärt werden.

Wie bereits unter V-4.5 erwähnt, ist eine Auffälligkeit in insuffizienten Herzen die erhöhte Expression des zytoskelettalen Proteins Desmin. Es wurde beobachtet, dass Desmin in terminal insuffizienten Herzen vermehrt in die Z-Scheibe der Myofilamente eingebaut ist. Dies geht einher mit einer signifikanten Reduktion der kontraktilen Filamente [Hatt *et al.*, 1970; Schaper *et al.*, 1993]. Da Desmin an der zellulären Verankerung der Myofilamente beteiligt ist, könnte es durchaus einen Einfluss auf das Kontraktions- und Relaxationsverhalten mehrzelliger Präparate haben. Welchen konkreten Einfluss die erhöhte Desmineinlagerung in die Z-Scheiben auf die kontraktilen Eigenschaften der aus dem Zellverbund isolierten Myofilamente haben könnte, ist noch nicht bekannt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine eindeutige Erklärung für die in insuffizienten Herzen beobachteten Veränderungen in der Kinetik von Kraftentwicklung und Kraftabfall zu diesem Zeitpunkt nicht gegeben werden kann. Die hier diskutierten Daten auch anderer Arbeitsgruppen lassen vermuten, dass insuffiziente Herzen, abgesehen von genetischen Ursachen, zusätzlich einer Vielfalt von Kompensations- und Anpassungseffekten unterliegen. Eine umfassende Analyse von Herzproben sollte daher nicht nur die Abweichungen im Kontraktions- und Relaxationsverhalten untersuchen, sondern darüber hinaus die Analyse der komplexen Umstrukturierungen im zunächst hypertrophierenden und später insuffizienten Myokards mit einbeziehen.

4.7 Viele Wege führen zu einem insuffizienten Herzen

Bisher hat man sich bei der Analyse von Kardiomyopathien hauptsächlich auf die Veränderungen in der Ca^{2+} -Homöostase konzentriert. An isolierten Muskelzellen aus ICM Herzen konnte bereits vor einigen Jahren gezeigt werden, dass die Ca^{2+} -Homöostase während der Diastole stark modifiziert ist. So wurde beobachtet, dass der Abfall der intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ während der Diastole in myopathischen Zellen signifikant verlangsamt ist, verglichen mit Kontrollzellen. Dies war das Resultat sowohl eines verlängerten Aktionspotentials als auch einer

verminderten Ca^{2+} -Aufnahme durch das sarkoplasmatische Retikulum [z.B. Beuckelmann *et al.*, 1992]. Später wurde gezeigt, dass sowohl in DCM als auch in ICM Herzen die Aktivität der SR Ca^{2+} -ATPase, welche für die Aufnahme der Ca^{2+} -Ionen in das SR mitverantwortlich ist, deutlich reduziert zu sein scheint [Flesch *et al.*, 1996]. Zuvor hatte man bereits eine Verringerung der β -Adrenozeptordichte [Bristow *et al.*, 1982] und eine Verringerung der cAMP-Synthese festgestellt [Danielsen *et al.*, 1989], was wiederum zu einer verringerten Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase PKA führt. Als Substrat der PKA konnte dann auch eine veränderte Phospholamban-Phosphorylierung mit dem Auftreten von Herzinsuffizienzen in Verbindung gebracht werden [Colyer *et al.*, 1991; Lindemann *et al.*, 1983]

In den vergangenen Jahren mehrten sich dann die Hinweise auf eine zytoskelettale Beteiligung in Abhängigkeit vom Stadium der Insuffizienz. Die Synthese vieler zytoskelettaler Proteine, z.B. des Titins, wird zu Beginn einer Hypertrophie-Ausbildung zunächst verstärkt [Collins *et al.*, 1996]. In bereits insuffizienten Herzen findet man dann genau das Gegenteil, nämlich eine Degradation oder eingeschränkte Synthese dieser Proteine [Wang *et al.*, 1999]. Es wird vermutet, dass der abnormale mechanische Stress, der auf die Myozyten während einer Herzinsuffizienz lastet, im Gegenzug eine Überexpression der Gerüstproteine nach sich zieht [Hein *et al.*, 2000]. Auch eine Beteiligung der membranassoziierten Proteine wie Dystrophin [Ortiz-Lopez *et al.*, 1997] und MLP (muscle lim protein) an der Ausprägung terminaler Herzinsuffizienzen konnte mittlerweile bestätigt werden [Arber *et al.*, 1987; Geier *et al.*, 2003].

Nach der momentanen Auffassung wird die Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie als eine hauptsächlich adaptive Antwort auf den biomechanischen Stress des Herzens erklärt. Eine linksventrikuläre Hypertrophie kann zwar auch „physiologisch“ entstehen, beispielsweise bei Topathleten, doch geht hier die Verstärkung der Ventrikelwand mit gleichzeitig vergrößertem Schlagvolumen einher. Das Verhältnis zwischen Ventrikeldurchmesser und Ventrikelvolumen bleibt also gleich. Anders jedoch bei den Fällen, bei denen eine linksventrikuläre Hypertrophie als Spätfolge von Bluthochdruck, durch einen Myokardinfarkt, oder aufgrund einer familiären Kardiomyopathie entsteht. Offen ist die Frage nach dem Stimulus der Hypertrophieausbildung. In Frage kommen prinzipiell alle hier diskutierten Proteine. Es wäre beispielsweise möglich, dass die $[\text{Ca}^{2+}]$ in einem anderen intrazellulären Kompartiment als dem SR, oder aber sogar die gesamte zelluläre $[\text{Ca}^{2+}]$ ein kritischer Ca^{2+} -Sensor ist, der eine Verbindung zwischen mechanischer Dysfunktion der Sarkomere und der Induktion der Genexpression für eine Hypertrophie darstellt [Übersicht in Fatkin & Graham, 2002]. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Veränderungen im myokardialen Metabolismus als primäre Effekte mutierter Proteine auftreten, beispielsweise durch Mutationen der regulatorischen Untereinheit der AMP-Kinase

(*PRKAG2* Gen) [Arad *et al.*, 2002a; Blair *et al.*, 2001]. Eine Fehlfunktion dieser Kinase könnte zu ATP-Mangel in der Muskelzelle führen, was nicht den durch ATP-Hydrolyse getriebenen Querbrückenzyklus direkt beeinflussen würde, sondern im weiteren Verlauf zu einer verringerten Aktivität der SERCA2a führen würde. Als Resultat käme es dann zur Erhöhung der zytosolischen $[Ca^{2+}]$, was ebenfalls als potentieller Auslöser einer linksventrikulären Hypertrophie viel diskutiert wird. Schließlich zeigen jedoch auch die mit FHC assoziierten Mutationen sarkomerischer Proteine, wie beispielsweise des cTnI, dass die mechanische Dysfunktion der Sarkomere als gemeinsames Merkmal der Erkrankung möglicherweise auch der Stimulus für eine Hypertrophie sein könnte [Fatkin & Graham, 2002].

Ähnliches gilt für die Ausbildung einer Myokarddilatation. Zum einen ist es möglich, dass Mutationen in sarkomerischen Proteinen wie beispielsweise des cTnT zu einer verringerten Kraftentwicklung führen, und somit die linksventrikuläre Funktion derart beeinträchtigen, dass Ventrikeldilatation und die Ausprägung einer schweren Herzinsuffizienz die Folge sind. Zum anderen könnten aber auch mutierte zytoskelettale Proteine wie Desmin oder Titin der primäre Stimulus einer Dilatation sein, indem sie direkt auf die Kraftübertragung der Myofilamente Einfluss nehmen. Das Resultat gestörter Kraftübertragung vom Myofilament auf die gesamte Zelle, den Zellverband bis hin zum gesamten Muskel könnte ebenfalls eine systolische Dysfunktion zur Folge haben [Übersicht in Fatkin & Graham, 2002].

Die hier vorgestellten Ergebnisse am Modell der cTnI-assozierten FHC und der Untersuchung isolierter Myofibrillen aus ICM- und DCM-Herzen zeigen eine Gemeinsamkeit. In allen untersuchten Myofibrillen ist die Dauer der für eine vollständige Relaxation benötigten Zeitspanne deutlich verlängert. In der kardiologischen Diagnostik und in Analysen des intakten Herzens („*working heart*“) wird für diese Zeitspanne der Wert Tau (τ , [ms]) verwendet. Im FHC-Modell der hcTnI R145G Mutante ist die Ratenkonstante k_{REL} stark verringert, was bei einer Berechnung von τ zu einer Verlängerung auf ca. 150 % führt. Auch ICM Herzen hatten eine verringerte Ratenkonstante k_{REL} gezeigt, die, verglichen mit Spenderherzen, ebenfalls zu einer Verlängerung von τ auf etwa das 1,5-fache führte. Zwar hatten die DCM Herzen keinerlei Veränderungen in der Ratenkonstante k_{REL} gezeigt, doch da sie eine verlängerte lineare Phase der Relaxation zeigten, und die Gesamtdauer der Relaxation sich aus beiden Phasen des Kraftabfalls zusammensetzt, ist auch für die DCM Herzen eine deutliche Verlängerung von τ festzustellen gewesen.

Ungeachtet aller Diskussionen über Primär- und Sekundäreffekte einer Herzinsuffizienz lässt sich hier also abschließend festhalten, dass ein insuffizientes Herz nicht nur durch eine

verminderte Pumpleistung charakterisiert werden kann. Vielmehr gewinnt die Möglichkeit Gewicht, dass es sich bei einigen beobachteten klinischen Funktionsstörungen primär um eine verringerte diastolische Relaxationsfähigkeit handeln könnte, die bereits auf myofibrillärer Ebene zum Tragen kommt und möglicherweise erst weitere Umwandlungsprozesse im Herzen nach sich zieht.

Weiterführende genetische Studien an betroffenen Familien mit vererbter Kardiomyopathie werden nötig sein, um die Liste der krankheitsverursachenden Gene und Mutationen zu vervollständigen. Erst wenn die normale Funktion dieser Gene im Geschehen der Herzmuskelkontraktion und –relaxation weitgehend aufgeklärt ist, wird man anfangen können zu verstehen, wie diese Mutationen zu einer Kardiomyopathie führen können. Höchstwahrscheinlich ist die Ausprägung einer vererbten Kardiomyopathie doch eine hochkomplexe Interaktion von genetischer Voraussetzung und den Umweltbedingungen des einzelnen Patienten, und ist nicht allein durch die auslösende Mutation geprägt. Ziel sollte es also nicht sein, ein verallgemeinerndes Modell der Hypertrophie- oder Dilatationsausbildung zu finden, sondern die Zusammenhänge im Einzelfall so deuten zu können, dass individuelle Therapieansätze möglich werden können.

5 Abschließende Betrachtungen über das Modell der isolierten kardialen Myofibrillen

Der Austausch von endogenem gegen exogenen Troponinkomplex in kardialen Myofibrillen der Maus führte in der vorliegenden Arbeit zu einem gut charakterisierbaren Modell der FHC. Ein Vergleich der *in vitro* mit hcTnI R145G behandelten Myofibrillen mit den Daten, die James *et al.* (1999) mit dem Mausmodell dieser Mutation erhalten hatten konnten demonstrieren, dass sich zum größten Teil übereinstimmende Ergebnisse ergeben. Dabei kommen Studien am sog. „working heart“ oder auch am multizellulären Präparat der gehäuteten Muskelfasern sicherlich der *in-vivo* Situation des Myokards näher, da sie Adaptationsprozesse wie zelluläre Dysorganisation oder Myozytenhypertrophie mit einbeziehen. Eine solche mechanische Charakterisierung eines multizellulären Myokardpräparats vermag jedoch nicht zwischen Primär- und Sekundäreffekten der zu untersuchenden sarkomerischen Erkrankung auf die kontraktile Funktion zu unterscheiden. Das hier vorgestellte Modell des Troponinaustausches in isolierten Myofibrillen hat sich demnach als geeignete Methode herausgestellt, primäre Effekte einer

Mutation im Sarkomer anhand Veränderungen in der Kinetik der Ca^{2+} -induzierten Kraftentwicklung und des Kraftabfalls zu untersuchen.

Die Methode der Kraftmessungen an isolierten kardialen Myofibrillen lässt erstmals die Analyse von Relaxation und Kraftentwicklung zu. Die Differenzierungsmöglichkeit innerhalb der Phasen des Kraftabfalls ermöglichte in der hier vorgestellten Arbeit die intensivere Untersuchung spezifische Effekte auf die Kinetik der Relaxation sowohl in ICM als auch in DCM Herzen. Dabei wurde erstmals festgestellt, dass die Myofibrillen der ICM und DCM Herzen konträre Effekte auf den biphasischen Verlauf des Kraftabfalls aufweisen, ein Phänomen, das durch das derzeit diskutierte Modell des Querbrückenzyklus noch nicht zu erklären ist.

VI Literaturverzeichnis

- Adamcová M., Pelouch V. (1999)** Isoforms of troponin in normal and diseased myocardium. *Physiol. Res.* 48; 235-247
- Alpert N.R., Mulieri L.A., Warshaw D. (2002)** The failing heart. *Cardiovasc. Res.* 54 (1); 1-10
- Anderson P.A.W., Malouf N.N., Oakeley A.E., Pagani E.D, Allen P.D. (1991)** Troponin T isoform expression in humans: a comparison among normal and failing adult heart, fetal heart, and adult and fetal skeletal muscle. *Circ. Res.* 69; 1226-1233
- Arad M., Benson D.W., Perez-Atayde A.R., McKenna W.J., Sparks E.A., Kantor R.J., McGarry K., Seidman J.G., and Seidman C.E. (2002a)** Constitutively active AMP kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* 109;357-363
- Arad M., Seidman J.G., Seidman C.E. (2002)** Phenotypic diversity in hypertrophic cardiomyopathy. *Human Molecular Genetics*, 11:20; 2499-2506
- Arber S., Hunter J.J., Ross J. et al. (1987)** MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell* 88 ; 399-403
- Beuckelmann D.J., Nabauer M., Erdmann E. (1992)** Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation* 85 (3); 1046-55
- Bhavsar P.K., Brand N.J., Yacoub M.H., Barton P.J.R. (1991)** Isolation and characterization of the human cardiac troponin I gene (TNNI3). *Genomics* 35; 11-23
- Blair E., Redwood C., Ashrafian H., Oliveira M., Broxholme J., Kerr B., Salmon A., Ostman-Smith I., Watkins H. (2001)** Mutations in the $\gamma 2$ subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 10; 1215-1220
- Bonne G., Carrier L., Bercovici J., Cruaud C., Richard P., Hainque B., Gautel M., Labeit S., James M., Beckmann J., et al. (1995)** Cardiac myosin binding protein-C gene splice acceptor site mutation is associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat. Genet.* 11; 438-440
- Bowling N, Walsh R.A., Song G., Estridge T., Sandusky G.E., Fouts R.L., Mintze K., Pickard T., Roden R., Bristow M.R., Sabbah H.N., Mizrahi J.L., Gromo G., King G.L., Vlahos C.J. (1999)** Increased protein kinase C activity and expression of Ca²⁺-sensitive isoforms in the failing human heart. *Circulation* 99, 384-391
- Bowman JC, Steinberg SF, Jiang T, Geenen DL, Fishman GI, Buttrick PM. (1997)** Expression of protein kinase C beta in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates. *J. Clin. Invest.* 100; 2189-2195
- Bradford M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 72; 248-254
- Brenner B., Eisenberg E (1986)** Rate of force generation in muscle: correlation with actomyosin ATPase activity in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 83; 3542-3546

- Brenner B. (1988)** Effect of Ca²⁺ on cross-bridge turnover kinetics in skinned single rabbit psoas fibers: implications for regulation of muscle contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*: 85 (9); 3265-9.
- Brenner B., Chalovich J.M. (1999a)** Kinetics of thin-filament activation probed by fluorescence of N-((2-(Iodoacetosylethyl)-N-methyl)amino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-labeled troponin I incorporated into skinned fibers of rabbit psoas muscle: implications for regulation of muscle contraction. *Biophys. J.* 77; 2692
- Brenner B., Kraft T., Yu L.C., Chalovich J.M. (1999b)** Thin-filament activation probed by fluorescence of N-((2-(Iodoacetosylethyl)-N-methyl)amino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-labeled troponin I incorporated into skinned fibers of rabbit psoas muscle. *Biophys. J.* 77; 2677-2691
- Bristow M.R. (1984)** The adrenergic nervous system in heart failure. *N. Engl. J. Med.* 311; 850-851
- Bristow M.R., Feldman A.M. (1992)** Changes in the receptor-G protein-adenylyl cyclase system in heart failure from various types of heart muscle disease. *Basic Res. Cardiol.* 87 (suppl 1); 15-35
- Bristow M.R., Ginsburg R., Minobe W., Cubicciotti R.S., Sageman W.S., Lurie K., Billingham M.E., Harrison D.C., Stinson E.B. (1982).** Decreased catecholamine sensitivity and β -adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N. Engl. J. Med.* 307; 205-211
- Brixius K., Savvidou-Zaroti P., Mehlhorn U., Bloch W., Kranias E.G., Schwinger R.H. (2002)** Increased Ca²⁺-sensitivity of myofibrillar tension in heart failure and its functional implication. *Basic Res. Cardiol.* 97 Suppl.1; I111-7
- Burton D., Abdulrazzak H., Knott A., Elliott K., Redwood C., Watkins H., Marston S., Ashley C. (2002)** Two mutations in troponin I that cause hypertrophic cardiomyopathy have contrasting effects on cardiac muscle contractility. *Biochem. J.*: 362(Pt 2); 443-51
- Centner T. et al. (2001)** Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J. Mol. Biol.* 306; 717-726
- Chandra M., Kim J.J., Solaro R.J. (1999)** An improved method for exchanging troponin subunits in detergent skinned rat cardiac fiber bundles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263; 219
- Chen Z., Higashiyama A., Yaku H., Bell S., Fabian J., Watkins MW., Schneider D.J., Maughan D.W., Lewinter M. M. (1997)** Altered expression of troponin T isoforms in mild left ventricular hypertrophy in the rabbit. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29: 2345-2354
- Chong P.C., Hodges R.S. (1981)** A new heterobifunctional cross-linking reagent for the study of biological interactions between proteins. I. Design, synthesis, and characterization. *J. Biol. Chem.* 256; 5064-5070
- Collins J.F., Pawloski-Dahm C., Davie M.G. (1996)** The role of the cytoskeleton in left ventricular pressure overload hypertrophy and failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28; 1435-1443
- Colomo F., Piroddi N., Poggesi C., Te Kronnie G., Tesi C. (1997)** Active and passive forces of isolated myofibrils from cardiac and fast skeletal muscle of the frog. *J. Physiol.* 500; 535-548

- Colomo F., Nencini S., Piroddi N., Poggesi C., Tesi C. (1998)** Calcium dependence of the apparent rate of force generation in single striated muscle myofibrils activated by rapid solution changes. *Adv Exp Med Biol* 1998;453:373-81; Palmer S, Kentish JC. Roles of Ca²⁺ and crossbridge kinetics in determining the maximum rates of Ca²⁺ activation and relaxation in rat and guinea pig skinned trabeculae. *Circ. Res.* 83(2); 179-86
- Colyer J., Wang J.H. (1991).** Dependence of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium pump activity on the phosphorylation status of phospholamban. *J. Biol. Chem.* 266; 115-122
- Cooke R. (1997)** Actomyosin interaction in striated muscle. *Physiol.Rev.* 77; 671-697
- Cornea R. L., Jones L.R., Autry J.M., Thomas D.D (1997)** Mutation and phosphorylation change the oligomeric structure of phospholamban in lipid bilayers. *Biochemistry* 36; 2960-2967
- Danielsen W., von der Leyen H., Meyer W., Neumann J., Schmitz W., Scholz H., Starbatty J., Stein B., Doring V., Kalmar P. (1989)** Basal and isoprenaline-stimulated cAMP content in failing versus nonfailing human cardiac preparations. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 14; 171-173
- Dec G.W. & Fuster V. (1994)** Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 331; 1564-1575
- Dong W.J., Rosenfeld S.S., Wang C.K., Gordon A.M., Cheung H.C. (1996)** Kinetic studies of calcium binding to the regulatory site of troponin C from cardiac muscle. *J Biol. Chem.* 271(2); 688-94
- Dong W.J., Wang C.K., Gordon A.M., Rosenfeld S.S., Cheung H.C. (1997)** A kinetic model for the binding of Ca²⁺ to the regulatory site of troponin from cardiac muscle. *J. Biol. Chem.* 272(31); 19229-35
- Elliott K., Watkins H., Redwood C. S. (2000)** Altered regulator properties of human cardiac troponin I mutants that cause hypertrophic cardiomyopathy *J Biol Chem* 275 (29); 22069-22074
- Fabiato A. (1988)** Computer programs for calculation of total free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Methods in Enzymology* 157, 378-401
- Farah C.S., Miyamoto C.A., Ramos C.H., Da S.-A.C., Quaggio R.B., Fujimori K., Smillie L.B., Reinach F.C. (1994)** Structural and regulatory functions of the NH₂- and COOH-terminal regions of skeletal muscle troponin I. *J. Biol. Chem.* 269; 5230-5240
- Fatkin D, Graham R.M. (2002)** Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiol. Rev.* 82; 945-980
- Faulkner G., Lanfranchi G., Valle G. (2001)** Telethonin and other new proteins of the Z-disc of skeletal muscle. *IUBMB Life* 51 (5);275-82
- Flesch M. et al. (1996)** Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and phospholamban mRNA and protein levels in end-stage heart failure due to ischemic or dilated cardiomyopathy. *J. Mol. Med.* 74;321-332
- Francis G.S. (2001)** Pathophysiology of chronic heart failure. *Am. J. Med.* 110 (suppl 7a); 37S-46S
- Freiburg A., Trombitás K., Hell W et al. (2000)** Series of exogen skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circ. Res.* 86; 1114-1121

- Gasmi-Seabrook** G.M., Howarth J.W., Finley N., Abusamhadneh E., Gaponenko V., Brito R.M., Solro R.J., Rosevear P.R. (1999) Solution structures of the COOH-terminal domain of cardiac troponin C free and bound to the -terminal domain of cardiac troponin I. *Biochemistry* 38; 8313-8322
- Geier** C., Perrot A., Ozcelik C., Binner P., Counsell D., Hoffmann K., Pilz B., Martiniak Y., Gehmlich K., van der Ven P.F., Furst D.O., Vornwald A., von Hodenberg E., Nurnberg P., Scheffold T., Dietz R., Osterziel K.J. (2003) Mutations in the human muscle LIM protein gene in families with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 18:107(10); 1390-5
- Geisterfer-Lowrance** A.A., Kass S., Tanigawa G., Vosberg H.P., McKenna W., Seidman C.E., Seidman J.G. (1990) A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell* 62; 999-1006
- Gergely**, J., Grabarek Z., Leavis P.C., Strasburg G., Tao T., Wang C.L. (1988) Transmission of the Ca²⁺-regulatory signal in skeletal muscle thin filaments. *Adv. Exp. Med. Biol.* 226; 155-164
- Gerull** B., Gramlich M., Atherton J., McNabb M., Trombitás K., Sasse-Klaassen S., Seidman J.G., Seidman C., Granzier H., Labeit S., Frenneaux M., Thierfelder L. (2002) Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy. *Nature genetics* 30; 201-204
- Gordon** A.M., Homsher E., Regnier E. (2000) Regulation of contraction in striated muscle. *Physiological Reviews* 80; 853-923
- Gordon** A.M., Regnier M., Homsher E. (2001) Skeletal and Cardiac muscle contractile activation: tropomyosin rocks and rolls. *NIPS*. 16; 49-55
- Grand** R.J., Levine B.A., Perry S.V. (1982) Proton-magnetic-resonance studies on the interaction of rabbit skeletal-muscle troponin I with troponin C and actin. *Biochem. J.* 203, 61-68
- Greaser** M.L., Gergely J. (1971) Reconstitution of troponin activity from three protein components. *J. Biol. Chem.* 246; 4226-4223
- Greaser** M.L., Gergely J. (1973) Purification and properties of the components from troponin. *J. Biol. Chem.* 248; 2125-2133
- Gregorio** C.C., Granzier H., Sorimachi H., Labeit S. (1999) Muscle assembly: a titanic achievement? *Curr. Opin. Cell Biol.* 11; 18-25
- Grunig** E., Tasman J.A., Kucherer H., et al. (1998) Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 31; 195-201
- Hanahan** D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J.Mol. Biol.*: 166(4); 577-80
- Hasenfuss** G., Pieske B. (2002) Calcium cycling in congestive heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34; 951-969
- Hatt** P.Y., Berjal G., Moravec J., Swynghedauw B. (1970) Heart failure: An electronmicroscopic study of the left ventricular papillary muscle in aortic insufficiency in the rabbit. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1; 235-247
- Hazard** A.L., Kohout S.C., Stricker N.L., Putkey J.A., Falke J.J. (1998) The kinetic cycle of cardiac troponin C: calcium binding and dissociation at site II trigger slow conformational rearrangements. *Protein Sci.* 7 (11); 2451-9
- Heeley** D.H., Golosinska K., Smillie L.B. (1987) The effects of troponin T fragments T1 and T2 on the binding of nonpolymerizable tropomyosin to F-actin in the presence and absence of troponin I and troponin C. *J. Biol. Chem.* 262; 9971-78

- Heimer** G.V., Taylor C.E. (1974) Improved mountant for immunofluorescence preparations. *J. Clin. Pathol.*:27(3); 254-6
- Hein** S., Kostin S., Heling A. Maeno Y., Schaper J. (2000) The role of the cytoskeleton in heart failure. *Cardiovascular Research* 45; 273-278
- Hoffmann** B., Schmidt-Traub H., Perrot A., Osterziel K.J., Geßner R. (2001) First mutation in cardiac troponin C, L29Q, in a patient with hypertrophic cardiomyopathy. *Hum. Mutat.* 17; 524
- Holmes** K.C., Geeves M.A. (2000) The structural basis of muscle contraction. *Philos. Trans. R. Soc Lond. B Biol. Sci.* 355 (1396); 419-31
- Huang** L., Wolska B.M., Montgomery D.E., Burkart E.M., Buttrick P.M., Solaro R.J. (2001) Increased contractility and altered Ca(2+) transients of mouse heart myocytes conditionally expressing PKCbeta. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280 C1114-C1120
- Huxley** H.E. (1957) Muscle structure and theories of contraction. *Prog. Biophys. Biophys. Chem.* 7; 255-318
- Ingraham** R.H., Swenson C.A. (1984) Binary interactions of troponin subunits. *J. Biol. Chem.* 259; 9544-9548
- James** J., Zhang Y., Osinska H., Sanbe A., Klevitsky R., Hewett T., Robbins J. (2000) Transgenic modeling of a cardiac troponin I mutation linked to familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ. Res.*: 87; 805-811
- Kamisago** M., Sharma S.D., DePalma S.R., Solomon S., Sharma P., Smoot L., Mullen M.P. Wolf PK., Wigle E.D., Seidman J.G. (2000). Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 343; 1688-1696
- Kimura** A., Harada H., Park J-E., Nishi H., Satoh M. et al. (1997) Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Nature genetics* 16: 379-382
- Klausen** I.C., Mogensen J., Egeblad H., Baandrup U., Borglum A.D. (1999) A novel mutation in the troponin I gene is associated with sudden death in familial hypertrophic cardiomyopathy. Annual meeting of the American Society for human genetics, Abstract <http://www.faseb.org/genetics/ashg99/f1714.htm>
- Klinke** R. & Silbernagel S. (1996) Lehrbuch der Physiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Kobayashi** T., Tao T., Gergely J., Collins J.H. (1994) Structure of the troponin complex. Implications of photocross-linking of troponin I to troponin C thiol mutants. *J. Biol. Chem.* 269; 5725-5729
- Kokado** H., Shimizu M., Yoshio H., Ino H., Okeie K., Emoto Y., Matsuyama T., Yamaguchi M., Yasuda T., Funjino N., Ito H., Mabuchi H. (2000) Clinical features of hypertrophic cardiomyopathy caused by a Lys183 deletion mutation in the cardiac troponin I gene. *Circulation* 102; 663-669
- Konstam** M.A., Mann D.L. (2002) Contemporary medical options for treating patients with heart failure. *Circulation* 105; 2244-2246
- Kranias** E.G., Solaro R.J. (1982) Phosphorylation of troponin I and phospholamban during catecholamine stimulation of rabbit heart. *Nature* 298, 182-184
- Labeit** S., Kolmerer B., Linke W.A. (1997) The giant protein titin: emergin roles in physiology and pathophysiology. *Circ. Res.* 80; 290-294
- Laemmli** U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227; 680-685

- Lehman** W., Vibert P., Uman P., Craig R. (1995) Steric blocking by tropomyosin visualized in relaxed vertebrate muscle thin filaments. *J. Mol. Biol.* 251; 191-196
- Leonhardt** H. (1990) „Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen“ ,Thieme Verlag
- Li** H., Linke W.A., Oberhauser A.F., Carrion-Vazquez M., Kerkvliet J.G., Lu H., Marszalek P.E., Fernandez J.M. (2002) Reverse engineering of the giant muscle protein titin. *Nature* 29; 418(6901); 998-1002
- Liao** R., Wang C.K., Cheung H.C. (1994) Coupling of calcium to the interaction of troponin I with troponin C from cardiac muscle. *Biochemistry* 33; 12729-34
- Lindemann** J.P., Jones L.R., Hathaway D.R., Henry B.G. Watanabe A.M. (1983). β -Adrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and Ca^{2+} -ATPase activity in guinea pig ventricles. *J. Bio. Chem.* 258; 464-471
- Lynn** R.W. & Taylor E.W. (1971) Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry*: 10(25); 4617-24.
- Ma** Y.Z., Taylor E.W. (1994) Kinetic mechanism of myofibril ATPase. *Biophys. J.* 66; 1542
- MacGowan**, gA., Du C., Cowan D.B., stamm C., McGowan, F.X, Solaro R.J. (2001) Ischemic dysfunction in transgenic mice expressing troponin I lacking protein kinase C phosphorylation sites. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280, H835-H843
- MacLennan**, D. H., Kranias E.G. (2003) Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 566 -577
- Maisch** B. (1998) Classification of cardiomyopathies according to the WHO/ISFC Task Force--more questions than answers? *Med. Klin.* 15: 93(4);199-209
- Mann** D.L. (1998) Basic mechanisms of disease progression in the failing heart the role of excessive adrenergic drive. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 41; 1-8
- Manolio** T.A., Baughman K.L., Rodeheffer R. et al. (1992) Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J. Cardiol*: 69; 1458
- Margossian** S.S., White H.D., Caulfield J.B., Norton P., Taylor S., Slayter N.Y. (1992) Light chain 2 profile and activity of human ventricular myocardium during dilated cardiomyopathy. Identification of a causal agent for impaired myocardial function. *Circulation*; 85 (5); 1720-33
- Maron** B.J., Bonow R.O., Cannon R.O., Leon M.B., Epstein S.E. (1987) Hypertrophic cardiomyopathy: interrelations of clinical manifestations, pathophysiology, and therapy. *N. Engl. J. Med.* 316, 780-789
- Maron** B.J., Gardin J., Flack J., et al. (1995) Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults: echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study: Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. *Circulation* 92; 795-789
- McKillop** D.F., Geeves M.A. (1993) Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament. *Biophys. J.* 65; 693-701
- Miki** M., Iio T.J. (1993), Kinetics of structural changes of reconstituted skeletal muscle thin filaments observed by fluorescence resonance energy transfer. *J.Biol.Chem.* 268; 7101-7106

- Mittmann K.**, Jaquet K., Heilmeyer L. M.G. (1990) A common motif of two adjacent phosphoserines in bovine, rabbit and human cardiac troponin I. *FEBS Lett.* 273; 41-45
- Montgomery D.E.**, Wolska B.M., Pyle W.G., Roman B.B., Dowell J.C., Buttrick P.M., Koretsky A.P., Del Nido P., Solaro R.J. (2002) Alpha-Adrenergic response and myofilament activity in mouse hearts lacking PKC phosphorylation sites on cardiac TnI. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 282, H2397-H2405
- Morano I.** (1992) Effects of different expression and posttranslational modifications of myosin light chains on contractility of skinned human cardiac fibers. *Basic Res. Cardiol.* 87; 129-141
- Morano I.**, Hädicke K., Haase H., et al. (1997) Changes in essential myosin light chain isoform expression provide a molecular basis for isometric tension regulation in the failing human heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29; 1177-1187
- Morner S.**, Richard P., Kazzam E., Hainque B, Schwartz K., Waldenstrom A. (2000) Deletion in the cardiac troponin I gene in a family from northern Sweden with hypertrophic cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32 (3); 521-5
- Murphy A.M.**, Jones L.D., Sims H.F., Strauss A.W. (1991) Molecular cloning of rat cardiac troponin I and analysis of troponin I isoform expression in developing rat heart. *Biochemistry.* 22:30(3); 707-12
- Nassar R.**, Malouf N.N., Kelly M.B., Oakley A.E., Anderson P.A. (1991) Force pCa relation and troponin T isoforms of rabbit myocardium. *Circ Res.* 69(6); 1470-5.
- Neagoe C.**, Kulke M., del Monte F., Gwathmey J.K., de Tombe P., Hajjar R.J., Linke W. (2002) Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation* 106; 1333-1341
- Niimura H.**, Patton K.K., McKenna W.J., Soultis J., Maron B.J., Seidman J.G., Seidman C.E. (2002) Sarcomere protein gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy of the elderly. *Circulation*: 105; 446-451
- Olah G.A.**, Trewella J. (1994) A model structure of the muscle protein complex 4Ca^{2+} -troponin I derived from small-angle scattering data; Implications for regulation. *Biochemistry* 33; 12800-6
- Olson T.M.**, Doan T.P., Kishimoto N.Y., Whitby F.G., Ackerman M.J., Fananapazir L. (2000) Inherited and de novo mutations in the cardiac actin gene cause hypertrophic cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32, 1687-1694
- Ortiz-Lopez R.**, Hua L., Su J., Goytia V., Towbin J.A. (1997) Evidence for a dystrophin missense mutation as a cause of X-linked dilated cardiomyopathy. *Circulation* 95 ; 2434-2440
- Palmer S.**, Kentish J.C. (1998) Roles of Ca^{2+} and cross-bridge kinetics in determining the maximum rates of Ca^{2+} -activation and relaxation in rat and guinea pig skinned trabeculae. *Circ. Res.* 83; 179-186
- Palmiter K.A.**, Solaro R.J. (1997) Molecular mechanisms regulating the myofilament response to Ca^{2+} : implications of mutations causal for familial hypertrophic cardiomyopathy. *Basic Res. Cardiol.* 92 (Suppl.1); 63-74
- Pearlstone J.**, Carpenter M., Smillie L. (1986) Amino acid sequences of rabbit cardiac troponin T. *J Biol Chem.* 261; 16795-16810

- Pearlstone J.R., Smillie L.B. (1988)** Effects of troponin I plus C on the binding of troponin T and its fragments to α -tropomyosin; Ca^{2+} -sensitivity and cooperativity. *J. Biol. Chem.* 258; 2534-2542
- Phillips G.N., Fillers G.P., Cohen C. (1986)** Tropomyosion crystal structure and muscle regulation. *J. Mol. Biol.* 192; 111-131
- Poetter K., Jiang H., Hassanzadeh S., Master S.R., Chang A., Dalakas M.C., Rayment I., Sellers J.R., Fananapazir L., Epstein N.D. (1996)** Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle. *Nat. Genet.* 13; 63-69
- Potter J.D. (1982)** Preparation of troponin and its subunits. *Methods in Enzymology* 85 Pt B; 241-263
- Potter J.D., & Gergeley J. (1974)** Troponin, tropomyosin and actin interactions in the Ca^{2+} -regulation of muscle contraction. *Biochemistry* 13. 2697-2703
- Potter J.D., Sheng Z., Pan B.S., Zhao J. (1995)** A direct regulatory role for troponin T and a dual role for troponin C in Ca^{2+} -regulation of muscle contraction. *J. Biol. Chem.* 270; 2550-2562
- Rarick H.M., Tu X.-H., Solaro J., Martin A.F. (1997)** The C terminus of cardiac troponin I is essential for full inhibitory activity and Ca^{2+} -sensitivity of rat myofibrils. *J. Biol. Chem.* 272; 26887-26892
- Rayment I., Rypniewski W.R., Schmidt B.-K., Smith R., ToMcHick D.R., Benning M.M., Winkelmann D.A., Wesenberg G., Holden H.M. (1993)** Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* 261; 50-55
- Rayment I., Holden H.M., Sellers J.R., Fananapazir L., Epstein N.D. (1995)** Structural interpretation of the mutations in the beta-cardiac myosin that have been implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Apr 25;92(9):3864-8.
- Reiser P.J., Kline W.O. (1998)** Electrophoretic separation and quantitation of cardiac myosin heavy chain isoforms in eight mammalian species. *Am. J. Physiol.* 274; H1048-53
- Robertson S.P., Johnson J.D., Holroyde M.J., Kranias E.G., Potter J.D., Solaro R.J. (1982)** The effect of troponin I phosphorylation on the Ca^{2+} -binding properties of the Ca^{2+} -regulatory site of bovine cardiac troponin. *J. Biol. Chem.* 257, 260-263
- Salinovich O., Montelaro R.C. (1986)** Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfatepolyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 156; 341-347
- Satoh M., Takahashi M., Sakamoto T., Hiroe M., Marumo F., Kimura A. (1999)** Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262; 411-417
- Schachat F.H., Diamond M.S., Brandt P.W. (1987)** Effect of different troponin t-tropomyosin combinations on thin filament activation. *J. Mol. Biol.* 198; 551-554
- Schaertl S., Lehrer S.S., Geeves M.A. (1995)** Separation and characterization of the two functional regions of troponin involved in muscle thin filament regulation. *Biochemistry* 34; 15890-15894

- Schaper J.**, Speiser B., Brand T. The cytoskeleton and extracellular matrix in human hearts with dilated cardiomyopathy. In Figulla HR., Kandolf R., McManus B., editors, (1993) Idiopathic dilated cardiomyopathy, Berlin Heidelberg: Springer Verlag, pp. 75-80
- Seiler S.H.**, Fischman D.A., Leinwand L.A. (1996) Modulation of myosin filament organization by C-protein family members. *Mol. Biol. Cell* 7; 113-127
- She M.**, Trimble D., Yu L.C., Chalovich J.M. (2000) Factors contributing to troponin exchange in myofibrils and in solution. *J. Muscle. Res. Cell Motil.* 21(8); 737-45
- Shiraishi F.**, Kambara M., Ohtsuki I. (1992) Replacement of troponin components in myofibrils. *J.Biochem. (Tokyo)* 111; 61
- Siedner S.**, Kruger M., Schroeter M., Metzler D., Roell W., Fleischmann B.K., Hescheler J., Pfitzer G., Stehle R. (2003) Developmental changes in contractility and sarcomeric proteins from the early embryonic to the adult stage in the mouse heart. *J. Physiol.* 548(Pt 2); 493-505
- Solaro R.J.**, Rarick HM (1998) Troponin and Tropomyosin - Protein that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Circ.Res.* 83; 471-480
- Stehle R.**, Brenner B. (2000a) Cross-bridge attachment during high-speed active shortening of skinned fibers of the rabbit psoas muscle: Implications for cross bridge action during maximum velocity of filament sliding. *Biophys. J.* 78; 1458-147
- Stehle R.**, Lionne C., Travers F., Barman T. (2000b), Kinetics of the initial steps of rabbit psoas myofibrillar ATPases studied by tryptophan and pyrene fluorescence stopped-flow and rapid flow-quench. Evidence that cross-bridge detachment is slower than ATP binding. *Biochemistry* 39; 7508
- Stehle R.**, Kruger M, Pfitzer G. (2002a) Force kinetics and individual sarcomere dynamics in cardiac myofibrils after rapid Ca^{2+} changes. *Biophys. J. Oct;* 83(4); 2152-61
- Stehle R.**, Kruger M., Scherer P., Brixius K., Schwinger R.H., Pfitzer G. (2002b) Isometric force kinetics upon rapid activation and relaxation of mouse, guinea pig and human heart muscle studied on the subcellular myofibrillar level. *Basic Res. Cardiol.* 97 Suppl 1; I127-35.
- Strauss J.D.**, Zeugner C., Van Eyk J.E., Bletz C., Troschka M., Ruegg J.C. (1992) Troponin replacement in permeabilised cardiac muscle. Reversible extraction of troponin I by incubation with vanadate. *FEBS Lett.* 310, 229-234
- Szczesna D.**, Zhang R., Zhao J., Jones M., Potter J.D. (1999) The role of the NH_2 - and $COOH$ -terminal domains of the inhibitory region of troponin I in the regulation of skeletal muscle contraction. *J. Biol. Chem.* 274; 29536-29542
- Takahashi-Yanaga F.**, Morimoto S., Ohtsuki I. (2001) Functional consequences of the mutations in human cardiac troponin I gene found in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.*: 33(12); 2095-107.
- Talbot J.A.** & Hodges R.S. (1981) Synthetic studies on the inhibitory region of rabbit skeletal troponin I. Relationship of amino acid sequence to biological activity. *J. Biol. Chem.* 256; 2798-2802
- Tao T.**, Gong B.J., Leavis P.C. (1990) Calcium-induced movement of troponin I relative to actin in skeletal muscle thin filaments. *Science* 274; 1339-1341
- Tesi C.**, Piroddi N., Colomo F., Poggesi C. (2002) Relaxation kinetics following sudden Ca^{2+} reduction in single myofibrils from skeletal muscle. *Biophys. J.* 83(4); 2142-51

- Thierfelder L., Watkins H., MacRae C., Lamas R., McKenna W., Vosberg H.P., Seidman J.G., Seidman C.E. (1994)** Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell* 77; 710-712
- Tobacman L.S. (1996)** Thin filament mediated regulation of cardiac contraction. *Annu. Rev. Physiol.* 58; 447-481
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(9); 4350-4.
- Towbin J.A., Bowles N.E. (2002)** The failing heart. *Nature*.10: 415; 227-33.
- Trinick J. & Tskhovrebova L. (1999)** Titin: a molecular control freak. *Trends Cell Biol.* 9; 377-380
- Tripet B., Van Eyk J.E., Hodges R.S. (1997)** Mapping of a second actin-tropomyosin and a second troponin C binding site within the C terminus of troponin I, and their importance in the Ca^{2+} -dependent regulation of muscle contraction. *J. Mol. Biol.* 271; 728-750
- Vallins W.J., Brand N.J., Dabhade N., Butler-Browne G., Yacoub M.H., Barton P.J., (1990)** Molecular cloning of human cardiac troponin I using polymerase chain reaction. *FEBS Lett.* 17: 270; 57-61
- Van der Velden J., Boontje N.M., Papp Z., Klein L.J., Visser F.C., de Jong J.W., Owen V.J., Burton P.B., Stienen G.J. (2002)** Calcium sensitivity of force in human ventricular cardiomyocytes from donor and failing hearts. *Basic Res. Cardiol.*: 97 Suppl 1; 1118-26.
- Van der Velden J., Klein L.J., Van der Bijl M. et al. (1999)** Isometric tension development and its calcium sensitivity in skinned myocyte-sized preparations from different regions of the human heart. *Cardiovasc. Res.* 42; 706-719
- Van der Velden J., Klein L.J., Zarmeba R., Boontje N.M., Huybregts M.A.J.M., Stoker, W., Eijssman L., deJong J.W., Visser C.A., Visser F.C., Stienen G.J.M. (2001)** Effects of Calcium, inorganic phosphate, and pH on isometric force in single skinned cardiomyocytes from donor and failing human hearts. *Circulation* 104; 1140-1146
- Van der Velden J., Papp Z., Zarembo R., Boontje N.M., deJong J.W., Owen V.J., Burton P.B., Goldmann P., Jaquet K., Stienen G.J. (2003)** Increased Ca^{2+} -sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc. Res.* 57 (1); 37-47
- Van Eerd J.P. & Takahashi K. (1976)** Determination of the complete amino acid sequence of bovine cardiac troponin C. *Biochemistry* 15; 1171-1180
- Van Eyk J. E. & Hodges R.S. (1988)** The biological importance of each amino acid residue of the troponin I inhibitory sequence 104-115 in the interaction with troponin C and tropomyosin-actin. *J. Biol. Chem.* 263, 1726-1732
- Vikstrom KL & Leinwand LA. (1996)** Contractile protein mutations and heart disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8; 97-105
- Wang X., Li F., Campbell S.E., Gerdes M. (1999)** Chronic pressure overload hypertrophy and failure in guinea pigs: II Cytoskeletal remodeling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 3 ; 319-331

- Ward** M.L., Pope A.J., Loiselle D.S., Cannell M.B. (2003) Reduced contraction strength with increased intracellular $[Ca^{2+}]$ in left ventricular trabeculae from failing rat hearts. *J Physiol.* 546.2; 537-550
- Watkins** H., McKenna W.J., Thierfelder L., Suk H.J., Anan R., O'Donoghue A., Spirito P., Matsumori A., Moravec C.S., Seidman J.G., et al. (1995) Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 332; 1058-1064
- Wattanapermpool** J., Guo X., Solaro R.J. (1995) The unique amino-terminal peptide of cardiac troponin I regulates myofibrillar activity only when it is phosphorylated. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27; 1383-1391
- Weber** K.T. (1997) Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for the de novo angiotensin II generation. *Circulation* 96: 4065-4082
- Weber** K.T., Brilla C.G., Janicki J.S. (1993) Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors. *Cardiovasc. Res.* 27; 341-348
- Westfall** M.V., Borton A.R., Albayya F.P., Metzger J.M. (2002) Myofilament calcium sensitivity and cardiac disease: insights from troponin I isoforms and mutants. *Circ. Res.* 20: 91(6); 525-31
- Wilkinson** J.M., Grand R.J.A. (1978) Comparison of amino acid sequence of troponin I from different striated muscles. *Nature* 271; 31-35
- Wolff** M.R., Buck S.H., Stoker S.W. et al. (1996) Myofibrillar calcium sensitivity of isometric tension is increased in human dilated cardiomyopathies. *J. Clin. Invest.* 98; 167-176
- Xu** G.Q., Hitchcock-DeGregori S.E. (1988) Synthesis of a troponin C cDNA and expression of wild-type and mutant proteins in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 25: 263(27); 13962-9.
- Zhang** R., Zhao J., Potter J.D. (1995) Phosphorylation of both serine residues in cardiac troponin I is required to decrease the Ca^{2+} affinity of cardiac troponin C. *J. Biol. Chem.* 270; 30773-30780

VII Zusammenfassung

In der hier vorgestellten Arbeit wurde eine Methode etabliert bei der exogener, humaner Troponinkomplex in isolierte kardiale Myofibrillen der Maus inkorporiert wurde, was zur nahezu vollständigen Verdrängung der endogenen Isoformen führte. An diesen Myofibrillen wurde die Kinetik der Kontraktion und der Relaxation untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die rekombinanten humanen Troponinisoformentypen in Myofibrillen der Maus keinen Einfluss auf die Kraftentwicklung und die kinetischen Parameter k_{ACT} , k_{LIN} und k_{REL} haben.

Das Einfügen der FHC-assoziierten Mutation R145G des hcTnI in isolierte kardiale Myofibrillen der Maus verursacht gegenteilige Effekte. Zum einen führt die Mutation zu erhöhter passiver Kraftentwicklung (F_{pass}/CSA), und zum anderen zu einer verringerten und verlangsamten Ca^{2+} -induzierten Kraftentwicklung. Zudem führt die Mutation R145G zu einem verlangsamten exponentiellen Kraftabfall. Die Daten lassen vermuten, dass die Mutation R145G zu einer unvollständigen Inhibition der Aktomyosin-Interaktion führt. Gleichzeitig scheint jedoch auch die Ca^{2+} -induzierte Freigabe der Myosinbindestelle beeinträchtigt zu sein, was eine mögliche Erklärung für die beobachtete Verlangsamung der Kontraktion (gegeben durch vergrößerte Werte für k_{ACT}) und die verringerte Kraftentwicklung geben könnte.

Die hcTnI Mutation G203S dagegen zeigt unter den angewandten Versuchsbedingungen keinen Einfluss auf die kontraktile Eigenschaften der behandelten Myofibrillen.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass sich das vorgestellte Modell der isolierten Myofibrillenbündel auch zur Untersuchung humaner pathologischer Herzproben eignet. Klinische Studien belegen, dass terminale ICM und DCM in starker kontraktile Dysfunktion resultieren, an deren Ausprägung möglicherweise die Querbrückenkinetik direkt beteiligt ist. Die hier durchgeführten Untersuchungen der Aktivierungs- und Relaxationskinetik in ICM- bzw. DCM- Herzen demonstrieren, dass verglichen mit nicht-pathologischen Spenderherzen weder die passive Kraft pro Querschnitt (F_{pass}/CSA) noch die maximale Ca^{2+} -induzierte Kraftentwicklung (F_{max}/CSA) der Myofibrillen maßgeblich verändert ist. In Myofibrillen aus ICM-

Herzen ist jedoch die Ratenkonstante der Ca^{2+} -induzierten Kraftentwicklung (k_{ACT}) signifikant erhöht.

Durch die hier angewandte Messtechnik konnte festgestellt werden, dass die myofibrilläre Relaxationskinetik insuffizienter Herzproben generell verlangsamt ist. Bei Proben aus ICM Herzen zeigt sich dieser Effekt in einer deutlich verringerten Ratenkonstante k_{REL} der exponentiellen Relaxationsphase, in DCM Herzen dagegen in einer Verlängerung der initialen linearen Phase der Relaxation. Durch die hier vorgestellte Studie kann somit gezeigt werden, dass DCM und ICM direkte Effekte auf die Querbrückenkinetik isolierter Myofibrillen hat.

Sowohl in Myofibrillen aus ICM und DCM-Herzen als auch im FHC-Modell hcTnI R145G ausgetauschter Myofibrillen wurden signifikante Effekte auf den biphasischen Kraftabfall gefunden. Diese Gemeinsamkeit legt die Vermutung nahe, dass es sich bei der beobachteten verlangsamt Relaxation der Myofilamente um ein charakteristisches Motiv des Krankheitsbildes einer Kardiomyopathie handeln könnte.

VIII Summary

We investigated the consequences of the human cardiac troponin I (hcTnI) mutations R145G and G203S related to familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC) on cross-bridge kinetics. The 3 recombinant hcTn subunits were purified, reconstituted to the functional Tn complex and incorporated into subcellular myofibrillar bundles prepared from mouse papillary muscle whereby the endogenous Tn complex was replaced. Myofibrils reconstituted with hcTnI R145G showed increased Ca^{2+} -sensitivity and reduced maximum force per cross-sectional area ($F_{\text{max}}/\text{CSA}$) compared to those reconstituted with wild-type hcTnI (WT). The rate constants of Ca^{2+} -induced force development (k_{ACT}) and of the rapid exponential phase of relaxation induced by sudden Ca^{2+} -removal (k_{REL}) were both significantly reduced in hcTnI R145G reconstituted myofibrils compared to WT. In contrast, myofibrils containing hcTnI G203S did not show significant alterations in Ca^{2+} -sensitivity, $F_{\text{max}}/\text{CSA}$, k_{ACT} and k_{REL} . Our data provide first evidence that FHC associated mutations of hcTnI can cause primary effects on sarcomeric function by altering the kinetics of a myofibrillar contraction-relaxation cycle, the effect depending on the individual mutation

Clinical studies have shown, that endstage ischemic cardiomyopathy (ICM) and dilated cardiomyopathy (DCM) both lead to severe contractile dysfunctions to which, as reported here, altered crossbridge kinetics may contribute. Ca^{2+} -induced force development in isolated myofibrils (MF) from ICM hearts, but not from DCM hearts is significantly increased compared to those from non-failing (NF) donor hearts. Furthermore the biphasic relaxation upon rapid Ca^{2+} -removal is altered. The initial linear phase (t_{LIN}) is significantly prolonged in DCM hearts whereas the subsequent exponential phase (k_{REL}) remains unaltered. Interestingly, ICM hearts developed no changes in the initial slow phase, but a severely impaired exponential relaxation. The present study demonstrates, that DCM and ICM directly affect the kinetics of force decay in isolated myofilaments.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. G. Pfitzer für die Bereitstellung der interessanten wissenschaftlichen Aufgabenstellung. Durch ihre kompetente und freundliche Betreuung sowie ihre Unterstützung auch „außenpolitisch“, ist diese Arbeit erst möglich geworden.

Prof. Dr. H. W. Klein danke ich für sein Interesse an dieser Arbeit und für seine freundliche Bereitschaft, für diese Dissertation als Zweitgutachter zu wirken.

Weiter möchte ich Dr. R. Stehle für die geduldige Einführung in die Theorie und Technik der myofibrillären Kraftmessungen danken. Ohne seine kompetente und freundschaftliche Unterstützung, nicht nur bei der Interpretation der untersuchten myofibrillären Kinetik, wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.

Dr. C. Redwood, University of Oxford, danke ich für die großzügige Bereitstellung der Plasmide des hcTnI und den FHC-assoziierten hcTnI Mutanten.

Dr. I. P. Trayer, University of Birmingham, danke ich für die freundliche Bereitstellung der Plasmide des hcTnC und hcTnT.

PD Dr. R. H. G. Schwinger und Frau DR. K. Brixius, Institut für Innere Medizin III, sowie Dr. U. Mehlhorn, Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie, möchte ich für die freundliche Bereitstellung der Proben aus humanen Spenderherzen danken.

Allen meinen derzeitigen und inzwischen auch ehemaligen Kollegen am Institut möchte ich für die freundschaftliche Integration in die Arbeitsgruppe und das ausgesprochen angenehme Arbeitsklima danken.

Frau Dr. V. Hasse möchte ich für die Einführung in einige molekularbiologische Grundmethoden und für die ausgesprochen anregende und aufheiternde Büro-Nachbarschaft danken. S. Zittrich gilt mein ganz besonderer Dank dafür, dass er mit

viel Engagement und Erfolg im letzten Jahr die Expression und Reinigung der Troponinuntereinheiten übernommen hat.

Frau B. Daub möchte ich nicht nur für die anregende und interessante Zusammenarbeit, sondern darüber hinaus auch für ihren freundschaftlichen Beistand außerhalb des Instituts danken.

Ganz besonders möchte ich Frau Dr. A. Wirth für viele interessante wissenschaftliche Diskussionen und eine ganz besonders gute Zeit sowohl innerhalb als auch außerhalb des Instituts danken.

Frau L. Glahe danke ich für ihre stets freundliche Hilfsbereitschaft bei verschiedensten Problemen, den Mitarbeitern des Tierstalls für die hervorragende Pflege und Anzucht der Tiere, sowie der Elektronik- und Feinmechanikwerkstatt des Instituts für Vegetative Physiologie sei für die kompetente Hilfe in technischen Angelegenheiten gedankt.

Für die kritische Durchsicht der vorliegenden Arbeit möchte ich Frau Dr. A. Wirth, Frau Dr. V. Hasse sowie Dr. M. Reppel danken.

Meinem Freund Philipp möchte ich für seine fachliche Diskussionsbereitschaft und seine stets geduldige Freundschaft danken. Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, deren vertrauensvolle Unterstützung mir zu jeder Zeit eine große Hilfe war und ist.

Erklärung

„Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. G. Pfitzer betreut worden.“

Teilpublikationen:

R. Stehle, M. Krüger, K. Brixius, R. H. G. Schwinger, G. Pfitzer (2002) “Isometric force kinetics upon rapid activation and relaxation of mammalian and human heart muscle studied on the subcellular myofibrillar level.” *Basic Res Cardiol.* 97; *Suppl.1*, I/127-I/135

M. Krüger, G. Pfitzer, R. Stehle (2003) “Expression and purification of human cardiac troponin subunits and their functional incorporation into isolated cardiac mouse myofibrils.” *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*; 786(1-2); 287-96

In Vorbereitung:

M. Krüger, S. Zittrich, G. Pfitzer, R. Stehle
“Effect of FHC mutants hcTnI R145G and G203S on force kinetics in myofibrils.”

M. Krüger, K. Brixius, R.H.G. Schwinger, U.Mehlhorn, G. Pfitzer, R. Stehle
“Altered crossbridge kinetics in isolated myofibrillar bundles from endstage failing hearts.”

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Krüger
Vorname Martina
Straße Münstereifelerstr.23
PLZ/Ort 50937 Köln
Telefon 0221-9231046
E-Mail martina.krueger@uni-koeln.de
Geburtsdatum/-ort 08.06.1974 in Freiburg i. Br.

Schulischer Werdegang

1980 – 1984 Höchstener Grundschule, Dortmund
1984 – 1986 Phoenix Gymnasium Dortmund
1986 – 1993 Landgraf-Ludwig-Schule Giessen

Hochschul-Werdegang

1993 - 1999 Diplom-Studiengang Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Vordiplomprüfung **SS 1995**

Diplomprüfung **SS 1998**
[Pflanzenphysiologie (HF), Biochemie (NF), Geobotanik (NF), Landespflege (NF)]

Diplomarbeit „Reinigung und Charakterisierung dreier Peptidasen aus Chloroplasten von *Hordeum vulgare*“
Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Betreuer: Prof. Dr. E. Wagner, Albert-Ludwig-Universität Freiburg
Vorgelegt **April 1999**

Doktorarbeit Seit **September 1999** Doktorarbeit am Institut für Vegetative Physiologie der Universität zu Köln mit dem Thema „*Effekte von Herzinsuffizienz und Kardiomyopathie-assoziiierter Mutationen des Troponin I auf die Kontraktions- und Relaxationskinetik isolierter Kardiomyofibrillen*“.
Betreuung durch Frau Prof. Dr. G. Pfitzer.

09/1999 bis 03/2002 Förderung durch ein Stipendium des Graduiertenkollegs „Molekularbiologische Grundlagen pathophysiologischer Vorgänge“
Seit **04/2002** Anstellung über SFB 612 „Molekulare Analyse kardiovaskulärer Funktionen und Funktionsstörungen“

Voraussichtlicher Abschluss: **September 2003**