

Funktionelle und strukturelle Konsequenzen eines C-terminal verkürzten Myosinbindungsprotein C in transfizierten Kardiozyten

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Yvonne Mücke
aus Bad Nauheim

Frankfurt 2002
(DF1)

vom Fachbereich Biologie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Heinz D. Osiewacz

Gutachter: Prof. Dr. Bereiter-Hahn

Gutachter: Prof. Dr. Vosberg

Datum der Disputation: 16.04.2003

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung, Abteilung für experimentelle Kardiologie, in Bad Nauheim angefertigt. Herrn Prof. Wolfgang Schaper danke ich für die Aufnahme in das Institut und für die Möglichkeit an der Konferenz „American Heart Scientific Sessions 2001“ teilnehmen zu können.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Hans-Peter Vosberg, gilt mein ganz besonderer Dank für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die interessante Themenstellung und für seine Diskussionsbereitschaft. Für sein Verständnis gegenüber Verzögerungen, die bei einer „Promotion mit Nachwuchs“ auftreten, bin ich ebenfalls sehr dankbar.

Herrn Prof. Bereiter-Hahn danke ich für seine Bereitschaft, die Arbeit im Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt zu betreuen und als Korreferent zur Verfügung zu stehen.

Dr. Veronika Person danke ich sehr herzlich für die Unterstützung bei der Durchführung der immunzytochemischen Versuche. In diesem Zusammenhang möchte ich mich bei Frau Prof. Jutta Schaper für die Bereitstellung der notwendigen Materialien und für die Nutzung des konfokalen Mikroskops bedanken.

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt meiner Arbeitskollegin Dipl. Ing. Kerstin Troidl, mit deren freundschaftlicher Hilfe und Tatkraft ich immer rechnen konnte.

Ein ebenso herzliches Dankeschön geht an meinen Kollegen Dr. Stephan Waldmüller, der durch viele Anregungen, unermüdete Diskussionen und durch seine Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein besonderer Dank gilt meinen Arbeitskollegen Dipl. Ing. Daniela Amann, Petra Freund, Dr. Maria Golubenko, Dr. Brigitte Jeschke, Dr. Johan Moolman, Dipl. Ing. Nannette Rink, Simone Roth, Dr. Sadayapan Sakthivel, Dirk Schröder, Carmen Selignow, Dr. Gil-Jin Shim, Dr. Christian Troidl und Dr. Katja Unkelbach für die außerordentlich freundschaftliche und angenehme Arbeitsatmosphäre, für viele anregende Gespräche, für die vielen kleinen Hilfen bei der täglichen Arbeit und für die netten, gemeinsamen Stunden außerhalb des Labors. Meiner Studienkollegin Dr. Maysa Azzeh sei ebenfalls Dank gesagt für die langjährige Freundschaft und die aufmunternden Gespräche.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, besonders meiner Mutter, für ihr Verständnis und ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	7
I Einleitung	9
1 Hypertrophe Kardiomyopathie.....	9
1.1 Klinische Aspekte der HCM	9
1.2 Klinische Genetik und Epidemiologie	10
1.3 Genetische Ursachen der HCM - Mutationen in Genen sarkomerer Proteine	11
1.4 Funktionelle Konsequenzen und pathogene Mechanismen	12
1.5 Entstehung des klinischen Phänotyps	14
2 Myosinbindungsprotein C (MyBP-C).....	15
2.1 Strukturelle Eigenschaften des MyBP-C.....	15
2.2 Genomische Organisation des humanen kardialen MYBPC3	17
2.3 Funktionen des Myosinbindungsprotein C	17
2.4 Nonsense-Mutationen im kardialen MyBP-C und hypertrophe Kardiomyopathie	19
2.5 Fragestellung	20
II Material und Methoden	22
1 Material	22
1.1 Bakterienstämme	22
1.2 Versuchstiere	22
1.3 Primäre Zellen und Zelllinien.....	22
1.3.1 Neonatale Kardiocyten aus Ratten	22
1.3.2 COS-1 Zelllinie	23
1.4 Plasmide	24
1.5 MyBP-C cDNA und genomische Sequenz	25
1.6 Oligonukleotide.....	25
1.7. Chemikalien und Enzyme	26
1.8 Puffer und Lösungen	27
1.8.1 Puffer für Zellkultur	27
1.8.2 Puffer und Lösungen für Immunzytochemie	27
1.8.3 Puffer für molekularbiologische Standardmethoden.....	27
1.9 Nährmedien für Bakterien.....	28
1.10 Nährmedien und Lösungen für Zellkultur.....	28
1.11 Objektträger für die Zellkultur	29
1.12 Antikörper	29
1.12.1 Antikörper Western Blot	29
1.12.2 Antikörper Immunzytochemie	30
1.13 Mikroskope.....	31
1.14 Bildverarbeitung.....	31
2 Methoden.....	32
2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	32
2.1.1 Maxipräparation von Plasmid-DNA	32
2.1.2 Schnelle Plasmidisolierung aus Minilysaten.....	32
2.2 Enzymatische Reaktionen an DNA.....	33
2.2.1 Restriktion von DNA	33
2.2.2 Partielle Restriktion von DNA	33
2.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten	34
2.2.4 Dephosphorylierung von DNA	34

2.2.5	Polymerase-Ketten-Reaktion	35
2.3	Aufreinigung von DNA-Molekülen	35
2.3.1	Phenol/Chloroform Extraktion	35
2.3.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	36
2.3.3	Aufreinigung von amplifizierten DNA-Molekülen	36
2.4	Aufzucht und Aufbewahrung von Bakterienstämmen	37
2.5	Transformationstechniken	37
2.5.1	Transformation von Bakterien durch Elektroporation	37
2.5.2	Transformation von Bakterien nach der "heat shock" Methode	38
2.6	TOPO [®] -Klonierung	38
2.7	Gelelektrophorese	39
2.7.1	Agarose-Gelelektrophorese	39
2.7.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	40
2.7.3	Agarose/Formaldehyd-Gelelektrophorese	40
2.8	Sequenzierung von DNA	40
2.9	Herstellung doppelsträngiger Oligonukleotide	41
2.10	Isolierung, Aufzucht und Aufbewahrung von eukaryotischen Zellen	41
2.10.1	Kultivierung primärer Zellen und Zelllinien	41
2.10.2	Isolierung neonataler Kardiomyozyten aus Ratten	42
2.10.3	Fibronektinbeschichtung	43
2.10.4	Passagieren von COS-1 Zellen	43
2.10.5	Einfrieren, Lagerung und Auftauen von COS-1 Zellen	43
2.10.6	Bestimmung der Zellzahl	44
2.11	Transfektion von eukaryotischen Zellen	44
2.11.1	Transfektion von COS-1 Zellen mit Polyethylenimin (PEI)	44
2.11.2	Transfektion neonataler Kardiomyozyten mit Lipofektin	45
2.12	β -Galaktosidase Reporter-gen-Nachweis	46
2.13	Proteinbiochemische Methoden	47
2.13.1	Proteinbestimmung im Zelllysate nach Bradford	47
2.13.2	Eindimensionale denaturierende SDS-Gelelektrophorese von Proteinen	48
2.13.3	Protein-Transfer (Western Blot)	49
2.13.4	Antikörpernachweis immobilisierter Proteine	50
2.14	RT-PCR	51
2.15	in vitro Transkription	52
2.16	in vitro Transkription/Translation	53
2.17	Nachweis biotin-markierter DNA auf Nylonmembranen	54
2.18	Immunzytochemie	54
2.18.1	Färbeprotokoll für die immunzytochemische Färbung von Gewebeschnitten eines Kontroll-Herzgewebes	55
2.18.2	Färbeprotokoll für die immunzytochemische Färbung von transfizierten neonatalen Kardiomyozyten	56
2.19	Konfokale Lasermikroskopie und Bildverarbeitung	57
2.20	Densitometrie	58
2.21	Statistik	58
III	Ergebnisse	59
1	Klinische und genetische Analyse einer Familie mit hypertropher Kardiomyopathie	59
1.1	Klinische Charakterisierung der Familie EA	60
1.2	Nachweis einer Mutation in genomischer DNA und cDNA des MyBP-C Gens	60

1.3	Analyse der MyBP-C Expression in Myektomiegewebe.....	63
2	Nachweis des vorzeitigen Stop-Codons in der mRNA des Patienten zum Ausschluß einer RNA-Editon	63
3	Semiquantitative RT-PCR Analyse der mRNA aus betroffenem Herzgewebe	65
4	Klonierung von Wildtyp und mutierter MyBP-C cDNA	67
4.1	Herstellung der Wildtyp MyBP-C cDNA	69
4.2	Herstellung der mutierten cDNA MTI.....	70
4.3	Herstellung der mutierten cDNA MTII.....	70
4.4	Einführung eines c-myc Epitops	72
5	Überprüfung der klonierten MyBP-C cDNAs durch <i>in vitro</i> Transkription/ Translation.....	75
5.1	Analyse der Transkriptgrößen in vitro synthetisierter MyBP-C mRNAs	75
5.2	<i>in vitro</i> Synthese verkürzter MyBP-Cs	76
6	Transiente Expression von MyBP-C in COS-1 Zellen	77
6.1	Western Blot Analyse transient transfizierter COS-1 Zellen.....	77
6.2	Densitometrische Ermittlung der „steady state“ Expression von MTI und MTII in COS-1 Zellen	79
7	Transiente Expression von MyBP-C in neonatalen Kardiozyten.....	81
7.1	Optimierung der Transfektionseffizienz neonataler Kardiozyten.....	82
7.2	Western Blot Analyse transient transfizierter neonataler Kardiozyten.....	84
7.3	Akkumulation humaner MyBP-Cs in transient transfizierten neonatalen Kardiozyten	85
7.4	Lokalisierung der humanen MyBP-Cs in kardialen Sarkomeren/Zellen	87
8	Untersuchung von Sequenzelemente die mutmaßlich die Expression von mRNA mit unplanmäßigem Nonsense-Codon beeinträchtigen.....	95
8.1	Herstellung der MTImyc-DSE cDNA-Konstrukte	96
8.2	Densitometrische Analyse der „steady state“ Expression der MTImyc-DSE cDNA-Konstrukte in neonatalen Kardiozyten	97
IV	Diskussion	100
1	Nachweis des vorzeitigen Stop-Codons in der myokardialen mRNA	101
2	Reduzierte Transkriptmengen deuten auf eine Suppression von Nonsense-mRNA hin	102
3	Expressionsanalysen mutierter MyBP-C cDNA	103
3.1	Expression mutierter MyBP-C cDNAs in COS-1 Zellen und in neonatalen Kardiozyten	104
3.2	Einfluß von „downstream“ Sequenzen auf die Expression von MTI	106
4	Inkorporation von rekombinanten MyBP-C Produkten in Sarkomerstrukturen ...	107
5	Haploinsuffizienz oder dominant-negative Wirkung? Die Bedeutung dieser Ergebnisse für ein Verständnis der Krankheit.....	109
V	Zusammenfassung.....	111
	Literaturverzeichnis.....	113
	Anhang	125
	Lebenslauf	128

Abkürzungen

Ω	Ohm
μF	Mikro-Farad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
aa	Aminosäure, engl.: amino acid
A	Adenin
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserum-Albumin (Bovine Serum Albumin)
C	Cytosin
Ca^{2+}	Calcium-Ionen
cDNA	komplementäre DNA, engl.: complementary DNA
CIAP	Alkalische Phosphatase, engl.: calf intestine alkaline phosphatase
CMV	Cytomegalo Virus
COS	Abkürzung für CV1 Origin SV40
$\text{Cy}^{\text{TM}}5$	Indodicarbocyanin (Cy-5) phospharamidit
D	Ein-Buchstaben-Code für die Aminosäure Asparaginsäure
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxy-Nucleosid-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nucleosid-5'-Triphosphat
DSE	engl.: downstream sequence element
EDTA	Ethylendinitrotetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FKS	fötales Kälberserum
g	Zentrifugalbeschleunigung
G	Guanin
G-418	Geneticin
h	Stunde
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie, engl.: hypertrophic cardiomyopathy
IgC2	Immunglobulin C2
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyrenosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kD	Kilo-Dalton
kV	Kilo-Volt
LacZ	Gen, das für das Enzym β -Galaktosidase kodiert
LB	Luria-Bertani
M	Molar
mA	Milli-Ampere
mg	Milligramm
min	Minute

mM	Millimolar
MOPS	3-N (Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
ms	Millisekunde
MTI	Mutante I
MTII	Mutante II
MW	Molekulargewicht, engl.: molecular weight
MyBP-C	Myosinbindungsprotein C
MYBPC3	Bezeichnung für das humane, kardiale MyBP-C Gen
MYH7	Bezeichnung für das Gen, das für die humane, kardiale α -Isoform der schweren Kette des Myosins kodiert
N	Ein-Buchstaben-Code für die Aminosäure Asparagin
ng	Nanogramm
NKS	neonatales Kälberserum
nm	Nanometer
NMD	engl.: nonsense mediated decay
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Kettenreaktion, engl.: polymerase chain reaction
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Q	Ein-Buchstaben-Code für die Aminosäure Glutamin
R	Ein-Buchstaben-Code für die Aminosäure Arginin
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl.: rotations per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR mit vorangegangener PCR
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	engl.: simian virus 40
T	Thymin
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TPM1	Bezeichnung für das humane, kardiale Tropomyosin Gen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	engl.: unit, Enzymeinheit
V	Volt
W	Watt
WHO	engl.: world health organization
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-indoxy- β -D-galaktosid

I Einleitung

1 Hypertrophe Kardiomyopathie

Die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM = hypertrophic cardiomyopathy) ist eine autosomal-dominant erbliche Erkrankung des Myokards. Kardiomyopathien wurden als „primäre Herzmuskelkrankheiten“ mit unbekannter Ursache definiert, die zu einer Beeinträchtigung der systolischen und/oder diastolischen Funktion der Herzkammern führen (Goodwin und Oakley, 1972). Nach einer aktualisierten Klassifikation der WHO werden vier verschiedene Formen unterschieden: die hypertrophe, die dilatative, die restriktive und die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (Richardson et al., 1996). Die HCM ist klinisch variabel und genetisch heterogen. Ihre Ursachen sind nach heutiger Kenntnis auf Fehlfunktionen des kontraktilen Apparates der Kardiocyten zurückzuführen.

1.1 Klinische Aspekte der HCM

Eine Erstmanifestation der HCM tritt bevorzugt am Ende des 2. Lebensjahrzehnt oder später auf, selten im Kindesalter (Maron et al., 1987 a, b; McKenna, 1996). Die Krankheitszeichen sind in der Regel mild bis moderat und unspezifisch. Berichtet wird über Schmerzen in der Brust, Atemnot bei Belastung, kurze Bewußtlosigkeit und „Herzrasen“. Typisch für die Krankheit ist außerdem ein variables Spektrum an Verläufen, Schweregraden und auftretenden Komplikationen. Manche Fälle verlaufen mild, gelegentlich asymptomatisch, andere verlaufen maligne und können zu schwerer Herzinsuffizienz führen. Häufig wird jedoch eine langsame Progression der Krankheit beobachtet. Das größte Risiko der HCM ist der plötzliche Herztod, als Folge von ventrikulären Arrhythmien und Kammerflimmern (Maron et al., 1987 a, b; Richardson et al., 1996). Dieses Ereignis kann auch bei der Abwesenheit HCM-typischer Symptome vorkommen (Maron et al., 1980).

Die klinische Diagnose stützt sich auf Hinweise, die durch Echo- und Elektrokardiographie erhalten werden (McKenna et al., 1996). Nicht-myokardiale Grundkrankheiten (z.B. Hypertonie, koronare Herzkrankheiten etc.) sind auszuschließen. Die zweidimensionale Echokardiographie läßt das Ausmaß und die Verteilung der Hypertrophie des Herzens erkennen. Veränderungen im EKG werden ebenfalls beobachtet. Hierzu zählen u.a.

Vorhofflimmern, verkürzte Vorhof-Kammer-Überleitungen, Erregungsrückbildungsstörungen und Kammertachykardien (McKenna und Camm, 1989).

Morphologisch betrachtet ist die HCM in der Regel durch eine linksventrikuläre Hypertrophie charakterisiert, gelegentlich ist der rechte Ventrikel betroffen. Die Hypertrophie ist asymmetrisch und schließt das interventrikuläre Septum mit ein (Maron et al., 1987 a, b). Die Zunahme der Ventrikelmuskulatur, die auf vergrößerte Myozyten zurückzuführen ist, kann gelegentlich auch den Apex des Herzens betreffen (Wigle et al., 1985). Je nach Lokalisierung der Verdickung kann das Kammervolumen reduziert sein. In etwa 20% der Fälle wird eine Obstruktion der Ausflussbahn beobachtet (Maron et al., 1987 a, b). Histopathologisches Kennzeichen der HCM ist der Verlust der regelmäßigen und parallelen Anordnung der Kardiozyten im Myokard (myocyte disarray) (Davies, 1984), bedingt durch das hypertrophe Wachstum der Zellen. Die normalen Kontakte zwischen den Zellen (gap junctions) gehen verloren und führen zu einer Desorientierung angrenzender Zellbereiche. Ein Strukturverlust zeigt sich auch innerhalb der Zellen an den unregelmäßig verlaufenden Myofilamenten (Ferrans et al., 1972). Eine weitere morphologische Veränderung ist die Zunahme des interstitiellen Bindegewebes (Fibrosierung), die ebenfalls die Funktion des Myokards beeinträchtigt. Das sog. „myocyte disarray“ kann auf bestimmte Regionen begrenzt oder über den ganzen Ventrikel verteilt sein.

Trotz der gestörten ventrikulären Morphologie und Histopathologie ist die kontraktile (systolische) Leistung des Herzens zumindest in der Frühphase der Krankheit nicht beeinträchtigt, während die Relaxation (Diastole) bereits funktionelle Defizite aufweisen kann.

1.2 Klinische Genetik und Epidemiologie

Die HCM wurde weltweit nachgewiesen. Es liegen bisher jedoch nur wenig zuverlässige epidemiologische Daten vor. Bei der Auswertung von echokardiographischen Daten, die in einer Population von über 4.000 jungen, gesunden Erwachsenen erhalten wurde, ergab sich für das Auftreten einer unerklärten Zunahme der Herzmuskulatur (Hypertrophie) eine Häufigkeit von ca. 1:500 in der US-amerikanischen Bevölkerung (Maron et al., 1995). Die HCM ist eine weit überwiegend familiär gehäuft auftretende, dominante Erkrankung des Herzmuskels (Vosberg, 1998). Gelegentlich ist der familiäre Charakter wegen unter-

schiedlicher Ausprägung der Symptome nicht zu erkennen. Darüber hinaus gibt es selten sporadische Fälle, bei denen keine familiäre Vorbelastung vorliegt. Solche Fälle sind vermutlich auf *de novo* Mutationen zurückzuführen (Greve et al., 1994; Jeschke et al., 1998; Watkins et al., 1992). Bisher wurde nur sehr selten über autosomal-rezessive Erbgänge berichtet (Nishi et al., 1995, Olson et al., 2002).

Die Penetranz, d.h. die Tendenz zur Ausprägung typischer Symptome, ist bei der HCM im allgemeinen altersabhängig und nicht selten unvollständig. Welche Umweltfaktoren oder welche genetischen Polymorphismen neben den hauptverantwortlichen Mutationen auf den Phänotyp einwirken, ist nicht bekannt.

1.3 Genetische Ursachen der HCM - Mutationen in Genen sarkomerer Proteine

Die erste genetische Ursache wurde 1990 im Gen für die schwere Kette des β -Myosins auf Chromosom 14 identifiziert (Geisterfer-Lowrance et al., 1990). Nachgewiesen wurde diese Missense-Mutation durch eine Kombination aus Kopplungs- und Kandidatengenanalyse. Es handelte sich um einen Arginin-Glutamin-Austausch in Position 403 der globulären Kopfdomäne des β -Myosins. Dieser Austausch liegt in einer Subregion, die bei der Kontraktion an der zyklisch reversiblen Interaktion mit Aktin („cross bridge cycling“) beteiligt ist. Seit dieser Erstbeschreibung sind 12 weitere HCM-assoziierte Genloci auf 11 Chromosomen identifiziert worden (s. Tabelle 1). Zwölf der beteiligten Gene kodieren für Proteine, die am Mechanismus oder an der Kontrolle der kardialen Myofilamente beteiligt sind. Das Gen für die γ -Untereinheit der AMP-abhängigen Proteinkinase (AMPK) auf Chromosom 7 ist zusätzlich mit Wolff-Parkinson-White Syndrom assoziiert. Dieses Protein ist an der Regulierung des ATP-Haushaltes beteiligt und schützt Zellen und Gewebe (u.a. das Myokard) vor Energieverlust (Blair et al., 2001).

Bisher wurden ca. 150 auf HCM bezogene Mutationen beschrieben. Diese sind jedoch nicht gleichmäßig auf die bekannten Gene verteilt. In den Genen für die schwere Kette des β -Myosins, für das kardiale Myosinbindungsprotein C und für das kardiale Troponin T werden häufig Veränderungen beobachtet (s. Tabelle 1). Das Spektrum der Mutationen ist heterogen. Missense-Mutationen überwiegen, aber Deletionen, Insertionen und Nonsense-Mutationen wurden ebenfalls nachgewiesen. Zusätzlich wurden vor allem im Gen für das

kardiale MyBP-C Mutationen identifiziert, die zu aberrantem Spleißen der mRNA und zu einem vorzeitigen Kettenabbruch bei der Proteinsynthese führen.

Tab. 1: Gene, in denen HCM-assoziierte Mutationen nachgewiesen wurden.

Gen	Chromosom	Protein	Häufigkeit von Mutationen (%)	Erstbeschreiber
MYH7	14	schwere Kette des β -Myosins	35	Geisterfer-Lowrance et al., 1990
MYH6	14	schwere Kette des α -Myosins	< 5	Niimura et al., 2002
TNNT2	1	kardiales Troponin T	10-20	Thierfelder et al., 1994
TNNC1	3	kardiales Troponin C	< 5	Hoffmann et al., 2001
TPM1	15	α -Tropomyosin	< 5	Thierfelder et al., 1994
MYBPC3	11	kardiales Myosinbindungsprotein C	20-30	Watkins et al., 1995 Bonne et al., 1995
MYL3	3	essentielle ventrikuläre leichte Kette des Myosins	< 5	Poetter et al., 1996
MYL2	12	regulatorische ventrikuläre leichte Kette des Myosins	< 5	Poetter et al., 1996
MYLK2	20	Kinase assoziiert mit den leichten Ketten des Myosins	< 5	Davis et al., 2002
TNNI3	19	kardiales Troponin I	< 5	Kimura et al., 1997
ACTC	15	α -Aktin	< 5	Mogensen et al., 1999
TTN	2	Titin	< 5	Satoh et al., 1999
PRKAG2	7	AMP-aktivierte Proteinkinase	< 5	Blair et al., 2001 Gollob et al., 2001

Trotz der bisher durchgeführten HCM-Mutationsanalysen kommt es nicht selten vor, daß bei manchen Patienten in den bereits bekannten HCM-Kandidatengenomen keine Mutationen gefunden werden. Dieser Befund läßt vermuten, daß außer den Genen, die für die sarkomeren Proteine kodieren, andere Gene eine Rolle spielen, deren Produkte nicht unmittelbar an der Kontraktion beteiligt sind.

1.4 Funktionelle Konsequenzen und pathogene Mechanismen

Die pathogenen Mechanismen der HCM sind bisher nicht vollständig verstanden. Mit Ausnahme der in jüngster Vergangenheit identifizierten AMP-abhängigen Proteinkinase sind alle krankheitsrelevanten Proteine Bestandteile des Sarkomers (Abbildung 1). Im Sarkomer, dem Bereich zwischen zwei Z-Scheiben, bilden die dicken und die dünnen Filamente den eigentlichen kontraktilem Apparat. Die dicken Filamente werden u.a. durch die schwere Kette des Myosins, die essentiellen und regulatorischen leichten Ketten des Myosins sowie durch MyBP-C gebildet. Die dünnen Filamente setzen sich u.a. aus α -Tropomyosin, dem Troponin-

Komplex und Aktin zusammen. Titin bildet das 3. Filamentsystem und verbindet die dicken und die dünnen Filamente miteinander.

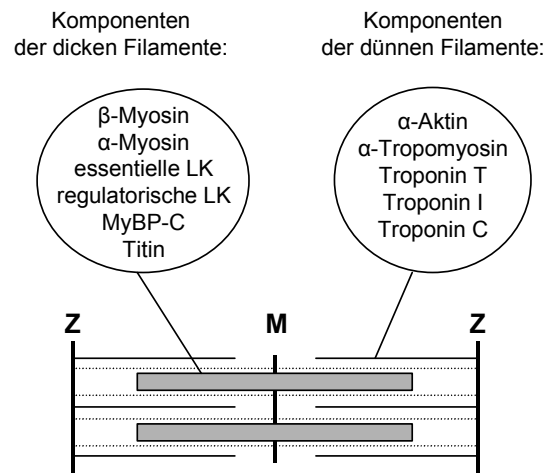


Abbildung 1: HCM-assoziierte Genprodukte sind Bestandteile der dicken und dünnen Filamente des Sarkomers. Schematische Darstellung der Komponenten eines Sarkomers. Die dicken und die dünnen Filamente sind zwischen zwei Z-Scheiben (Z) ausgespannt. M, M-Linie; LK, leichte Kette des Myosins. Die gestrichelten Linien markieren Titin-Moleküle, die sich von der M-Linie zu den Z-Scheiben erstrecken.

Bei der Kontraktion gleiten die Myosine der dicken Filamente in einer Folge von Ca^{2+} - und ATP-abhängigen Assoziations-Dissoziationszyklen an den Aktinfilamenten entlang. Die globulären Kopfdomänen der asymmetrisch konfigurierten, filamentösen schweren Ketten bilden dabei den zentralen Motor der Kontraktion. Neben der Aktinbindungsstelle enthalten die Kopfdomänen die aktiven Zentren für die ATP-Hydrolyse. Die an die schweren Ketten gebundenen leichten Myosine stabilisieren den Übergang vom Myosinkopf zum filamentösen Myosinschwanz. MyBP-C beeinflusst sowohl die Funktion des Myosins als auch die Stabilität der dicken Filamente (s. dazu auch Einleitung Kap. 2.3).

Die genannten Proteine des Sarkomers bilden komplexe, multimere Strukturen, die sowohl untereinander in Wechselwirkung treten als auch von externen Komponenten gesteuert werden. Für die pathogenen Mechanismen, die auf dominante Veränderungen in sarkomeren Proteinen zurückzuführen sind, werden zwei Wirkungsmechanismen diskutiert:

1. Ein „dominant-negativer“ Effekt stellt sich ein, wenn ein Multiproteinkomplex neben den nativen auch mutierte, dysfunktionale Proteine enthält. Die Anwesenheit der mutierten Proteine, die auch als „poison polypeptides“ bezeichnet werden, kann Fehlfunktionen des gesamten Komplexes veranlassen.
2. Ein alternatives Konzept ist die Haploinsuffizienz, die mit einem Mangel an normal funktionierendem Protein assoziiert ist. Dieses Konzept bezieht sich auf Situationen,

bei denen mit einem Verlust des mutierten Proteins gerechnet werden kann oder muß, ohne dass das normale Allel vermehrt exprimiert würde. Eine solche Konstellation könnte sich einstellen, wenn die Mutation zu einer Behinderung der RNA- oder Proteinsynthese führt oder gegebenenfalls zu einem selektiven Abbau des dysfunktionalen Proteins. Dabei würde das mutierte Gen die Funktion eines Null-Allels haben. Die gestörte Gesamtaktivität wäre Folge eines Mangels an normalen Genprodukten.

Bei der Mehrzahl der bisher identifizierten HCM-assoziierten Mutationen (Missense-Mutationen) ist Haploinsuffizienz eher unwahrscheinlich. Vielmehr ist in diesen Fällen eine dominant-negative Wirkung plausibel (Seidman und Seidman, 2001; Vosberg, 1998; Bonne et al., 1998). Tatsächlich wurde beobachtet, dass mutierte Proteine *in vivo* in Skelettmuskelbiopsien von Patienten mit der R403Q *MYH7* Mutation (Cuda et al., 1997) und mit der D175N *TPMI* Mutation (Bottinelli et al., 1998) anwesend sind. Ferner wurde in einer großen Anzahl von *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* Studien an Modelltieren die „poison polypeptide“ Hypothese bestätigt (Seidman und Seidman, 2001; Bonne et al., 1998). Ein Haploinsuffizienz-Mechanismus kann aber zumindest bei Mutationen, die zu einem vorzeitigen Kettenabbruch des Proteins führen, nicht prinzipiell ausgeschlossen werden. Mischformen beider Mechanismen sind ebenfalls denkbar. Nach jetziger Kenntnis überwiegen, zumindest für die β -Myosin-Mutationen, die Argumente zugunsten einer dominant-negativen Wirkung.

1.5 Entstehung des klinischen Phänotyps

Seit der Identifizierung der ersten HCM-assoziierten Mutation im Gen für die schwere Kette des β -Myosins sind viele Versuche durchgeführt worden, um den Weg von den genetischen Ursachen über die Pathogenese zu den Symptomen aufzuklären. Anhand verschiedener transgener Tiermodelle wurde gezeigt, dass der Phänotyp der HCM experimentell reproduzierbar ist (Geisterfer-Lowrance, 1996; Spindler et al., 1998; Fatkin et al., 1999; Yang et al., 1998, 1999; Seidman und Seidman, 2001). In solchen Versuchen wurden typische Eigenschaften der menschlichen Krankheit beobachtet. Das gilt für die myokardiale Hypertrophie, für das histopathologische „disarray“ mit vermehrter interstitieller Fibrosierung und für die veränderte kardiale Physiologie. Eine Reihe von biochemischen und physiologischen Experimenten an transfizierten Zellen mit mutierten Proteinen stützt außerdem die Vorstellung, dass der Querbrückenzyklus selbst gestört ist (Sweeney et al.,

1994; Lin et al., 1996). Ob die Symptome unmittelbar auf die gestörten Kontraktionsprozesse zurückzuführen sind, ist eine offene Frage (Vosberg, 1998).

Bei der Entstehung des klinischen Phänotyps ist zwischen den primären Dysfunktionen (Art und Umfang des gestörten Kontraktionsprozesses, aberrante Filamentstrukturen) und sekundären funktionellen und morphologischen Änderungen des Myokards zu unterscheiden. Ungeklärt sind bisher die Ursachen für die lange Latenz der Krankheit, für die diskrete, nicht-homogene Verteilung der Hypertrophie-Zone im Herzen, für die Heterogenität der Effekte bei verschiedenen Trägern derselben Mutation, für die molekularen Mechanismen, die vom Primärdefekt (Kontraktionsstörung) zu den klinisch auffälligen Zeichen der Krankheit führen, und eine mögliche Beeinflussung der Krankheit durch Umweltfaktoren oder durch andere Gene.

2 Myosinbindungsprotein C (MyBP-C)

2.1 Strukturelle Eigenschaften des MyBP-C

MyBP-C ist bereits seit den 70er Jahren als Muskelprotein bekannt (Starr und Offer, 1971; Offer et al., 1973). Es ist eine Proteinkomponente, die in allen quergestreiften Muskeln vorkommt (Weber et al., 1993). Insgesamt wurden drei Isoformen identifiziert, die Mitglieder einer Genfamilie sind. Die langsame skeletale, die schnelle skeletale und die kardiale Isoform (Yamamoto und Moss, 1983) sind nicht die Produkte alternativen Spleißens, sondern werden von drei verschiedenen Genen auf verschiedenen Chromosomen (Chromosom 12, 19 und 11) kodiert.

MyBP-C teilt die modulare Architektur der Immunglobulin-Superfamilie und besteht aus einer Abfolge von Immunglobulin C2-ähnlichen und Fibronectin Typ 3-ähnlichen Domänen (Einheber und Fischman, 1990; Fürst et al., 1992; Weber et al., 1993; Gautel et al., 1995; Yasuda et al., 1995) (Abbildung 2A). Die kardiale Isoform zeichnet sich durch 3 spezifische Regionen aus, die nicht in den skeletalen Myosinbindungsproteinen vorkommen:

1. Das kardiale MyBP-C besitzt eine zusätzliche N-terminale IgC2-Domäne C0.
2. Zwischen den Domänen C1 und C2 befindet sich eine Region, die in der Literatur als „MyBP-C motif“ bezeichnet wird (Grün und Gautel, 1999). Dieser Bereich enthält

neun zusätzliche, isoform-spezifische Aminosäuren, die als Phosphorylierungsstellen für zwei Proteinkinasen dienen, für die Proteinkinase A (Jacock und England, 1980; Gautel et al., 1995) und für die MyBP-C-assoziierte Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase (Hartzell und Glass, 1984; Schlender und Bean, 1991).

- Die Domäne C5 zeigt als einzelne Domäne eine hohe Sequenz-Divergenz im Vergleich mit den skeletalen Isoformen. Sie enthält 28 zusätzliche Aminosäuren, die eine für IgC2-Domänen untypische Schleife bilden. In neuesten Experimenten wurde gezeigt, daß diese prolin-reiche Region multiple Konformationen annehmen kann und dadurch benachbarte Regionen in ihrer Faltung beeinflusst (Idowu et al., 2002). Diese Region könnte für die Bindung einer herz-spezifischen MyBP-C-assoziierten Kinase zuständig sein (Hartzell und Glass, 1984; Schlender und Bean, 1991; Gautel et al., 1995).

Das kardiale MyBP-C wird im Menschen ausschließlich im Herzen exprimiert und erscheint gemeinsam mit der schweren Kette des β -Myosins und mit Titin ontogenetisch bereits zu Beginn der Sarkomerogenese (Fougerousse et al., 1998; Gautel et al., 1998; Weber et al., 1993).

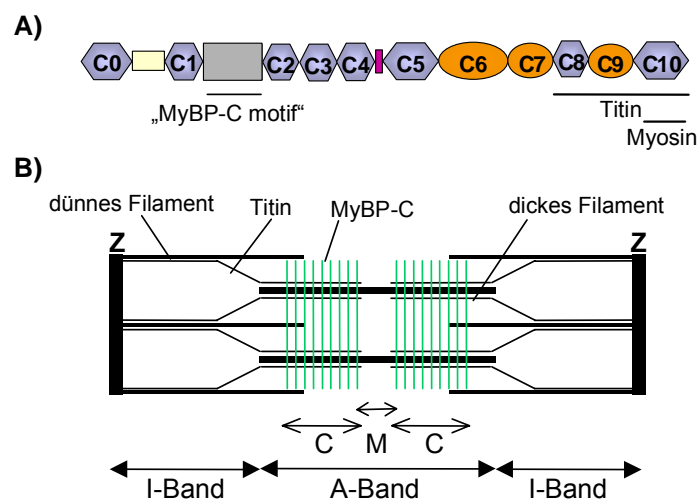


Abbildung 2: Kardiales MyBP-C - modularer Aufbau und Lokalisierung im Sarkomer.

A) Proteinstruktur des kardialen MyBP-C. Das Protein besteht aus Immunglobulin- und Fibronektindomänen. Das „MyBP-C motif“ und die C-terminalen Bindungsstellen für Myosin und Titin sind unterstrichen. **B)** MyBP-C (grüne Markierung) befindet sich in den C-Zonen der A-Bande innerhalb des Sarkomers. Z, Z-Scheibe; M, M-Linie; C, C-Zone.

MyBP-C ist Teil der dicken Filamente und befindet sich innerhalb des Sarkomers in der C-Zone der A-Bande (Abbildung 2B). Die Proteine formieren in dieser Region, in der die Querbrückenbildung stattfindet, 7-9 transversale Streifen, die jeweils 43 nm voneinander entfernt sind (Pepe und Drucker, 1975; Craig und Offer, 1976, Dennis et al., 1984). Die Stöchiometrie von MyBP-C und Myosin ist nicht genau bekannt, wahrscheinlich entfallen in

jeder C-Zone auf 3 Myosin-Moleküle ein MyBP-C (Winegrad, 2000). Die sarkomeren Bindungspartner des MyBP-C sind Myosin (das S2-Subfragment und der leichte Meromyosin-Anteil des Myosins) (Starr und Offer, 1971; Moos et al., 1975; Winegrad 2000), Titin (Fürst et al., 1992; Freiburg und Gautel, 1996) und Aktin (Moos et al., 1978; Yamamoto und Moos, 1983). Die letzten 102 Aminosäurereste der IgC2-ähnlichen Domäne C10 markieren die Hauptbindungsstelle für Myosin sowohl bei der schnellen skeletalen Isoform als auch bei dem kardialen Muskelprotein (Starr und Offer, 1978; Okagaki et al., 1993; Alyonycheva et al., 1997; Gilbert et al., 1996). Die Domäne C10 ist alleine für eine maximale Bindung des Myosins nicht ausreichend. Dazu werden zusätzlich die Domänen C7-C9 benötigt (Gilbert et al., 1996). Weitere Myosinbindungsstellen befinden sich bei dem humanen kardialen Protein im „MyBP-C motif“ zwischen C1 und C2 (Grün und Gautel, 1999) und möglicherweise auch in der N-terminalen Domäne C0 (Flavigny et al., 1999). Titin bindet in der Domänen-Region C8-C10 (Fürst et al., 1992; Freiburg und Gautel et al., 1996; Labeit und Kolmerer, 1995). Die Bindungsstelle für Aktin wurde nicht näher lokalisiert.

2.2 Genomische Organisation des humanen kardialen MYBPC3

Der Genlocus *MYBPC3* befindet sich auf Chromosom 11p11.2 (Gautel et al., 1995). Es umfaßt eine genomische Sequenz von mehr als 20.000 Bp. Das Gen hat 35 Exons, von denen 34 kodieren (Carrier et al., 1997; Niimura et al., 1998). Das MyBP-C Transkript ist ca. 4,5 kb groß und kodiert für ein Protein, das aus 1.273 Aminosäureresten besteht. Das Molekulargewicht beträgt 137 kD (Gautel et al., 1995; Carrier et al., 1997). Bei der Analyse der genomischen Organisation und der entsprechenden Proteinstruktur wurde eine bemerkenswerte Übereinstimmung zwischen den Grenzen von Exons und Proteindomänen festgestellt (Carrier et al., 1997). Eine derartige Übereinstimmung wurde auch bei Titin beobachtet (Kolmerer et al., 1996).

2.3 Funktionen des Myosinbindungsprotein C

Die Funktion des MyBP-C ist noch nicht vollständig geklärt. Es gibt experimentelle Hinweise dafür, dass das Protein sowohl an strukturellen als auch an regulatorischen Prozessen des skeletalen bzw. kardialen kontraktiven Systems beteiligt ist (Winegrad, 2000).

Das ontogenetisch frühe Erscheinen des MyBP-C während der Bildung der dicken Filamente weist auf eine essentielle Funktion bei der Regulation der Myosinfilamententwicklung hin (Obinata et al., 1984; Bähler et al., 1985; Lin et al., 1994; Koshida et al., 1995). Frühe biochemische Versuche mit der skeletalen Isoform zeigten, dass MyBP-C die Entstehung der Myosine modifiziert (Offer et al., 1973) und die dicken Filamente stabilisiert (Moos et al., 1978). Skeletale Myosine, die in COS-1 Zellen exprimiert wurden, waren zwar in der Lage in Abwesenheit von MyBP-C dicke Filamente zu bilden, jedoch führte eine Coexpression mit MyBP-C zu einer Modifikation ihrer Dimension. Die dicken Filamente wurden verlängert und erreichten ein höheres Maß an Kompaktheit (Seiler et al., 1996). Die Interaktionen, die das MyBP-C mit Myosin und Titin eingeht, sprechen ebenfalls für eine Beteiligung an der Morphogenese und an der Stabilisierung der Myosinfilamente (Gilbert et al., 1996; Seiler et al., 1996; Winegrad, 2001; Sebillon et al., 2001).

Die Entdeckung, dass die kardiale Isoform unter adrenerger Stimulierung durch zwei Proteinkinasen phosphoryliert wird, deutete auf eine Beteiligung des MyBP-C an der Regulation der kardialen Kontraktilität hin (Jacock und England, 1980; Hartzell und Glass, 1984; Schlender und Bean, 1991; Gautel et al., 1995).

Im Rahmen von ultrastrukturellen Untersuchungen an isolierten, kardialen dicken Filamenten wurde durch die Phosphorylierung des MyBP-C eine Vergrößerung des Abstandes zwischen den dicken und dünnen Filamenten sowie eine erhöhte Ordnung und/oder eine veränderte Orientierung der Myosinköpfe beobachtet (Weisberg und Winegrad, 1996, 1998). Bindungsstudien zeigten, dass eine direkte Interaktion zwischen dem S2-Subfragment des Myosins und dem „MyBP-C motif“ besteht. Die Wechselwirkung zwischen diesen Proteinen bzw. Fragmenten wird durch die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung dieses Motivs reguliert (Grün und Gautel 1999; Grün et al., 1999). Darüber hinaus scheint die kontrollierte Interaktion mit der „Scharnier“ Region des Myosins (hinge region) im S2-Bereich das kontraktile Verhalten der Muskelfasern zu beeinflussen (Kunst et al., 2000). Auf der Basis dieser Wechselwirkungen ist eine Regulation der Kontraktion vorstellbar, bei der die Kinetik der Myosin-Aktin Interaktion und die Krafterzeugung moduliert werden (Winegrad, 2000).

2.4 Nonsense-Mutationen im kardialen MyBP-C und hypertrophe Kardiomyopathie

Es wird vermutet, dass Mutationen, die einen vorzeitigen Kettenabbruch bei der Proteinsynthese zur Folge haben, in der Mehrzahl der Fälle zu Haploinsuffizienz führen (Mendell und Dietz, 2001). Der klinische Phänotyp HCM-assoziiierter Nonsense-Mutationen im kardialen MyBP-C und die Ergebnisse aus zwei Untersuchungen an humanem myokardialen Biopsiegewebe lassen Haploinsuffizienz plausibel erscheinen. In beiden Fällen wurde ein C-terminal verkürztes MyBP-C im Patienten-Herzgewebe nicht nachgewiesen, obwohl mRNA identifiziert wurde, die für die Synthese von vollständig langem MyBP-C ungeeignet schien (Rottbauer et al., 1997; Moolman et al., 2000).

In transgenen Mäusen wurden mit Kettenabbruchsgenen unterschiedliche Resultate erzielt. Zunächst wurde berichtet, daß ein C-terminal verkürztes MyBP-C Transgen in Mäusen stabil exprimiert wird. Dabei führte die Synthese des mutierten Proteins bei gleichbleibender absoluter MyBP-C Menge zu einer erniedrigten Menge an endogenem WT MyBP-C. Das um die C-terminalen Bindungsstellen für Titin und Myosin verkürzte Protein wurde jedoch nicht in Sarkomere inkorporiert. Die endogene Sarkomerstruktur schien intakt (Yang et al., 1998). In einem Folgeprojekt erhielten die Mäuse ein MyBP-C Transgen, dem nur die Myosin-Bindungsstelle fehlte. In dieser Studie wurde das verkürzte Protein nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen. Allerdings wurde eine Inkorporation in Sarkomere beobachtet, und zwar mit der Folge von strukturellen und funktionellen Veränderungen (Yang et al., 1999). In beiden transgenen Tiermodellen wurde ein milder HCM-Phänotyp festgestellt. Nach Auffassung der Autoren waren in der ersten Studie die pathologischen Konsequenzen weder mit Haploinsuffizienz noch mit einem dominant-negativen Effekt zu erklären. Die Ergebnisse der zweiten Studie sprachen für den letzteren Mechanismus. In einem kürzlich veröffentlichten Bericht über ein MyBP-C „knock-out“ Tiermodell zeigten heterozygote Mäuse mit einem MyBP-C Null-Allel bei reduzierter mRNA-Menge eine unveränderte, mit dem WT vergleichbare „steady state“ Expression des MyBP-C (Harris et al., 2002). Kompensierende posttranskriptionelle Mechanismen wurden für dieses Ergebnis verantwortlich gemacht.

2.5 Fragestellung

Ausgangspunkt für die vorliegende Studie waren Resultate, die bei einer HCM-Familienanalyse erhalten wurden (Moolman et al., 2000). Bei Patienten wurde in dieser Familie eine Mutation im kardialen MyBP-C Gen identifiziert. Durch die Insertion eines Guanins in Exon 25 entstand, aufgrund der veränderten genomischen Sequenz, eine kryptische 5' Spleiß-Donor-Stelle. Infolge des aberranten Spleiß-Prozesses wurden 40 Bp am 3' Ende von Exon 25 deletiert. Eine damit verbundene Leserahmenverschiebung führte in Exon 26 zu einem vorzeitigen Stop-Codon. Als Folge der vorzeitigen Translationstermination wurde die Synthese eines um 40 kD verkürzten MyBP-C Proteins erwartet, dem die C-terminalen Titin- und Myosinbindungsstellen fehlen. Ein solches Protein wurde im Herzgewebe eines betroffenen Genträgers nicht gesehen. Dabei wurde als Nachweisgrenze für das – eigentlich erwartete – verkürzte Protein ~ 0,1% des normalen Proteins bestimmt (Prof. Gautel, persönliche Mitteilung). Das heißt, der relative Anteil des mutierten MyBP-C wurde auf weniger als den tausendsten Teil der Wildtyp-Form geschätzt.

Aus diesem Befund ergab sich als Frage, ob der pathogene Mechanismus in dieser Familie tatsächlich auf einen dominant-negativen Effekt von sehr wenigen veränderten Molekülen zurückzuführen war. Hierfür wurden an transient transfizierten neonatalen Kardiozyten aus Ratte Expressionsstudien mit mutierter MyBP-C cDNA vorgenommen, um mögliche Veränderungen der Sarkomerstruktur feststellen zu können.

Zusätzlich wurde die Frage untersucht, ob ein Mechanismus existiert, der die Bildung des verkürzten MyBP-C bereits auf mRNA-Ebene verhindert. Ein solcher Mechanismus wird seit längerem diskutiert und in der Literatur als „nonsense mediated decay (NMD)/mRNA surveillance“ beschrieben (Culbertson, 1999). In diesem Zusammenhang sollte mit Hilfe einer semiquantitativen RT-PCR Analyse die relative Menge an mutierter mRNA in der Myektomiegewebeprobe eines Patienten bestimmt werden.

Es bestanden außerdem Hinweise darauf, dass neben dem klassischen, intron-abhängigen NMD auch solche Mechanismen beteiligt sind, die Nonsense-mRNAs anhand von Elementen erkennen, die sich in der bereits reifen mRNA im Bereich 3' des vorzeitigen Stop-Codons befinden (Hilleren und Parker, 1998). Zur Prüfung dieser Frage galt es die Expression der mutierten Patienten-mRNA/cDNA mit der MyBP-C WT mRNA/cDNA und einer weiteren mutierten MyBP-C mRNA/cDNA zu vergleichen, die – anders als im Patienten – bereits mit

dem vorzeitigen Stop-Codon endet. Gegebenenfalls sollten regulatorisch relevante Sequenzbereiche weiter eingegrenzt werden.

II Material und Methoden

1 Material

1.1 Bakterienstämme

Alle verwendeten Bakterienstämme sind Derivate des *Escherichia coli* Stammes K12.

SURE (e14⁻(McrA⁻), $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)171$, *sbcC*, *recB*, *recJ*, *umuC::Tn5(Kan^R)*, *uvrC*, *supE44*, *lac*, *gyrA96*, *relA1*, *thi-1*, *endA1*, [F'*proAB*, *lacI^qZ* $\Delta M15$]) (Greener, 1990; Stratagene)

Top10 F⁻(*mcrA*, $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)\Phi 80$, $\Delta lacZ$, $\Delta M15$, $\Delta lacX74$, *deoR*, *recA1*, *araD139*, $\Delta(ara, leu)7679$, *galU*, *galK λ -*, *rpsL(Str^r)*, *endA1*, *nupG* (Invitrogen)

GM48 F⁻ *thr*, *leu*, *thi*, *lacY*, *galK*, *galT*, *ara*, *fhuA*, *tsx*, *dam*, *dcm*, *genV44* (Maurizi et al., 1985)

SCS110 *rpsL(Str^r)*, *thr*, *leu*, *endA*, *thi-1*, *lacY*, *galK*, *galT*, *ara*, *tonA*, *tsx*, *dam*, *dcm*, *supEE44 Δ* , (*lac-proAB*), [F'*traD36 proABlac^qZ* $\Delta M15$] (Stratagene)

1.2 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um ein bis drei Tage alte neonatale Wistar-Ratten aus der Tierzuchtanlage des Max-Planck-Instituts für Physiologische und Klinische Forschung, Bad Nauheim.

1.3 Primäre Zellen und Zelllinien

1.3.1 Neonatale Kardiozyten aus Ratten

Neonatale Kardiozyten aus den Herzen von ein bis drei Tage alten Ratten stellen primäre Zellen dar, die für jedes Experiment isoliert wurden. Neonatale wie auch adulte Kardiozyten zeichnen sich durch eine unabhängige pulsatorische Aktivität in Form spontaner rhythmischer Kontraktionen außerhalb des Gewebeverbandes aus. Eine isolierte Herzzelle agiert somit als elementare, strukturelle und funktionelle Einheit des Herzmuskels (Morwinski, 1986). Die

Isolierung von Kardiozyten aus dem Herzgewebe erfolgt durch die Wirkung proteolytischer Enzyme, insbesondere durch Kollagenase (Harary und Farley, 1963). Die Isolierung neonataler Kardiozyten ist im Vergleich zur Isolierung adulter Kardiozyten weniger aufwendig. Es bedarf keiner Perfusion des Herzgewebes, da es genügt das geringe Gewebematerial vor der Kollagenase-Behandlung mechanisch zu zerkleinern. Die isolierten Kulturen sind überwiegend frei von anderen im Myokard anwesenden Zellen. Zum Anheften an die Kulturschalen benötigen die Zellen eine extrazelluläre Matrix, wie Laminin oder Fibronectin. Myokardiale Zellen können als primäre Kultur in serumhaltigem Medium über einige Wochen physiologisch aktiv sein (Morwinski, 1986). Herzmuskelzellen sind postmitotisch und eine permanente Zelllinie existiert nicht. Bezüglich der Aufnahme von Plasmid-DNA in die Zellen sind neonatale Kardiozyten zwar nicht sehr effizient, aber effektiver zu transfizieren als adulte Kardiozyten. Adenovirale Vektoren, die eine deutlich bessere Transfektionseffizienz garantieren, standen nicht zur Verfügung.

1.3.2 COS-1 Zelllinie

COS-Zellen werden häufig als Expressionssystem für die Produktion rekombinanter Proteine verwendet. Es handelt sich hierbei um eine von CV-1 Zellen (Fibroblasten aus Affennieren) abgeleitete Zelllinie. Zur Herstellung der COS-Zellen wurden CV-1 Zellen mit einem defekten SV40 Virus transformiert, dessen Genom zwar das T-Antigen, aber keine Startsequenz für die Replikation (origin of replication, ori) (Gluzman, 1981) aufweist. Verschiedene Zelllinien, u.a. COS-1, -2, -3 und -7 wurden anschließend isoliert, die das T-Antigen des SV40 Virus genomisch integriert enthalten und exprimieren. Die Zelllinie COS-1 enthält eine Kopie der früh transkribierten Region der SV40 DNA. Das darin enthaltene T-Antigen erlaubt es, Plasmide, die den SV40 spezifischen Replikationsursprung besitzen, in COS-1 Zellen zu replizieren und damit hohe Kopienzahlen (10^4 - 10^5 Plasmide/Zelle) zu erreichen. COS-1 Zellen sind zudem leicht zu kultivieren und zu transfizieren. Bereits 24 h nach einer Transfektion sind rekombinante Proteine in hoher Ausbeute in den Zellen vorhanden.

1.4 Plasmide

Alle Plasmide, die nicht mit einer separaten Referenz versehen sind, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellt bzw. verwendet. Die Klonierung von DNA erfolgte mit Hilfe der Vektoren pBluescript II SK(+/-), pCR[®]-BluntII-TOPO und pET-6H.

pBluescript II SK(+/-) (Stratagene):

Klonierungsvektor, der u.a. die „Blau/Weiß-Selektion“ rekombinanter Plasmide erlaubt sowie die Sequenzierung klonierter DNA in beiden Richtungen mit Hilfe standardisierter Primer ermöglicht.

pCR[®]-BluntII-TOPO (Invitrogen):

Dient der schnellen, ligase-unabhängigen Klonierung von PCR-Produkten mit glatten Enden. Der Vektor liegt linearisiert, mit kovalent gebundener Vaccinia Virus DNA Topoisomerase I an den 3' Enden beider DNA-Stränge vor („TOPO[®]-activated“ Vektor).

pET-6H (freundlichsten zur Verfügung gestellt von Prof. Gautel, London):

Modifizierter pET-Vektor, der stromaufwärts von der Klonierungsbox mit multiplen Restriktionsschnittstellen 6 Histidin-Codons enthält. In diesem Vektor befanden sich die hier verwendeten MyBP-C cDNA Fragmente (C0C1, C1C2, C2C5, C5C8 und C8C10). pET-Vektoren werden für die Klonierung und Expression in *E. coli* verwendet. In diesem Expressionssystem, entwickelt von Studier und Moffat (1986), werden klonierte Gene unter der transkriptionellen Kontrolle des Bakteriophagen T7 Promotors exprimiert. Dabei erfolgt die Expression des klonierten Gens nur, wenn die Expression einer chromosomalen Kopie der T7 RNA Polymerase (unter der *lacUV5* Kontrolle) durch die Zugabe von IPTG induziert wird. Die exprimierten MyBP-C Proteinfragmente dienten ursprünglich der Herstellung polyklonaler MyBP-C Antikörper (z.B. Antikörper R76).

pCIneo (Promega):

Expressionsvektor zur konstitutiven Expression klonierter DNA in Säugerzellen unter der transkriptionellen Kontrolle der humanen CMV Enhancer/Promotor Region. Der Vektor eignet sich sowohl für eine transiente als auch für eine stabile Expression, da das Plasmid das Neomycin-Phosphotransferase-Gen enthält. Stabil transfizierte Zellen werden unter selektiven Bedingungen in Anwesenheit des Antibiotikums G-418 kultiviert. Für die *in vitro*

Transkription bzw. Translation steht in diesem Vektor die T7-Promotor Sequenz zur Verfügung. Im 3' flankierenden Bereich der Klonierungsbox des Vektors befindet sich ein Fragment des SV40 Virus mit Signalsequenzen für Transkriptionstermination und Polyadenylierung. Zusätzlich verfügt der Vektor über die Startsequenz zur Replikation des SV40 Virus T-Antigens (ori). Diese Sequenz garantiert die extrachromosomale Replikation von Plasmid-DNA in COS-Zellen.

pSV- β -Galaktosidase (Promega):

Dient als Kontroll-Vektor zur Überprüfung der Transfektionseffizienz in Säugetierzellen. Das bakterielle Reportergen *lacZ*, das für das Enzym β -Galaktosidase kodiert, steht unter der Kontrolle des frühen SV40 Promotors und Enhancers. Die Expression des Reporterenzym kann schnell und direkt in fixierten transfizierten Zellen durch *in situ* Färbung mit X-Gal als Substrat der β -Galaktosidase nachgewiesen werden.

1.5 MyBP-C cDNA und genomische Sequenz

Accession Nr.: X84075 (GenBank; Gautel et al., 1995)

Accession Nr.: U91629 (GenBank; Niimura et al., 1998)

1.6 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden in PCR- bzw. RT-PCR-Reaktionen und für Sequenzierungen verwendet. Zum Klonieren wurden komplementäre, einzelsträngige Oligonukleotide hybridisiert. Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG und Sigma ARK gebrauchsfertig geliefert und sind im Anhang aufgeführt.

1.7. Chemikalien und Enzyme

Eurogentec: GoldStar™ DNA-Polymerase

Stratagene: PfuTurbo® DNA Polymerase

Invitrogen: Alkalische Phosphatase (CIAP), Lipofektin, T4-DNA Ligase

NEB: Restriktionsendonukleasen, T4-DNA Ligase

Roth: Acrylamid, Agar-Agar, Agarose, Ammoniumpersulfat (APS), β -Mercaptoethanol, Bis-acrylamid, 5-Bromo-4-chloro-3-inolyl- β -D-galaktopyranosid (X-Gal), Chloroform, Dithiothreitol, Hefe-Extrakt, Isoamylalkohol, Isopropanol, Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG), Phenol, NNN'-Tetramethylethyldiamin (TEMED), Triton® X-100, Trypton

Promega: Desoxyribonukleotide, DNaseI, RNasin, T7-DNA Polymerase, T7-RNA Polymerase

SERVA: Ampicillin, Kanamycin, 3-N(Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)

Schleicher und Schuell: Filterpapier GB002, Nitrozellulose-Filter Protran 0,45 μ m

CC Pro: Fibronektin

Sigma: Polyethylenimin (PEI), Rinderserumalbumin (BSA), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

FMC-Bioproducts: Seakem Agarose

Heirler: Magermilch-Pulver

1.8 Puffer und Lösungen

1.8.1 Puffer für Zellkultur

1x PBS zum Waschen der Zellen: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄; 1,4 mM KH₂PO₄, pH 7,3

ADS-Puffer: 0,11 M NaCl; 5 mM KCl; 5 mM Dextrose; 0,8 mM MgSO₄; 12,5 mM NaH₂PO₄, 20mM HEPES, pH 7,3

1.8.2 Puffer und Lösungen für Immunzytochemie

10x PBS: 1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 14,7 mM KH₂PO₄; 125 mM Na₂HPO₄. Die gebrauchsfertige Lösung wurde auf pH 7,4 eingestellt.

4% PFA: 40 g Paraformaldehyd (Merck), 3 Plätzchen Natriumhydroxid (Merck), 1 l 1x PBS, Einstellung des pH mit 1 N HCl auf pH 7,4.

Inkubationspuffer: 0,05% BSA und 0,005% Triton-X in PBS, pH 7,4

Mowiol: Das schwer lösliche Mowiol (Hoechst) wurde bis zu 16 h in PBS gerührt. Anschließend wurde es bei 12.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand im Kühlschrank bei 8°C gelagert.

1.8.3 Puffer für molekularbiologische Standardmethoden

Minilyse: Resuspensionspuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A

Lysepuffer: 200 mM NaOH; 1% SDS

Neutralisationspuffer: 3 M Kaliumacetat, pH 5,5

Semidry Blotting Puffer:

Puffer 1	300 mM Tris-HCl, pH 10,4
Puffer 2	25 mM Tris-HCl, pH 10,4
Puffer 3	40 mM Norleucin; 25 mM Tris-HCl, pH 9,4

1x PBS-T für Western Blot: 80 mM Na₂HPO₄; 20 mM NaH₂PO₄; 100 mM NaCl, 0,1% Tween 20; pH 7,5

10x MOPS-Puffer: 0,2 M 3-[N-Morpholino]propansulfonsäure (MOPS); 50 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA, pH 7,0

1x MOPS-Laufpuffer: 10% 10x MOPS; 2% Formaldehyd (37%)

1.9 Nährmedien für Bakterien

LB-Medium: 0,5% NaCl, 0,5% Hefe-Extrakt, 1% Trypton

LB-Amp.-Medium: 80 µg Ampicillin pro ml LB-Medium

LB-Kan.-Medium: 50 µg Kanamycin pro ml LB-Medium

Agar-Platten: 18 mg pro ml Medium

SOC-Medium: 2% Trypton; 0,5% Hefe-Extrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM Glucose

1.10 Nährmedien und Lösungen für Zellkultur

Wachstumsmedium COS-1 Zellen: 10% Fötale Kälberserum (FKS, Invitrogen); 1% L-Glutamin (2 mM, Invitrogen); 1% Natriumpyruvat (1 mM, Invitrogen); 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen); 87% Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 4,5 g/l Glucose (CC Pro)

Trypsin-EDTA-Lösung: 0,5 g/l Trypsin; 0,5 mM EDTA, pH 7,3; 15 mM NaCl (Invitrogen)

Wachstumsmedium neonatale Kardiozyten (5 % FKS-Medium): 5% FKS; 1% L-Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin; 93% Medium 199 mit Earle's Salzen mit 25 mM HEPES ohne Phenolrot

Präplattierungsmedium neonatale Kardiozyten (1 % NKS-Medium): 1% Neonatales Kälberserum (NKS); 1% L-Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin; 97% Medium 199 mit Earle's Salzen mit 25 mM HEPES ohne Phenolrot

Transfektionsmedium neonatale Kardiozyten: 1% Transferrin (10 mg/ml), 5% Aminosäure-supplement, 1% L-Glutamin, 0,2% BSA (w/v), 1% Insulin (25 mg/ml), 92% Medium 199 mit Earle's Salzen mit 25 mM HEPES ohne Phenolrot

Aminosäuresupplement (zur Verfügung gestellt von Dr. T. Kubin, Bad Nauheim)

1.11 Objektträger für die Zellkultur

Es wurden spezielle Objektträger (Nunc), sog. „Lab Tek™ 2-well chamber slides“ verwendet, die aus einem Objektträger mit abnehmbaren Kammerwänden (aus Plexiglas) bestehen (4,2 cm²/Well). Mit diesen „Kulturobjektträgern“ ist es möglich, die Zellen direkt auf dem Objektträger zu kultivieren und die Kammerbegrenzungen nach Fixierung der Zellen zu entfernen.

1.12 Antikörper

1.12.1 Antikörper Western Blot

Tab. 2: Primäre Antikörper

Name	Klon	Wirt	Konz.	Firma
MyBP-C	R76, anti-C0C1, IgG	Kaninchen	1:5.000 bzw. 1:8.000	freundlichst überlassen von Prof. Gautel, London
c-myc	9E10, IgG	Maus	1:250	Roche
Aktin	JLA20, IgM	Maus	1:8.000	Oncogene

Tab. 3: Sekundäre Antikörper

Name	Wirt	Konz.	Firma
Horseraddish-Peroxidase-gekoppelte anti-Kaninchen IgG	Esel	1:12.000	Amersham Pharmacia
Horseraddish-Peroxidase-gekoppelte anti-Maus IgG	Schaf	1:12.000 bzw. 1:1.000	Amersham Pharmacia
Horseraddish-Peroxidase-gekoppelte anti-Maus IgM	Ziege	1: 4.000	Chemicon

Bei den Primärantikörpern handelte es sich mit Ausnahme des polyklonalen MyBP-C Antikörpers R76 um monoklonale Antikörper. Als Sekundärantikörper wurden die entsprechenden peroxidase-gekoppelten Antikörper verwendet.

1.12.2 Antikörper Immunzytochemie

Tab. 4: Primäre Antikörper

Name	Klon	Wirt	Konz.	Firma
c-myc	9E10, monoklonal	Maus	1:100	Roche
Titin	anti-z1z2, polyklonal	Kaninchen	1:50	freundlichst zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Schaper, Bad Nauheim
MyBP-C	R76, anti-C0C1, polyklonal	Kaninchen	1:100	freundlichst überlassen von Prof. Gautel, London

Monoklonale Antikörper zeichnen sich durch ihre hohe Spezifität aus, da sie nur gegen eine Determinante des Antigens gerichtet sind. Polyklonale Antikörper hingegen erkennen unterschiedliche Determinanten und bewirken so eine Steigerung der Reaktivität.

Tab. 5: Sekundäre Antikörper

Name	Wirt	Konz.	Firma
Biotin-SP-conjugated donkey anti-rabbit IgG	Esel	1:100	Jackson ImmunoResearch
Biotin-SP-conjugated donkey anti-mouse IgG	Esel	1:100	Jackson ImmunoResearch
Rhodamine-conjugated AffiniPure donkey anti-rabbit IgG	Esel	1:100	Chemicon

Die biotinylierten Sekundärantikörper wurden in der indirekten „Avidin-Biotin“ Methode eingesetzt, während der Sekundärantikörper mit einem konjugierten roten Farbstoff (Rhodamin) in der indirekten Immunfluoreszenz-Methode angewendet wurde.

Tab. 6: Detektionssystem

Name	Konz.	Firma
Cy-2 gekoppeltes Streptavidin	1:100	Biotrend
Cy-3 gekoppeltes Streptavidin	1:100	Biotrend

Bei Cy-2 und Cy-3 handelt es sich um grün bzw. rot fluoreszierende Carbocyanine. Beide Fluorochrome sind sehr leuchtintensiv und außerdem sehr stabil. Die Konjugation von Cy-2 bzw. Cy-3 an Streptavidin, das eine hohe Affinität zum Biotin des Sekundärantikörpers besitzt, führt zu einer intensiven Verstärkung des Signals, da mehrere Cy-2 bzw. Cy-3 Streptavidinkomplexe an Biotin binden können.

Kernfärbung: Toto-3' (Mabtech) 1:10.000, 10 min RT
 Propidiumdijodid (Hoechst) 1:1.000, 10 min RT

1.13 Mikroskope

Zur Beurteilung der Zellen in Kultur wurde ein Phasenkontrastmikroskop (Zeiss, Axiovert 35) verwendet. Die immunzytochemisch gefärbten Zellpräparate wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop (Leica TCS SP, Leica) ausgewertet, das mit drei unterschiedlichen Lasern - Argon-, Krypton-, und Helium-Neonlaser - ausgestattet ist. Mit dem Mikroskop (Fluoreszenzmikroskop) wurden die Präparate in Auflichttechnik untersucht. Dabei wird Licht einer Quecksilber-Dampflampe (100 W) durch Filter spezifischer Wellenlängenbereiche von oben auf das Präparat gelenkt. Ist das gewünschte Objekt eingestellt, wird auf Laserlicht umgeschaltet. Das Laserlicht wird dabei durch ein Prisma aufgetrennt und in einer anschließenden Lochblende auf den gewünschten Wellenlängenbereich eingegrenzt. Außerdem haben die Laser selbst verschiedene Spektren. Die Hauptspektren betragen 488 nm (Krypton), 458 nm (Argon) und 568-633 nm (Helium-Neon).

Es wurden Übersichtsbilder mit dem 20x Immersionsobjektiv ('HC PL APO 20x/0.70 IMM CORR', LEICA) und Detailaufnahmen mit dem 40x Immersionsobjektiv ('HCX PL APO 40x/1.25-0.75 OIL') mit Verwendung der Funktion „Zoom“ (Vergrößern) angefertigt.

Die Excitations- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind für Cy-2 494/520 nm, für Cy-3 550/565 nm, für Rhodamin 505/533 nm, für Propidiumdijodid 536/617 nm und für Toto 3' 642/660 nm.

1.14 Bildverarbeitung

Die digitale Bildverarbeitung der konfokalen Datensätze wurde mit den Programmen „Imaris“ und „Selima“ (Bitplane) an einer Octane-Workstation (Silicon Graphics) durchgeführt. Die erstellten Bilder wurden mit einem Tintenstrahldrucker (Epson) ausgedruckt.

2 Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten experimentellen Techniken und Methoden werden in den folgenden Abschnitten beschrieben. Die Zusammensetzung von Puffern und Lösungen ist im Kapitel Material aufgeführt. Molekularbiologische Standardmethoden, die in dieser Arbeit nicht genauer erklärt werden, erfolgten nach üblicher Laborpraxis (Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 2000). Kommerziell erhältliche Kits wurden nach den Angaben der Hersteller verwendet. Für die Protokolle wird zusammenfassend auf Herstellerangaben verwiesen.

2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die durchgeführten DNA-Präparationsverfahren beruhten auf der Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979).

2.1.1 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Für die Isolierung größerer Mengen (0,5-1 mg) hochreiner Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde der Qiagen[®] Plasmid Maxi Kit verwendet. Das Prinzip der Plasmidaufreinigung beruhte auf einer modifizierten alkalischen Lyse, gefolgt von der selektiven Bindung der Plasmid-DNA (in Form eines klaren Zellysates) an ein Anionen-Austauscher Säulenmaterial, unter geringen Salz- und niedrigen pH-Bedingungen (s. Herstellerangaben). RNA, Proteine, Kohlenhydrate, Metaboliten und andere niedermolekulare Kontaminationen wurden durch Waschen mit mäßig salzhaltigen Puffern entfernt. Die Elution der DNA vom Säulenmaterial erfolgte mit Hilfe eines stark salzhaltigen Puffers. Zur Konzentrierung und zum Entsalzen der DNA diente schließlich eine Isopropanol-Fällung. Isolierung und Reinigung der DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Qiagen, 1997).

2.1.2 Schnelle Plasmidisolierung aus Minilysaten

Plasmid-DNA Minipräparationen ermöglichten die Isolierung kleinerer Mengen (10 µg) von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen. Die Behandlung der Zellen mit einer Lösung aus SDS und NaOH führte, neben der Zellyse, zur Denaturierung bakterieller Proteine, chromosomaler DNA und Plasmid-DNA. Durch eine anschließende Neutralisierung mit Kaliumacetat wurde

die Plasmid-DNA von chromosomaler DNA, hochmolekularer RNA und Proteinen getrennt, die, gemeinsam mit SDS und Kalium, als Komplex ausfielen. Die in der Lösung verbliebene Plasmid-DNA wurde durch eine Behandlung mit Isopropanol gefällt.

Für analytische Zwecke wurden 2 ml einer stationären Bakterienkultur durch Zentrifugation (13.000 rpm, 1 min) geerntet. Der Überstand wurde verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 200 µl Resuspensionspuffer (s. Kap. Material 1.8.3) aufgenommen. Nach Zugabe von 200 µl Lysepuffer (s. Kap. 1.8.3) wurde der Ansatz leicht geschwenkt und nochmals 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Neutralisationspuffer (s. Kap. 1.8.3) wurde das Lysat 20 min auf Eis inkubiert. Die dabei ausgefallenen Proteine wurden abzentrifugiert (13.000 rpm, 5 min). Der Überstand wurde abgenommen und nach Zugabe von 420 µl Isopropanol 5 min bei RT inkubiert. In einer anschließenden Zentrifugation (13.000 rpm, 20 min) wurde die Plasmid-DNA vom Überstand getrennt. Die gefällte DNA wurde mit 1 ml Ethanol (70%) gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 50 µl ddH₂O gelöst.

2.2 Enzymatische Reaktionen an DNA

2.2.1 Restriktion von DNA

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte nach den Angaben des Herstellers (NEB). Analytische Restriktionen wurden in einem Volumen von 25 µl durchgeführt. Präparative Spaltungen erfolgten in 50-100 µl Ansätzen. Puffer- und Salzlösungen wurden in 10-facher Konzentration mit den Enzymen geliefert.

2.2.2 Partielle Restriktion von DNA

Eine partielle Spaltung von DNA-Molekülen bei Klonierungen ist notwendig, wenn diese außer der zu verwendenden Klonierungsschnittstelle noch weitere Schnittstellen des gleichen Restriktionsenzym aufweisen, die nicht gespalten werden sollen. Die Durchführung partieller Spaltungen basiert auf der Inkubation mit Restriktionsenzymen in reduzierter Konzentration. Das Enzym wird dabei seriell verdünnt.

Ein präparativer Restriktionsansatz wurde mit einem entsprechenden 10x Puffer und ddH₂O auf 100 µl Volumen aufgefüllt und auf 5 Mikroreaktionsgefäße verteilt. Gefäß 1 enthielt 30 µl, Gefäße 2-4 enthielten je 20 µl und Gefäß 5 enthielt 10 µl des Reaktionsansatzes. Alle Mikroreaktionsgefäße befanden sich gekühlt auf Eis. Eine bestimmte Menge des Restriktionsenzym wurde in das erste Gefäß hinzugegeben. Nach dem Mischen des Reaktionsansatzes wurden auf Eis 10 µl des Reaktionsansatzes entnommen und in das zweite Gefäß überführt. Die stufenweise Verdünnung des Enzyms wurde so durch sukzessives Pipettieren von jeweils 10 µl auf das folgende Gefäß weitergeführt. Alle 5 Ansätze enthielten letztendlich 20 µl und wurden 15 min bei entsprechender Reaktionstemperatur inkubiert. Die enzymatische Spaltung wurde gegebenenfalls durch einen Hitzeinaktivierungsschritt und durch Zugabe eines 5-fach konzentrierten DNA-Ladepuffers (50% Glycerin; 50 mM EDTA, pH 8,0; 0,5% Bromphenolblau; 0,5% Xylencyanol) beendet.

2.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Ligasen katalysieren die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen freien 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylenden doppelsträngiger DNA-Fragmente (Modrich et al., 1975). Sowohl DNA-Moleküle mit glatten wie auch mit überhängenden, komplementären Enden werden von der aus dem T4-Phagen stammenden T4 DNA-Ligase ligiert. Überhängende Enden werden mit höherer Rate ligiert als glatte Enden.

In einem Reaktionsansatz (10-15 µl) wurden in der Regel 80-100 ng Vektor-DNA und der 3- bis 7-fache molare Überschuß des zu inserierenden DNA-Fragmentes eingesetzt. Die Ligation wurde in einem Wasserbad bei 16°C im Kühlraum (4°C) über Nacht durchgeführt. Der 10x konzentrierte Ligationspuffer wurde vom Hersteller zur Verfügung gestellt (NEB, Invitrogen).

2.2.4 Dephosphorylierung von DNA

Um die Anzahl monomolekularer Selbstligationen linearisierter Vektorfragmente zu minimieren, wurden die endständigen 5'-Phosphatgruppen des DNA-Moleküls entfernt. Die Hydrolyse erfolgte durch eine alkalische Phosphatase (CIAP, calf intestine alkaline phosphatase, Invitrogen) direkt im Anschluß an präparative Restriktionen. Das Volumen des Restriktionsansatzes wurde durch Zugabe der alkalischen Phosphatase, des Dephosphorylierungspuffers und ddH₂O aufgefüllt und 1 h bei 37°C inkubiert. Für die

Dephosphorylierung von 5 µg DNA wurde 1 U CIAP verwendet. Durch eine anschließende Hitzeinaktivierung (20 min, 65°C) wurde die enzymatische Reaktion beendet. Zur Beseitigung verbliebener Enzyme und Proteine wurde die dephosphorylierte DNA einer Phenol/Chloroform Extraktion (s. Methoden Kap. 2.3.1) unterzogen.

2.2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion („polymerase chain reaction“, PCR) amplifiziert (Mullis et al., 1987; Saiki et al., 1988). Für analytische PCR-Reaktionen, bei denen die Länge des amplifizierten DNA-Fragmentes untersucht werden sollte, wurde die GoldStar™ DNA-Polymerase (Eurogentec) verwendet. DNA-Fragmente, die im weiteren Verlauf kloniert werden sollten, wurden mit einer „proof-reading“ DNA-Polymerase (PfuTurbo® DNA Polymerase; Stratagene) amplifiziert. Damit sollte das Auftreten von Paarungsfehlern während der Amplifikation minimiert werden. Als Reaktionspuffer dienten die jeweils in 10-facher Konzentration mitgelieferten Lösungen der Hersteller. Die PCR-Reaktionen wurden im Touchdown Thermo-Cycler (Hybaid) durchgeführt. Beim Touchdown-Verfahren werden die ersten beiden Zyklen mit einer erhöhten Annealingtemperatur durchgeführt, um eine spezifische Bindung der Primer an die Template-DNA zu erzielen. Darauf folgten je nach Experiment 20-28 Zyklen bei der experimentell ermittelten oder anhand der Sequenz errechneten Annealingtemperatur. Die Denaturierung erfolgte bei 95°C und die Synthese bei 72°C. Denaturierung und Annealing erfolgten jeweils 30 s. Die Synthesezeit wurde der Länge der zu amplifizierenden DNA angepaßt (1 min/kb).

2.3 Aufreinigung von DNA-Molekülen

2.3.1 Phenol/Chloroform Extraktion

Zelluläre Proteine oder Enzyme wurden mit Hilfe einer Phenol/Chloroform Extraktion aus wäßrigen DNA-Lösungen entfernt. Dabei wurde zunächst das Volumen der DNA-Präparationen auf 300 µl mit ddH₂O erhöht. Anschließend wurden 150 µl einer TE-gesättigten Phenollösung (Rotiphenol®, Roth) und 150 µl eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) zugegeben. Die im Reaktionsgefäß befindlichen Phasen wurden gut gemischt. Durch Zentrifugation (13.000 rpm, 5 min) wurden die Phasen vollständig getrennt. Die wäßrige

Phase, die die DNA enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur vollständigen Entfernung von Phenolresten wurde die DNA-Lösung zweimal mit 300 µl des Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches extrahiert. Die Fällung der gereinigten DNA erfolgte durch eine Alkohol/Ammoniumacetat-Behandlung. Die in der Vakuumzentrifuge getrocknete DNA wurde in 30µl ddH₂O aufgenommen.

2.3.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion und Reinigung von DNA aus Agarosegelen ermöglichte die Gewinnung von DNA-Fragmenten definierter Länge zur Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle und erfolgte unter Verwendung des Qiaquick® Gel Extraction Kits (Qiagen).

Nach vollständiger Auflösung der DNA-haltigen Agarose in einem Lösepuffer wurden DNA und Agarose mit Hilfe von Ionenaustauschersäulen von einander getrennt. Bei pH-Werten < 7,5 und in Gegenwart einer hohen Konzentration an chaotrophen Salzen adsorbierte die DNA an die Säulenmatrix, während die agarosehaltige Lösung durch Zentrifugation und Waschen mit einem entsprechenden Puffer abgetrennt wurde. Bei pH Werten > 7,5 wurde die gereinigte DNA mit einem Elutionspuffer oder ddH₂O (pH 8,5) von der Säule eluiert. Weitere Details sind den Angaben des Herstellers zu entnehmen (Qiagen, 2000).

2.3.3 Aufreinigung von amplifizierten DNA-Molekülen

Die Aufreinigung von DNA-Amplifikaten erfolgte mit dem Qiaquick® PCR Purification Kit. Die amplifizierte DNA wurde von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen aufgrund der selektiven Bindungseigenschaften der verwendeten Ionenaustauschersäulen getrennt. Die genaue Verfahrensweise, unter Verwendung der im Kit vorhandenen Lösungen, ist den Angaben des Herstellers zu entnehmen (Qiagen, 2000).

2.4 Aufzucht und Aufbewahrung von Bakterienstämmen

Alle verwendeten Bakterienstämme wurden in LB-Medium oder auf LB-Platten bei 37°C angezogen. Die selektive Anzucht der Bakterien erfolgte durch Zugabe der entsprechenden Antibiotika Ampicillin (80 µg/ml) bzw. Kanamycin (50 µg/ml).

Zur langfristigen Aufbewahrung von Bakterienstämmen wurden Glycerinkulturen hergestellt. Dazu wurden 1 ml einer Übernachtskultur mit 200 µl Glycerin (100%) versetzt, gut vermischt und in Kryoröhrchen (Nunc) bei -80°C eingefroren.

2.5 Transformationstechniken

Die Einführung von DNA in Bakterienzellen wird als Transformation bezeichnet (Mandel und Higa, 1970). Mit Plasmid-DNA transformierte Bakterien erhalten nach Replikation und Expression der plasmid-kodierten Gene selektionierbare Eigenschaften, wie Antibiotika-Resistenzen oder β-Galaktosidase Aktivität. Für die Transformation wurden kompetente Bakterien verwendet, deren Zellmembranen für DNA-Moleküle durchlässig sind.

2.5.1 Transformation von Bakterien durch Elektroporation

Bei der Transformation durch Elektroporation werden die Membranen der Bakterien durch die Entladung eines Kondensators polarisiert. Wird bei diesem Vorgang eine bestimmte Spannung erreicht, bricht die Membran in eng umgrenzten Bereichen zusammen und ist für externe Moleküle permeabel (Calvin und Hannawalt, 1988; Dower et al., 1988).

Für die Herstellung elektrokompenter Zellen wurden 300 ml LB-Medium im Verhältnis 1:120 mit einer *E. coli* Übernachtskultur angeimpft und im Schüttler bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Vor dem Ernten der Bakterien durch Zentrifugation (30 min, 4°C, 5.000 g), wurde die Kultur zunächst 15-30 min auf Eis gekühlt. Das Bakteriensediment wurde anschließend zweimal mit eiskaltem sterilem Wasser (je 250 ml) gewaschen. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 20 ml Glycerin (10%). Danach wurde das Zellsediment in 1ml Glycerin (10%) aufgenommen und in Aliquots von je 100 µl in Mikroreaktionsgefäßen bei -80°C eingefroren.

Für die Transformation wurden 100 µl kompetente Zellen nach langsamem Auftauen auf Eis mit einer möglichst salzfreien DNA-Lösung bzw. einem Ligationsansatz gemischt und in eine vorgekühlte sterile Küvette (0,2 cm, Eurogentec) pipettiert. Die Parameter des verwendeten Genepulser (BioRad) waren 2,5 kV, 25 µF und 400 Ω. Die Zeitkonstante des Pulses sollte zwischen 4,3 und 4,5 ms liegen. Nach dem erfolgten Puls wurde die Zellsuspension sofort mit 1 ml LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien auf antibiotika-haltigen LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.5.2 Transformation von Bakterien nach der „heat shock“ Methode

Die Transformation von Bakterien durch die „heat shock“ Methode erfolgte nach dem Protokoll des Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kits (Invitrogen). Zu je 50 µl der chemisch kompetenten Top10 Zellen (Bestandteil des Kits) wurden je 6 µl Plasmid-DNA bzw. 20 µl Ligationsansatz hinzugefügt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien-Plasmid-Lösung wurde dann 30 s bei 42°C im Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt und anschließend 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 250 µl vorgewärmtem SOC-Medium (s. Kap. 1.9) wurde die Zellsuspension 1 h bei 37°C leicht geschüttelt. Die Bakterien wurden dann auf vorgewärmten LB_{Amp}- bzw. LB_{Kan}-Platten ausplattiert und bei 37°C über Nacht angezchtet.

2.6 TOPO[®]-Klonierung

Das Klonieren von PCR-Produkten wurde mit dem Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit nach den Angaben des Herstellers (Invitrogen, 2000) durchgeführt. Die Topoisomerase I integriert PCR-Produkte mit glatten Enden in den *pCR[®]-BluntII-TOPO[®]* Vektor. Mit dem sog. „heat shock“ Verfahren (s. Methoden Kap. 2.5.2) wurde die Plasmid-DNA in chemisch kompetente Top10 Zellen transformiert.

Das Prinzip der TOPO-Klonierung basiert auf den Ligationseigenschaften der *Vaccinia* Virus DNA Topoisomerase I (Shuman, 1994). Im aktivierten Zustand ist das Enzym kovalent am 3'Ende des linearisierten Vektors gebunden. Es bindet dabei an eine spezifische Sequenz (5'-CCCTTT-3') und spaltet die darauffolgende Phosphodiesterbindung der doppelsträngigen DNA eines Stranges (Shuman, 1991). Die dabei frei werdende Energie wird in Form einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphatidylrest des gespaltenen DNA-Stranges und einem Tyrosylrest (Tyr-274) der Topoisomerase I konserviert. In Anwesenheit eines 5'-

Hydroxylendes eines PCR-Produktes wird die Phosphotyrosyl-Bindung zwischen Vektor und Enzym gespalten. Die gespeicherte Energie wird dabei verbraucht, um eine neue Phosphodiesterbindung zwischen Vektor und PCR-Produkt aufzubauen. Die Topoisomerase I wird bei dieser Reaktion von der DNA freigesetzt. In einem Reaktionsansatz, der 5 min bei RT inkubiert wurde, ligiert die Topoisomerase I ein zugefügtes PCR-Produkt mit dem Vektor.

TOPO-Klonierungsansatz: 1 μ l TOPO-Vektor (10 ng/ μ l)
1 μ l Salzlösung (1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl₂)
4 μ l PCR-Produkt

2.7 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein biochemisches Trennverfahren, bei dem die Wanderung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld zur Auftrennung der einzelnen Moleküle genutzt wird (McDonnell et al., 1977; Southern, 1979). Agarose bzw. Polyacrylamid dienen dabei als elektrisch neutrale, feste Gelmatrizen und üben die Wirkung eines Molekularsiebs aus.

Das gelelektrophorese Trennverfahren diente der Längenbestimmung von DNA-Fragmenten und der Fragmentisolierung. Durch die Anfärbung mit Ethidiumbromid (EtBr) wurden DNA-Banden sowohl in Agarose- als auch in Polyacrylamidgelen unter UV-Licht sichtbar gemacht, mit einer CCD Kamera (LTF) aufgenommen und in einem Computer abgespeichert. Die Bandenmuster wurden von einem Videoprinter ausgedruckt.

2.7.1 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente >1 kb oder ungeschnittene Plasmide wurden in Agarosegelen mit Agarosekonzentrationen zwischen 0,7 und 1,0% aufgetrennt. Die Konzentration der Agarose wurde durch die Längen der zu trennenden DNA-Moleküle bestimmt. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TBE-Puffer (10x: 0,89 M Tris-Base; 0,89 M Borsäure; 0,01 M EDTA, pH 8,0) suspendiert und in einem Mikrowellenofen verflüssigt. Nach dem Abkühlen auf 50°C wurde die flüssige Agarose mit EtBr (1 μ g/ml) versetzt und in eine

Flachbettanlage gegossen. Als Elektrodenpuffer diente 1x TBE. An die Gele (Breite 21 cm/ Länge 9 cm) wurde bei einer konstanten Stromstärke von 150 mA eine Spannung von 100-150 V angelegt. Vor dem Auftragen der DNA-Proben wurden diese zusätzlich mit 4x Probenpuffer (40% Glycerin, 40 mM EDTA, pH 8,0; 0,4% Bromphenolblau; 0,4% Xylencyanol) versetzt.

2.7.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Trennung kleiner DNA-Fragmente (<1 kb) wurden 6% oder 8% Polyacrylamidgele (6% bzw. 8% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1); 10% TBE (10x); 0,08% TEMED; 0,2% APS (30%)) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Gelsystemen (Minigele) bei einer Stromstärke von 20-30 mA. Als Elektrodenpuffer diente 1x TBE-Puffer. Das PAA-Gel wurde 15 min in einem EtBr-Bad (1 µg/ml) angefärbt.

2.7.3 Agarose/Formaldehyd-Gelelektrophorese

Für ein 1,2%iges Agarose/Formaldehydgel wurden zunächst 1,2 g Agarose in 90 ml DEPC-H₂O in einem Mikrowellenofen verflüssigt. Nach dem Abkühlen auf 60°C wurden zur Agaroselösung 10 ml 10x MOPS-Puffer (s. Material Kap. 1.8.3) und 1,8 ml Formaldehyd (12,3 M) hinzugefügt. Vor dem Erkalten wurde die Agarose/Formaldehydlösung in ein horizontales Gelsystem gegossen. Als Elektrodenpuffer diente 1x MOPS-Laufpuffer (s. Kap. 1.8.3). Vor dem Auftragen der Proben wurde die RNA (1 bzw. 3 µg) mit 5x RNA Ladepuffer (0,16% Bromphenolblau; 0,8% 0,5 M EDTA, pH 8,0; 7,2% Formaldehyd (12,3 M); 20% Glycerin (100%); 30,84% Formamid, 40% 10x MOPS-Puffer) gemischt und 5 min bei 65°C denaturiert. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung (5 V/cm) wurde das Gel 20 min in 0,5 M Ammoniumacetat fixiert. RNA-Banden wurden durch Anfärben mit EtBr (15 min, 1µg EtBr/ml ddH₂O) im UV-Licht sichtbar gemacht.

2.8 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzen wurden nach dem Didesoxy-Kettenabbruch Verfahren (Sanger et al., 1977) unter Verwendung des ALFexpressTM DNA Sequencer Systems (Amersham Pharmacia) bestimmt. Für die Sequenzierreaktionen wurde der Thermo SequenaseTM CyTM5 Dye

Terminator Kit (Amersham Pharmacia) benutzt. Bei dieser Reaktion wurden unmarkierte Primer, die thermostabile Thermo Sequenase DNA Polymerase (Amersham Pharmacia), dNTPs und Cy5-markierte ddNTPs eingesetzt. Die Sequenzierreaktion wurde zyklisch durchgeführt. Die bei dieser Reaktion erzeugten Kettenabbruchprodukte wurden nach Abtrennung überschüssiger ddNTPs entsprechend den Herstellerangaben in denaturierenden Sequenziergelen (Repro™ Gel Kit, Amersham Pharmacia) aufgetrennt. Während der Elektrophorese durchliefen die Fragmente einen fixierten Laserstrahl. Dabei entstanden durch Anregung der Cy5-Markierungen Lichtemissionen, die von Photodetektoren des ALFexpress Systems erfaßt und digitalisiert wurden. Die Analyse der Sequenzdaten wurde mit einem Computer unter Verwendung des „ALFwin™ Sequence Analyser 2.10“ Programms (Amersham Pharmacia) durchgeführt.

2.9 Herstellung doppelsträngiger Oligonukleotide

Für die Hybridisierung komplementärer, einzelsträngiger Oligonukleotide wurden die Oligonukleotide 1155 und 1156 im molaren Verhältnis von 1:1 (jeweils 200 pmol) in ddH₂O (30 µl Ansatz) gemischt und zunächst 5 min bei 95°C denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte anschließend bei Raumtemperatur über Nacht und wurde auf einem 8%igen PAA-Gel überprüft. Doppelsträngige Oligonukleotide wurden aufgrund ihrer geringeren elektrophoretischen Beweglichkeit von den Einzelsträngen unterschieden.

2.10 Isolierung, Aufzucht und Aufbewahrung von eukaryotischen Zellen

2.10.1 Kultivierung primärer Zellen und Zelllinien

Die Kultivierung der COS-1 Zelllinien und der primären Kulturen neonataler Kardiozyten erfolgte in einem 37°C Brutschrank (Heraeus) bei 95%iger Luftfeuchtigkeit in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre. Die Handhabung der Zellen und Kulturmedien erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank (Heraeus).

2.10.2 Isolierung neonataler Kardiomyozyten aus Ratten

Die Kultivierung und Isolierung der Kardiomyozyten aus dem Myokardgewebe neonataler Ratten wurde nach einem von Harary und Farley (1963) beschriebenen Prinzip durchgeführt. Das Protokoll der Isolierung wurde in modifizierter Form von Buja et al. (1985) übernommen. Der Verdau des grob homogenisierten Herzgewebes erfolgte hierbei nur mit einer Kollagenaselösung ohne Pankreatin. Neonatale Kardiomyozyten wurden nicht wie bei Vincent und Nadeau (1983, 1984) in einem Percollgradienten, sondern durch „differentielles Kultivieren“ („preplating“) (Blondel et al., 1971) angereichert. Dabei führt eine mehrstündige Inkubation der isolierten Zellen in fibronektinfreiem, neonatalem Kälberserum (NKS-Medium) zur Trennung der Kardiomyozyten von anderen Zellen, u.a. Fibroblasten. Neonatale Kardiomyozyten reichern sich im Medium an, während sich Fibroblasten am Boden der Kulturschale anheften. Der prozentuale Anteil pulsierender Kardiomyozyten liegt für eine solche Präparation bei mehr als 80% (Buja et al., 1985).

Ein bis drei Tage alte neonatale Ratten (Whistar white) wurden in einem Gefäß mit 70% Ethanol desinfiziert und anschließend dekapitiert. Die Herzen wurden nach dem Öffnen des Thorax aus dem Körper der Tiere herauspräpariert, in ADS-Puffer (s. Material Kap. 1.8.1) gewaschen und mit der Schere in kleine Stücke geschnitten. Das fein homogenisierte Gewebe wurde viermal für 40 min bei 37°C in einer Kollagenaselösung (0,5 mg/ml ADS-Puffer; 271 U/mg; Worthington Biochemical Corporation) im Schüttelinkubator langsam geschwenkt. Für den Verdau von 20 Herzen benötigte man für den ersten Inkubationsschritt 10 ml und für die folgenden drei Schritte jeweils 15 ml. Der Überstand des ersten Verdaus wurde verworfen. Nach den Verdauschritten 2-4 wurde die zellhaltige Kollagenaselösung vom Herzgewebe abgetrennt und die Zellen wurden durch Zentrifugieren (400 rpm, 5 min) angereichert. Nach Aspiration des Überstandes mit einer Saugvorrichtung wurde das Zellsediment jeweils in 20 ml NKS-Medium (1%; s. Material Kap. 1.10) aufgenommen, in eine Zellkulturschale überführt und im CO₂-Inkubator bei 37°C aufbewahrt. Nach dem letzten Verdauschritt erfolgte eine weitere zweistündige Inkubation der gesammelten Zellfraktionen im CO₂-Inkubator bei 37°C („differentielles Kultivieren“). Die mit Kardiomyozyten angereicherte Suspension wurde anschließend zentrifugiert (400 rpm, 5 min). Der Überstand wurde aspiriert, und das Zellsediment wurde in 5 ml Medium aufgenommen, das zusätzlich 5% fötales Kälberserum (FKS-Medium; s. Kap. 1.10) enthielt. Die Anzahl der isolierten Kardiomyozyten wurde in einer Neubauer Zählkammer bestimmt (s. Methoden Kap. 2.11). Mit

einer Konzentration von $0,4 \times 10^6$ Zellen/ml wurden die isolierten Kardiozyten auf fibronektinbeschichteten Zellkulturschalen ausplattiert (s. Methoden Kap. 2.10.3). Alle verwendeten Lösungen und Medien, mit Ausnahme des ADS-Puffers zum Waschen der Herzen, wurden vor Gebrauch auf 37°C erwärmt.

2.10.3 Fibronektinbeschichtung

Die Beschichtung der 6-Well Kulturschalen (1 ml/Well) und der „Lab Tek™ 2-well chamber slides“ (Nunc) Objektträger (600 µl/Well) mit Fibronektin (1 µg/ml Medium) erfolgte während des Präplattierens der Kardiozyten für 2 h bei 37°C in einem 95% O₂/5% CO₂ Brutschrank. Vor dem Plattieren der Zellen wurden die Fibronektin-Lösung aspiriert und die Schalen einmal mit Medium gewaschen.

2.10.4 Passagieren von COS-1 Zellen

Zum Passagieren der Zellen wurden diese zunächst mit 1x PBS (0,14 M NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3) gespült, mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (s. Material Kap. 1.10) abgelöst (10 min, 37°C) und in Zentrifugenröhrchen überführt. Durch Zugabe von serumhaltigem Medium (10% FKS) wurde das Trypsin in der Zellsuspension inaktiviert. Nach dem Abzentrifugieren (1.200 rpm, 5 min) wurden die Zellen in Wachstumsmedium (s. Kap. 1.10) aufgenommen und je nach Verwendungszweck in unterschiedlichen Dichten ausplattiert.

2.10.5 Einfrieren, Lagerung und Auftauen von COS-1 Zellen

Subkonfluente COS-1 Zellen einer Petrischale (Ø 10 cm) wurden trypsinisiert (s. Kap. 2.10.4), abzentrifugiert (1.200 rpm, 5 min) und in 2 x 2 ml DMSO-haltigem Medium (10% DMSO, 20% FKS, 70% Medium) aufgenommen und sukzessive eingefroren. Dabei wurden die Gefrierkulturen zunächst für 30 min auf Eis gestellt, dann 1 h bei -20°C gelagert, anschließend über Nacht bei -80°C eingefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

Für das Wiederanzüchten der Zellen wurde Wachstumsmedium vorbereitet. Nach dem schnellen Auftauen der Zellen in einem 37°C Wasserbad, wurden diese sofort in das vorbereitete Medium überführt und auf einer Petrischale (Ø 10 cm) ausplattiert. Nach

Inkubation über Nacht wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, um tote Zellen zu entfernen.

2.10.6 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl von neonatalen Kardiozyten und COS-1 Zellen in einem sehr kleinen Volumen Medium wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Hierfür wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:5 mit einer 0,4%igen Trypan-Blau-Lösung (Sigma) gemischt. Trypan-Blau lagert sich in die Membran abgestorbener Zellen ein und färbt diese blau. Vitale und tote Zellen bzw. Zelldebris sind auf diese Weise voneinander unterscheidbar. Bei der Bestimmung der Zellzahl werden nur die lebenden Zellen gezählt. Die Zellsuspension wurde zwischen Deckglas und Objektträger (Abstand 0,1 mm) gebracht. Es wurden 4 Quadrate mit einer Kantenlänge von 0,1 mm ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Das ausgezählte Volumen der Zellsuspension betrug 1 µl. Die Anzahl der Zellen/ml Medium wurde mit folgender Formel berechnet:

Gezählte Zellen x 10.000 x Verdünnungsfaktor Trypan-Blau = Zellen/ml Medium
(Verdünnungsfaktor Trypan-Blau = 1,25)

2.11 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Die Einführung von DNA in höhere Zellen wird als Transfektion bezeichnet, die u.a. auf chemische Weise, mit Hilfe von Elektroporation oder Liposomen erfolgen kann. Die Transfektion von COS-1 Zellen und neonatalen Kardiozyten diente der Expressionsanalyse plasmid-kodierter MyBP-Cs.

2.11.1 Transfektion von COS-1 Zellen mit Polyethylenimin (PEI)

Polyethylenimin (PEI) ist ein kationisches Polymer mit DNA-kondensierenden Eigenschaften und einer großen Pufferkapazität. In Zellkulturexperimenten wurde die sehr geringe Zytotoxizität belegt. Der polykationen-vermittelte Gentransfer schließt unter physiologischen Bedingungen die DNA-Aggregation und die Bindung der Polymer-DNA-Partikel an die anionischen Reste der Plasmamembran ein, die vermutlich durch Endozytose in die Zellen aufgenommen werden (Boussif, et al., 1995).

24 h vor der Transfektion wurden COS-1 Zellen mit einer Konzentration von $0,15 \times 10^6$ Zellen/ml in die Schalen (\varnothing 3,2 cm) einer 6-Well Platte ausplattiert. Am nächsten Tag hatten die Zellkulturen in der Regel eine 50-70%ige Konfluenz erreicht. Pro Transfektionsansatz wurden je 50 μ l PEI-Lösung und DNA-Lösung vorbereitet und nach kurzem Homogenisieren 10 min bei RT inkubiert. Das PEI-Gemisch wurde dann sukzessive der DNA-Lösung zugefügt. Anschließend wurde der PEI/DNA-Ansatz kurz durchmischt und erneut 10 min bei RT inkubiert. Vor der Zugabe der PEI/DNA-Lösung wurden die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen. Dann wurden 900 μ l Medium (ohne FKS, ohne Antibiotika) zu den Zellen gegeben. Danach wurde der PEI/DNA-Mix tropfenweise zugeführt. Nach 4 h Inkubation bei 37°C im CO₂-Inkubator wurde das Medium der Zellkultur mit 1 ml Wachstumsmedium mit doppelter Konzentration FKS und Antibiotika gemischt. Am nächsten Tag erfolgte ein Wechsel des Mediums. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere Analysen mit einem Lysepuffer (s. Kap. 2.11.2) geerntet.

<u>Ansatz PEI-Mix:</u>	5,0 μ l NaCl (1,5 M)	<u>Ansatz DNA-Mix:</u>	2,0 μ g DNA
	5,4 μ l PEI 50		5,0 μ l NaCl (1,5M)
ad	50 μ l ddH ₂ O	ad	50 μ l ddH ₂ O

2.11.2 Transfektion neonataler Kardiomyozyten mit Lipofektin

Der genaue Mechanismus der liposomen-vermittelten Aufnahme von DNA in eukaryotische Zellen ist bisher nur teilweise verstanden. Zwischen den positiv geladenen Lipiden und der negativen Ladung der DNA kommt es spontan zu elektrostatischen Interaktionen. Die Makromoleküle kondensieren dabei gemeinsam zu kompakten Lipid-DNA Strukturen (Liposomen). Die Fusion der Aggregate mit der hydrophoben Zellmembran führt dann vermutlich durch Endozytose zur Aufnahme der DNA in die Zellen.

Zur Transfektion neonataler Kardiozyten wurde das kationische Lipid Lipofektin™ (Invitrogen) verwendet. Lipofektin entspricht einer 1:1 (w/w) Liposomen-Formulierung der kationischen Lipide DOTMA und DOPE mit einer positiven Ladung/Molekül. Es eignet sich zur Transfektion von DNA (Felgner et al., 1987), von RNA (Malone et al., 1989) sowie von Oligonukleotiden (Chiang et al., 1991) in verschiedene Zelltypen. Für eine effiziente Transfektion war eine Optimierung von Lipid- und DNA-Konzentrationen mit den entsprechenden Zielzellen bei der gewünschten Plattierungsdichte notwendig. Außerdem

wurde vom Hersteller auf die Verwendung von serumfreiem Medium hingewiesen, da die im Serum enthaltenen sulfatisierten Proteoglykane und andere Proteine mit der DNA um die Bindung an die kationischen Lipide konkurrieren. Auf den Zusatz von Antibiotika sollte ebenfalls verzichtet werden, da dies zu vermehrter Zelltoxizität führen könnte.

Für die Transfektion neonataler Kardiozyten erwies sich das Verhältnis von 10 µg DNA zu 45 µl Lipofektin bei einer Plättungsdichte von $0,8 \times 10^6$ Zellen/35 mm Kulturschale als geeignet, um eine durchschnittliche Transfektionseffizienz von 1% zu erreichen. Höhere Transfektionsausbeuten wurden mit dieser Methode nicht erzielt.

Pro Transfektionsansatz wurden 10 µg DNA und 45 µl Lipofektin in jeweils 100 µl Transfektionsmedium (s. Kap. 1.10) in Mikroreaktionsgefäßen 30-45 min bei RT getrennt inkubiert. Die Vorinkubation von Lipofektin im Transfektionsmedium sollte die Aktivität des Reagenz erhöhen. Anschließend wurde die DNA-haltige Lösung in 12- bzw. 24-Loch Kulturschalen (Polystyren) überführt. Die Lipofektin-Lösung wurde dazugegeben, der Ansatz durchmischt und für weitere 15 min bei RT inkubiert. Nach der Komplexbildung von DNA und Lipofektin wurden jeweils 800 µl Transfektionsmedium zu den Ansätzen hinzupipettiert und kurz gemischt. Vor der Zugabe der Transfektionsansätze wurden die Zellen mit 1 ml erwärmtem Medium gewaschen. Nach 6 h Inkubation wurde das Transfektionsmedium aspiriert, die Zellen wurden erneut mit jeweils 1 ml Medium gewaschen und für weitere 48 h bei 37°C in Wachstumsmedium (5% FKS) kultiviert. Für weitere proteinbiochemische Experimente wurden die transfizierten Kardiozyten mit einem Lysepuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 1% Igepal-CA 630; 0,5% Natriumdeoxychelat; 0,1% SDS; 1mM PMSF) geerntet. Hierfür wurden die Zellen zunächst einmal mit 1 ml eiskaltem PBS (1x) gewaschen. Anschließend wurden jeweils 65 µl Lysepuffer in die Kulturschalen (35 mm) gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber von der Schale gelöst. Die Zellysate wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.12 β-Galaktosidase Reporter-gen-Nachweis

Der Nachweis der Expression des bakteriellen Reportergens β-Galaktosidase in transfizierten neonatalen Kardiozyten erfolgte durch eine histochemische *in situ* Färbung der Zellen mit dem unphysiologischen chromogenen Substrat X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-thiogalaktosid) (Edlund, 1985). Die Hydrolyse von X-Gal durch das Enzym β-Galaktosidase

führt zur Bildung eines unlöslichen Indigofarbstoffes und färbt Zellen, die das Protein exprimieren, blau. Dieses Verfahren diente der Optimierung und Ermittlung der Transfektionseffizienz in neonatalen Kardiozyten.

Zunächst wurden die Zellen zweimal mit 1 ml PBS (1x) gewaschen. Pro Schale (\varnothing 3,2 cm) wurde 1 ml einer 0,2%igen Glutaraldehydlösung (0,1 M NaH_2PO_4 , pH 7,0; 1 mM MgCl_2 ; 0,25% Glutaraldehyd) zur Fixierung zugegeben. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde die Fixierlösung entfernt und die Zellen dreimal mit jeweils 1 ml PBS (1x) gewaschen. Danach wurde zur Färbung der transfizierten Zellen pro Kulturschale 1 ml X-Gal-Lösung (0,2% X-Gal in Dimethylformamid; 1 mM MgCl_2 ; 150 mM NaCl; 3,3 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3 \text{H}_2\text{O}$; 3,3 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$; 10 mM NaH_2PO_4) zugegeben. Die zu färbenden Zellen wurden bei 37°C im CO_2 -Brutschrank für 3-12 h inkubiert. Danach wurde die X-Gal-Lösung entfernt und durch PBS (1x) ersetzt. Die blau gefärbten Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Auswertung dieser Versuche wurde durch die Anzucht der Zellen auf Schalen mit gerasterten Böden (160 Quadrate mit je 2 mm Kantenlänge) erleichtert. Die Platten konnten nach dem Färben für einige Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

2.13 Proteinbiochemische Methoden

2.13.1 Proteinbestimmung im Zellysat nach Bradford

Zur Bestimmung des Proteingehaltes in klaren Zellysaten wurde die kolorimetrische Methode von Bradford (1976) angewandt. Das Verfahren eignet sich für die Bestimmung von Proteinmengen von 1-10 μg und basiert auf der photometrischen Quantifizierung der Bindung eines Farbstoffes, Coomassie Brilliant Blau G-250, an ein unbekanntes Protein. Die Komplexbildung von Farbstoff und Protein führt zur Verschiebung des Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm. Vergleicht man die Verfärbung der zu ermittelnden Probe mit der Blaufärbung einer Verdünnungsreihe bekannter Konzentration, läßt sich die Menge an Protein in der Probe bestimmen.

3-5 μl klares Lysat wurde mit NaCl (0,15 M) auf ein Volumen von 100 μl aufgefüllt. Der Ansatz wurde mit 1 ml Bradford-Lösung (0,01% Coomassie Brilliantblau G-250; 5% Ethanol; 8,5% Phosphorsäure) gemischt und für 4-5 min bei RT inkubiert. In Abhängigkeit von der Proteinkonzentration trat eine Blaufärbung der Lösung ein. Die Proteinkonzentrationen der

Proben wurden gegen einen Kontrollwert (100 µl 0,15 M NaCl auf 1 ml Bradford-Lösung) in einem Photospektrometer (Amersham Pharmacia) bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Um die ermittelten Absorptionswerte mit der Proteinkonzentration im Lysat zu korrelieren, wurden BSA-Lösungen bekannter Konzentration (0,5-10 µg/ml) hergestellt. Mit Hilfe der ermittelten Absorptionswerte der BSA-Lösungen wurde eine Kalibrierungskurve erstellt.

2.13.2 Eindimensionale denaturierende SDS-Gelelektrophorese von Proteinen

Die SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) dient der Separation eines komplexen Gemisches von Proteinen entsprechend ihrem Molekulargewicht. Durch die Komplexbildung mit SDS erhalten die Proteine eine negative Ladung und wandern in einem vertikalen System zur Anode. Die verwendeten Polyacrylamidgele bestehen aus einem Trenngel, das von einem Sammelgel überlagert wird. Im Sammelgel werden die verschiedenen Proteine zunächst konzentriert. Nach der Elektrophorese können die Proteingele auf verschiedene Weise weiterbearbeitet und analysiert werden, u.a. mit Hilfe von Western Blot Analysen oder durch die Färbung mit Proteinfarbstoffen.

Vor der Elektrophorese wurden die in den Zellysaten enthaltenden Proteine 10 min bei 100°C in 4x SDS-Probenpuffer (200 mM Tris-HCl, pH 6,8; 12% SDS; 12% β-Mercaptoethanol (37%); 40% Glycerin; 0,4% Bromphenolblau) denaturiert und solubilisiert. Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Gelsystemen (Minigele). Die Konzentration der Proteine erfolgte in 5% Sammelgelen (5% Acrylamid-Mix (29:1)), 1 M Tris-HCl, pH 6,8; 10% SDS, 10% APS; 0,08% TEMED) bei einer Stromstärke von 20 mA, während die Auftrennung der Proteine in 6% oder 8% Trenngelen (6% bzw. 8% Acrylamid-Mix (29:1); 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 10% SDS; 10% APS; 0,08% TEMED) bei einer Stromstärke von 30-40 mA für ca. 3 h durchgeführt wurde. Als Elektrodenpuffer diente 1x Tris-Glycin/SDS-Puffer (5 mM Tris; 50 mM Glycin; 0,02% SDS). Die Proteingele wurden entweder in einer „Coomassie-Blau“-Lösung (Sambrook et al., 1989) angefärbt oder auf Nitrozellulosefilter transferiert (s. Kapitel 2.13.3).

2.13.3 Protein-Transfer (Western Blot)

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Gelen auf Nitrozellulosefilter (Towbin et al., 1979) wurde sowohl mit Hilfe des „Semidry“-Verfahrens (Transferapparatur S&S CarboGlas, Schleicher & Schuell) als auch als Elektrotransfer mit Hilfe einer „Mini-Trans Blot“-Kammer (BioRad) durchgeführt. Der „Semidry“ Proteintransfer erfolgte innerhalb eines diskontinuierlichen Puffersystems, wobei sich das Proteingel zwischen puffergesättigten Blotting-Papieren (Whatman 002; Schleicher & Schuell) befand, die in Kontakt mit den Elektroden standen. Da sich die Elektroden nah beieinander befinden entstehen hohe Feldstärken, die einen schnellen Transfer ermöglichen. Das Elektroblothing hingegen vollzieht sich in vertikaler Orientierung innerhalb eines kontinuierlichen Puffersystems. Das Gel befand sich in diesem Fall in einem Tank zwischen 2 großen Elektrodenschalen, vollständig umspült von Transferpuffer.

„Semidry“-Transfer:

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die SDS-Gele für einige Minuten in Puffer 1 (s. Kapitel 1.8.3)) inkubiert (Khyse-Andersen, 1984). Für den Transfer wurden drei Schichten Whatman 002 Filterpapier in Puffer 1 getränkt und auf die Kathode gelegt. Eine Lage Filterpapier, getränkt in Puffer 2 (s. Kap. 1.8.3), wurde darüber gelegt. Die in Puffer 2 angefeuchtete Nitrozellulose, sowie das Proteingel wurden dann darauf geschichtet. Den Abschluß bildeten drei in Puffer 3 (s. Kap. 1.8.3) getränkte Lagen Filterpapier. Geblottet wurde für 1 h bei einer Stromstärke von $0,8-1 \text{ mA/cm}^2$.

Elektrotransfer:

Der Transfer erfolgte über Nacht bei einer Spannung von 20 V oder für 1 h bei 100 V mit eisgekühltem Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Ethanol) im Kühlraum. Zuvor wurden die Gele 30 min im gleichen Puffer äquilibriert.

Zur Überprüfung des Transfers wurden die Filter in einer Ponceau S-Lösung (0,5% Ponceau S, 1% Eisessig) für 5 min bei RT reversibel gefärbt. Die Färbelösung wurde nach 10 min abgegossen, die Membranen in Wasser gewaschen und entfärbt. Das Trennmuster der auf dem Filter immobilisierten Proteine war nach dem Entfernen der Färbelösung in Form von roten Banden erkennbar.

2.13.4 Antikörpernachweis immobilisierter Proteine

Das sog. Immuno-Blotting (Burnette, 1981) dient der Identifizierung und Quantifizierung immobilisierter, spezifischer Antigene durch den Nachweis mit polyklonalen oder monoklonalen Antikörpern. Die Behandlung der Filter mit Lösungen, die Protein- oder Detergenz-Blockierungsreagenzien enthielten, führte zum Auffüllen unspezifischer Proteinbindungsstellen, während primäre Antikörper an spezifische Antigene banden. Bei der angewandten indirekten Nachweismethode wurden die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe anschließend an peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper gebunden. Der eigentliche Nachweis erfolgte mit Hilfe einer Chemilumineszenzreaktion.

Das in dieser Arbeit verwendete Chemilumineszenz-System (ECL+Plus-System, Amersham Pharmacia) ist eine nichtradioaktive Methode zum Nachweis spezifischer Antigene konjugiert an peroxidase-markierte Antikörper. Die Reaktion selbst beruht auf der enzym-vermittelten Oxidation eines zyklischen Diacylhydrazids, Luminol (Amersham Pharmacia). Der dabei entstehende Acridinester emittiert über einen langen Zeitraum ein intensives Licht, das auf einem Röntgenfilm als Schwärzung sichtbar gemacht werden kann (Akhaven-Tafti et al., 1994, 1995).

Zur Minimierung der unspezifischen Bindungsaktivität der immobilisierten Proteine wurden die Nitrozellulosefilter zunächst in 1x PBS-T (s. Kap. 1.8.3) mit 5% Magermilchpulver über Nacht bei 4°C schüttelnd inkubiert. Danach wurde das überschüssige Milchpulver durch kurzes Schwenken in 1x PBS-T entfernt. Die Blots wurden anschließend für 1 h bei RT mit der primären Antikörper-Lösung inkubiert. Hierfür wurde der primäre Antikörper in 1x PBS-T mit 1% Milchpulver entsprechend verdünnt. Für einen 8x8 cm großen Filter wurden ca. 4 ml Antikörper-Lösung benötigt. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper schlossen sich drei Waschschrte von je 15 min in 1x PBS-T an. Die Inkubation der Blots mit dem sekundären Antikörper erfolgte ebenfalls für 1 h bei RT in 1x PBS-T mit 1% Milchpulver. Danach wurden die Blots erneut dreimal mit 1x PBS-T für 15 min gewaschen. Wurden bei einem Experiment zwei primäre bzw. zwei sekundäre Antikörper verwendet, so erfolgte dies in einer Lösung, d.h. die Blots wurden in einem Schritt gleichzeitig mit dem primären Antikörper A und dem primären Antikörper B inkubiert. Für den Nachweis der protein-gebundenen Antikörper wurden die bei RT äquilibrierten Detektionsreagenzien A und B des ECL+Plus-Detektionssystems im Verhältnis 40:1 gemischt. Für die o.g. Filtergröße wurden ca. 2 ml Detektionslösung benötigt.

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen wurden die Blots nach dem letzten Waschen von überschüssigem Waschpuffer befreit und mit der Proteinseite nach oben auf eine Plastikfolie gelegt. Anschließend wurde die Detektionslösung auf die Membranen gleichmäßig aufgetragen und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde überschüssiges Detektionsreagenz durch Abtropfen von den Filtern entfernt. Die Blots wurden nun mit der Proteinseite nach unten auf eine neue Plastikfolie gelegt, glattgestrichen, um Luftblasen zu vermeiden und mit der Proteinseite nach oben in eine Röntgenfilm-Kassette gelegt. Röntgenfilme (Hyperfilm™ ECL, Amersham Pharmacia) wurden auf die Membranen gelegt, exponiert und entwickelt.

2.14 RT-PCR

Die enzymatische Amplifikation von RNA erfolgt unter Verwendung einer reversen Transkriptase (Frohman et al., 1988). Die einzelsträngige RNA dient der RNA-abhängigen DNA-Polymerase als Matrize und stellt von ihr eine DNA-Kopie her. In einer anschließenden PCR wird die cDNA dann vervielfältigt.

Im ersten Schritt wurde die mRNA, isoliert aus der Myektomiegewebeprobe eines Patienten, mit einer reversen Transkriptase und dem Primer 891 inkubiert. In dieser Reaktion wurde zunächst ein DNA-Strang synthetisiert. Anschließend wurde nach Zugabe des Primers 890 eine PCR-Reaktion durchgeführt. In einer zweiten, sog. „nested“ PCR mit den Primern 928 und 1311 wurde das DNA-Fragment vervielfältigt. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Sac* I und *Hind* III gespalten und in den Vektor pBluescript II SK (+/-) kloniert.

In einer weiteren RT-PCR wurde ebenfalls die mRNA aus dem Herzgewebe des Patienten und RNA, isoliert aus einem Kontrollherzgewebe, mit einer reversen Transkriptase und dem Primer 891 inkubiert. In der anschließenden PCR wurden die Primer 2177 und 2148 verwendet, wobei der Primer 2177 am 5' Ende biotinyliert war. Die zu verschiedenen Zyklen (Zyklen 16, 18, 20 und 22) erhaltenen biotin-markierten DNA-Fragmente wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran (Amersham Pharmacia) elektrogeblottet, UV-fixiert (90 s) und mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Detektionsprotokoll für biotinylierte DNA auf einem Röntgenfilm als geschwärzte Banden nachgewiesen (s. Kapitel 2.17).

Die genauen Bedingungen für die jeweiligen RT-PCR und PCR Reaktionen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit im Anhang aufgeführt.

2.15 *in vitro* Transkription

Bei diesem Verfahren handelt es sich um die zellfreie RNA-Synthese unter Verwendung entsprechend aufbereiteter Zellextrakte, ausgehend von klonierten DNA-Fragmenten. Diese stehen unter der Kontrolle eines RNA-Polymerase Promotors und liefern bei der Transkription genspezifische RNA im Mikrogrammbereich (Nielsen et al., 1986).

Für die *in vitro* Synthese von mRNA wurden das Riboprobe[®] *in vitro* Transkriptionssystem (Promega) sowie T7 RNA-Polymerase (Promega) verwendet. Die Produktion sog. „run off“-Transkripte definierter Länge erforderte die Linearisierung der Plasmid-DNA stromabwärts vom SV40 Polyadenylierungssignal. Dafür wurde das Restriktionsenzym *BsaB* I verwendet, das 11 Bp 3' zum SV40 Polyadenylierungssignal die pCIneo Plasmid-DNA schneidet. Eine zweite *BsaB* I Schnittstelle in der Vektorsequenz lag außerhalb des Transkriptionsbereiches und war damit ohne Bedeutung. Voraussetzung für eine vollständige Spaltung der jeweiligen cDNA war die Vermehrung der Plasmid-DNA in einem *dam⁻dcm⁻*-Bakterienstamm, da in *dam⁺dcm⁻*-Stämmen die *BsaB* I Restriktionsschnittstelle methyliert vorliegt und damit vor einer Spaltung geschützt ist. Die cDNA Konstrukte wurden aus diesem Grund im *E. coli* Stamm GM48 angezüchtet. Je 2 µg linearisierte Plasmid-DNA bzw. 1 µg Kontroll-DNA (pGEM Express positive control, Bestandteil des Kits) wurden in einem Transkriptionsansatz (20 µl) als Matrize eingesetzt. Im Anschluß an die Transkriptionsreaktion wurde die im Reaktionsansatz enthaltene Plasmid-DNA durch eine DNaseI-Behandlung (15 min, 37°C) abgebaut. Zur Entfernung verbliebener Proteine und Salze wurde die RNA in Phenol/Chloroform extrahiert, in Ethanol gefällt und anschließend in 24 µl DEPC-H₂O resuspendiert. Zur Überprüfung der Größen der Transkripte wurden Aliquots der *in vitro* Produkte in einem 1,2%igen Formaldehyd/Agarosegel (s. Kap. 2.7.3) aufgetrennt (Lehrach et al., 1977). Die Visualisierung der RNA-Banden erfolgte nach Anfärbung mit Ethidiumbromid (EtBr) unter UV-Licht.

<u>20 µl Reaktionsansatz:</u>	4,0 µl Transcription optimized 5x Buffer
	2,0 µl DTT (100 mM)
	0,5 µl Recombinant Rnasin Ribonuklease Inhibitor
	4,0 µl NTP-Mix (je 2,5 mM) Plasmid (1-2 µg)
	1,0 µl T7-RNA Polymerase (17 U/µl)

2.16 **in vitro** Transkription/Translation

Es handelt sich hierbei um ein biochemisches Verfahren, bei dem DNA bzw. RNA zellfrei *in vitro* translatiert wird (Tabor et al, 1985; Studier et al., 1986). Als zellfreies System dienen Zellextrakte aus Weizenkeimen oder aus Retikulozyten vom Kaninchen. In erster Linie wird diese Methode zur Verifizierung der Produkte von klonierten Genen verwendet. Es ermöglicht außerdem die Analyse mutierter Genkonstrukte. Insbesondere werden Mutationen überprüft, von denen vermutet wird, das sie ein verkürztes Protein hervorrufen („Protein Truncation Test“, Promega, 1996). Die synthetisierten Proteine werden anschließend mit Hilfe einer Western Blot Analyse charakterisiert.

Für die *in vitro* Translation klonierter MyBP-C cDNA wurde das T7-TNT[®] Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) verwendet. Das angewandte System kombinierte die *in vitro* Transkription mit der Translation in einem Retikulozytenlysat, so daß beide Reaktionen in einem Ansatz gekoppelt durchgeführt wurden. Um für diese Experimente eine möglichst RNase-freie DNA zu verwenden, wurde die Plasmid-DNA zunächst in Phenol/Chloroform extrahiert. Die Reaktionsansätze (50 µl) enthielten jeweils 1 µg Plasmid-DNA, 1 mM Methionin und 40 µl TNT[®] Quick Master Mix. Die Reaktionen wurden für 90 min bei 30°C inkubiert.

<u>50 µl Reaktionsansatz:</u>	TNT Quick Master Mix	40 µl
	Methionin (1 mM)	1 µl
	Plasmid-DNA (1 µg)	
	DEPC-H ₂ O ad	50 µl.

Nach der Reaktion wurden die Proben sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.17 Nachweis biotin-markierter DNA auf Nylonmembranen

Zum Nachweis immobilisierter biotin-markierter RT-PCR Fragmente wurde das „Southern-Light™ und Southern-Star™“ Chemilumineszenz Detektionssystem (Tropix) verwendet. Biotin-markierte DNA-Fragmente werden bei dieser Methode indirekt mit einer streptavidin-gekoppelten Alkalischen Phosphatase (AVIDx-AP™, Tropix) identifiziert. Bei einer enzymatischen Dephosphorylierungsreaktion des direkten Chemilumineszenzsubstrats CDP-Star™ durch die DNA-gebundene Alkalische Phosphatase wird Licht mit einer Wellenlänge von 461 nm emittiert. Diese Lichtemissionen entsprechend behandelter DNA-Blots werden auf einem Röntgenfilm als Schwärzungen sichtbar.

Zunächst wurden die Nylonmembranen 2x 5 min in Blockierungspuffer (0,5 ml/cm²) gewaschen und dann für 10 min im selben Puffer (1 ml/cm²) schüttelnd inkubiert. Es folgte eine Inkubation von 20 min bei RT mit einer AVIDx-AP Konjugat-Lösung (5 ml), wobei das Konjugat zuvor 1:5.000 in Blockierungspuffer verdünnt wurde. Danach wurden die Blots mehrmals gewaschen: 1x 5 min in Blockierungspuffer (0,5 ml/cm²), 3x 5 min in Waschpuffer (1 ml/cm²) und 2x 2 min in Assay Puffer. Anschließend wurden die Blots abgetropft, auf eine Plastikfolie gelegt und mit einer CDP-Star „Ready-to-use“ Substrat-Lösung besprüht und 5 min inkubiert. Überschüssige Substratlösung wurde dann entfernt. Die Blots wurden erneut in Plastikfolie eingeschlagen und in eine Röntgenfilm-Kassette gelegt. Röntgenfilme (Hyperfilm™ ECL, Amersham Pharmacia) wurden auf die Membranen platziert, exponiert und entwickelt.

2.18 Immunzytochemie

Mit Hilfe von fluoreszein-markierten Antikörpern können Strukturen (Antigene) der Zelle sichtbar gemacht werden, da sie im Fluoreszenzmikroskop mit Licht einer spezifischen Wellenlänge (Quecksilber-Dampflampe oder Laser) zum Leuchten angeregt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich indirekte Immunfluoreszenz-Methoden durchgeführt. Das Verfahren erlaubt es, zwei oder mehr Antigene zur gleichen Zeit im gleichen Präparat zu erfassen. Dies geschieht durch Fluorochrome, die durch Licht verschiedener Wellenlänge angeregt werden und Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittieren. Die Nachweismethode ist sehr sensitiv, da eine Signalamplifikation erfolgt, wenn mehrere sekundäre Antikörpermoleküle an ein einzelnes primäres Antikörpermolekül binden.

Bei der Färbung der transfizierten neonatalen Kardiozyten handelte es sich um Doppelfärbungen. Zu diesem Zweck wurde die indirekte Immunfluoreszenz-Methode mit der indirekten „Avidin-Biotin“ Methode kombiniert. Beim indirekten Nachweis ist der primäre Antikörper, der an das Antigen bindet, unkonjugiert. Er wird durch einen sekundären, gegen ihn gerichteten und konjugierten Antikörper nachgewiesen. Bei dem Avidin-Biotin Nachweis hingegen ist der sekundäre Antikörper biotinyliert. Biotin besitzt eine hohe Bindungsaffinität zu dem Hühnereiweiß-Glykoprotein Avidin. Dieses kann durch Streptavidin, ein Protein von *Streptomyces avidinii*, ersetzt werden. Streptavidin, konjugiert mit Cy-2 oder Cy-3, bindet in einem dritten Schritt an den biotinylierten Sekundärantikörper. Es kommt zur Verstärkung des Signals, da mehrere Cy-2 bzw. Cy-3-Streptavidinkomplexe an Biotin (4 Bindungsstellen) binden können.

2.18.1 Färbeprotokoll für die immunzytochemische Färbung von Gewebeschnitten eines Kontroll-Herzgewebes

Die Objektträger wurden während der Inkubationszeiten in feuchten Kammern aufbewahrt, um ein Verdunsten der Lösungen und ein Ausbleichen zu verhindern. Dies gilt auch für das Färbeprotokoll 2.18.2.

Tab. 7: *Protokoll für die immunzytochemische Färbung von Herzgewebeschnitten*

Nr.	Arbeitsschritte	Reagenzien	Temp.	Zeit
1	Fixierung	4 % PFA	RT	4 min
2	Spülen	PBS	RT	3 x 3 min
3	Blockierung	0,1 % BSA	RT	15 min
4	Spülen	PBS	RT	3 x 3 min
5	Inkubation	1. Antikörper: R76	RT	1 h
6	Spülen	PBS	RT	3 x 3 min
7	Inkubation	2. Antikörper: Biotin-SP-conjugated anti-rabbit IgG	RT	1 h
8	Spülen	PBS	RT	3 x 3 min
9	Inkubation	Cy-2 Streptavidin	RT	45 min
10	Spülen	PBS	RT	3 x 3 min
11	Kernfärbung	Propidiumdijodid	RT	10 min
12	Spülen	PBS	RT	3 x 3 min
13	Eindecken	Mowiol	RT	

2.18.2 Färbeprotokoll für die immunzytochemische Färbung von transfizierten neonatalen Kardiocyten

Tab. 8: *Protokoll für die immunzytochemische Färbung von Kardiocyten*

Nr.	Arbeitsschritte	Reagenzien	Temp.	Zeit
1	Fixierung	4 % PFA	RT	4 min
2	Spülen	PBS	RT	3 x 3 min
3	Permeabilisierung	0,05 % Triton-X	RT	25 min
4	Spülen	PBS	RT	3 x 3 min
5	Blockierung	0,1 % BSA	RT	15 min
6	Spülen	PBS	RT	3 x 3 min
7	Inkubation	1. Antikörper: anti-c-myc, 9E10	4°C	ü N
8	Spülen	PBS	RT	3 x 3 min
9	Inkubation	2. Antikörper: Biotin-SP conjugated anti-mouse	RT	3 h
10	Spülen	PBS	RT	3 x 3 min
11	Inkubation	Cy-2 Streptavidin	RT	2 h
12	Spülen	PBS	RT	3 x 3 min
13	Inkubation	1. Antikörper: anti-Titin, z1z2	4°C	ü N
14	Spülen	PBS	RT	3 x 3 min
15	Inkubation	2. Antikörper: Rhodamin-conjugated anti-rabbit IgG	RT	2 h
16	Spülen	PBS	RT	3 x 3 min
17	Kernfärbung	Toto	RT	10 min
18	Spülen	PBS	RT	3 x 3 min
19	Eindecken	Mowiol	RT	

Die Seitenwände der Plexiglaskompartimente wurden nach Schritt 13 entfernt. Die in Schritt 17 durchgeführte Kernfärbung wurde nicht bei allen Präparaten durchgeführt.

Fixierung mit 4 % PFA (Paraformaldehyd)

Aldehydfixierung führt zu einer Quervernetzung von Amino-, Amido- und anderen Gruppen. Sie bewirkt eine gute Strukturhaltung.

Permeabilisierung mit 0,05 % Triton-X

Triton-X bewirkt die Durchlässigkeit der Zellmembran. Dies ist Voraussetzung für eine effiziente Diffusion der Antikörper in die Zelle. Außerdem werden durch das Detergenz hydrophobe Interaktionen zwischen den Antikörpern und Zellen verhindert.

Herabsetzung der unspezifischen Bindung mit 0,1 % BSA

BSA wird eingesetzt, um freie reaktive Gruppen abzusättigen und dadurch mögliche Hintergrundreaktionen des Antikörpers zu minimieren.

Inkubation der Kardiozyten mit dem Primärantikörper

Die primären Antikörper wurden mit Inkubationspuffer verdünnt und die Zellen mit je 400 µl dieser Lösung beschichtet.

Inkubation der Kardiozyten mit den Sekundärantikörpern bzw. Detektionsreagenzien

Die Verdünnung dieser Substanzen erfolgte in der gewünschten Konzentration in PBS, pH 7,4. Die Präparate wurden mit je 400 µl Kammer bzw. 800 µl/Objektträger überschichtet.

Eindecken der Präparate

Ein mit Mowiol bestrichenes Deckgläschen wurde auf den noch feuchten Objektträger gelegt und leicht angedrückt, so daß mögliche Luftblasen zum Rand entweichen konnten. Die Objektträger wurden im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Das Mowiol polymerisiert dabei aus und die Präparate werden vor dem Ausbleichen geschützt.

2.19 Konfokale Lasermikroskopie und Bildverarbeitung

Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie beruht auf drei grundlegenden Merkmalen (Lichtman, 1994):

1. Es wird nur ein sehr kleines Areal beleuchtet.
2. Das von dem Areal emittierte Licht wird auf die Öffnung einer brennpunktgleich (konfokal) ausgerichteten Blende fokussiert.
3. Das Präparat wird im Rasterverfahren abgetastet.

Aufgrund dieser Eigenschaften liefert ein konfokales Mikroskop ein hochaufgelöstes Bild in einer beliebigen Ebene des Präparates.

Die Laserstrahlen, die ursprünglich aus einer Lochblende kommen und der Anregung der Fluoreszenz dienen, werden zunächst durch einen Spiegel in ein Objektiv gelenkt. Dieses bündelt das Laserlicht auf einen Punkt in der gewünschten Tiefe des Präparates. Das von dort emittierte Licht wird vom Objektiv erfaßt und durch einen Spiegel auf die Öffnung einer weiteren Lochblende fokussiert, hinter der sich der Detektor befindet. Hierbei dient der zweite Spiegel als Strahlenteiler und die zweite Lochblende als konfokale Blende. Diese ist für eine

scharfe Abbildung entscheidend, da unerwünschtes Streulicht abgeschirmt wird. Zur Wiedergabe einer kompletten Fläche wird der Laserlichtstrahl im Rasterverfahren sehr schnell über das Präparat bewegt. Während dieser Rasterung in der Z-Ebene (Tiefe) entsteht eine Serie von Schichtbildern. Diese digitalen optischen Schnitte wurden auf eine Octane-Workstation zur weiteren Bearbeitung übertragen. Mit dem Software Programm Imaris wurde eine Art der Bilddokumentation, der sog. „extended focus“ erstellt. Die in der Z-Ebene aufgenommenen Einzelschnitte werden hierbei in einer Fokusebene abgebildet, wobei für jeden Punkt im Endbild der größte Helligkeitswert aus allen Schnitten ausgewählt und dargestellt wird. Weiterhin wurden Schattenprojektionen erstellt, die einen dreidimensionalen Eindruck vermittelten. Im Programm „Selima“ wurden die erstellten Bilder gespeichert und dokumentiert. Die Bilder wurden mit dem Graphikprogramm Adobe® Photoshop weiterbearbeitet und mit einem Tintenstrahldrucker (Epson) ausgedruckt.

2.20 Densitometrie

Die einzelnen Röntgenfilme wurden mit einer CCD Kamera aufgenommen und als TIF-Datei gespeichert. Mittels der Bio-Profil® Image Analysis Software (LTF Labortechnik) wurde die Schwärzungsintensität der Proteinbanden auf den Röntgenfilmen von MyBP-C und Aktin in einer Gelspur bestimmt und zueinander in Relation gesetzt.

2.21 Statistik

Aus den einzelnen Werten von Meßreihen wurde der Mittelwert gebildet und der Standardfehler (SEM, „standard error of mean“) berechnet. Zum Vergleich der Mittelwerte wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt (ANOVA). Waren die Voraussetzungen dafür nicht gegeben, wurden die Gruppen mit dem Kruskal-Wallis und Dunn´s Test verglichen.

III Ergebnisse

1 Klinische und genetische Analyse einer Familie mit hypertropher Kardiomyopathie

Die aus einer vorausgegangenen Untersuchung einer Familie mit hypertropher Kardiomyopathie erhaltenen Daten dienten als Grundlage der vorliegenden Arbeit (Moolman et al., 2000). Insgesamt 49 Mitglieder einer großen Familie (Familie EA, Abbildung 3) wurden sowohl einer genetischen als auch einer klinischen Analyse unterzogen. Die Untersuchungen beziehen sich dabei auf die Generationen III-V. Über Generation I liegen keine Daten vor. Innerhalb der zweiten Generation standen keine lebenden Mitglieder für eine Untersuchung zur Verfügung. Die in dieser Generation als Genträger vermuteten Personen waren bekanntermaßen herzkrank. Weitere Details sind über Generation II nicht bekannt. Die klinische Identifizierung der Indexpatientin (IV-20) mit den in der Einleitung beschriebenen typischen Symptomen einer hypertrophen Kardiomyopathie, in Verbindung mit einer Obstruktion der linksventrikulären Ausflußbahn, erfolgte im Alter von 46 Jahren. Der Krankheitsverlauf der Indexpatientin erforderte als therapeutische Maßnahme eine operative Myektomie. Das Gleiche gilt für den Bruder der Probandin (IV-22), der im Alter von 38 Jahren die ersten HCM Symptome entwickelte. Innerhalb der Familie sind zwei Fälle von plötzlichem Herztod im Alter von 35 bzw. 33 Jahren (II-6 und IV-9) aufgetreten.

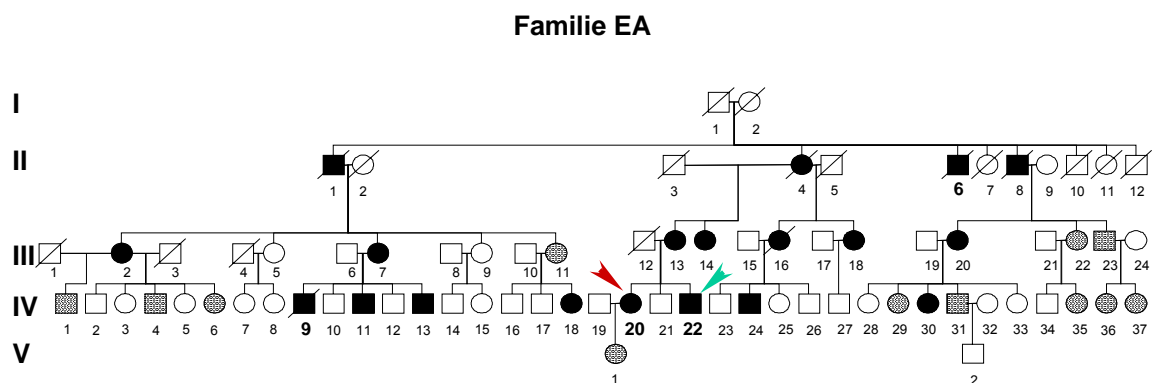


Abbildung 3: Stammbaum der Familie EA. Kreise symbolisieren weibliche und Quadrate männliche Familienmitglieder. Die Symbole verstorbener Familienmitglieder sind durch einen diagonalen Strich gekennzeichnet. Symptomatische Genträger sind durch schwarz ausgefüllte Symbole dargestellt, während schraffierte Zeichen asymptotische Genträger markieren. Die Familienmitglieder II-6 und IV-9 starben infolge eines plötzlichen Herztodes. Der rote Pfeil markiert die Indexpatientin. Der grüne Pfeil weist auf den Spender der Myektomiegewebeprobe hin.

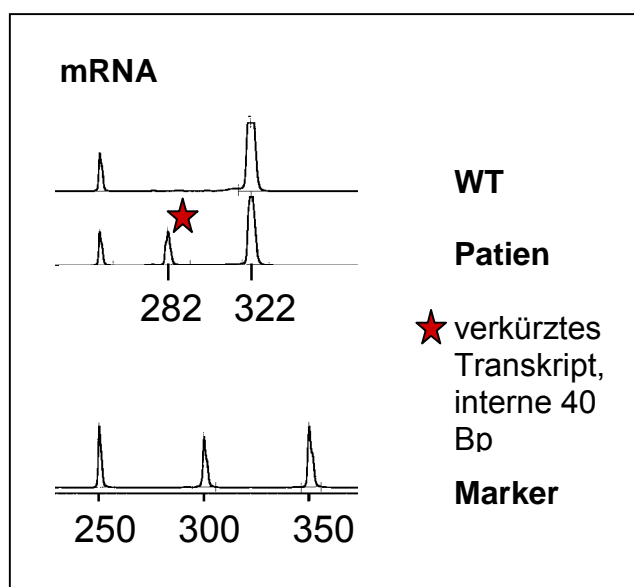
1.1 Klinische Charakterisierung der Familie EA

Die klinische Analyse der 49 Familienmitglieder beruhte auf der Anamnese, der körperlichen Untersuchung, der Elektrokardiographie sowie der zweidimensionalen Echokardiographie und Dopplersonographie. Angaben zur Familiengeschichte über mögliche krankheitsbedingte Todesfälle innerhalb der Familie dienten der Identifizierung verstorbener Mitglieder, die als mögliche Genträger zu diskutieren waren. Anhand der genetischen Analyse wurden 26 von 49 evaluierten Familienmitgliedern als Genträger identifiziert. Zusätzlich wurde ein im Alter von 33 Jahren an plötzlichem Herztod verstorbenes Familienmitglied (IV-9) ebenfalls als wahrscheinlicher Genträger definiert. Die klinische Evaluierung führte, aufgrund der unterschiedlichen Phänotypen unter den einzelnen Genträgern, zur Einteilung der betroffenen Familienmitglieder in drei Gruppen: 37% aller Genträger zeigten eindeutige Symptome hypertropher Kardiomyopathie, während 18,5% nur geringfügige, milde Symptome im Zusammenhang mit HCM aufwiesen und 44,5% als asymptomatisch, ohne klinische HCM eingestuft wurden. Die ersten Anzeichen hypertropher Kardiomyopathie traten im Fall der symptomatischen Genträger im Alter von 29 - 68 Jahren auf, im Durchschnitt somit in einem Lebensalter von mehr als 44 Jahren. Ebenso zeigte die Krankheit innerhalb der Familie, trotz der beiden Fälle von plötzlichem Herztod, einen im allgemeinen milden Verlauf mit guter Prognose. Die Überlebensrate der Genträger im Alter von 50 Jahren beträgt >90%. Diese Daten bestätigen die Beobachtung von relativ später Erstmanifestation der HCM-Formen, die durch MyBP-C Mutationen verursacht werden (Niimura et al., 1998; Charron et al., 1998). Anzumerken ist jedoch im Zusammenhang mit der durchgeführten Familienanalyse: Hat sich der Krankheitsphänotyp erst einmal entwickelt, bestehen auch für Patienten mit der beschriebenen Mutation (s. Ergebnisse Kap. 1.2) die Risiken der bekannten HCM Komplikationen. Zusammenfassend läßt sich der Phänotyp der Krankheit in der untersuchten Familie EA durch inkomplette Penetranz und eingeschränkte Expressivität charakterisieren.

1.2 Nachweis einer Mutation in genomischer DNA und cDNA des MyBP-C Gens

Die Familie EA eignete sich aufgrund ihrer Größe für eine Kopplungsanalyse. Diese führte zur Identifizierung des kardialen Myosinbindungsprotein C Gens (*MYBPC3*) auf Chromosom 11 als krankheitsrelevantes Gen. Der Genlokus 11p11.2 (GenBank) war bereits als Kandidatengen im Zusammenhang mit HCM bekannt (Bonne et al., 1995; Watkins et al., 1995). Ebenso war das gehäufte Auftreten von Mutationen in bestimmten Regionen innerhalb

des Gens bei entsprechenden Analysen festgestellt worden (Carrier et al., 1997). Dies ermöglichte eine gezielte Suche nach Mutationen im humanen kardialen MyBP-C Gen. Im Zuge der (hier kurz rekapitulierten) Mutationsanalyse ergab die Fragmentlängenanalyse an myokardialer mRNA synthetisierter cDNA, im Falle des Patienten IV-22, eine Fragmentlängendifferenz in der Region von Exon 24-26 des MyBP-C Gens (Exon-Nummerierung entsprechend Niimura et al., 1998). Durch RT-PCR wurde, wie erwartet, ein 322 Bp großes Fragment und zusätzlich ein um 40 Bp verkürztes Fragment (282 Bp) nachgewiesen (Abbildung 4). Dies war der erste Hinweis für eine veränderte Sequenz im MyBP-C Gen in dieser Region. Die Sequenzierung der klonierten RT-PCR Fragmente führte zur Identifizierung einer Deletion von 40 Bp am 3'Ende von Exon 25. Dieser Befund ließ auf modifiziertes Spleißen schließen. Durch die Sequenzierung klonierter genomischer PatientendNA wurde der Nachweis der Insertion eines einzelnen Guanins in Exon 25 (zwischen Codon 791 und Codon 792) erbracht. Das inserierte Guanin an dieser Position innerhalb der genomischen DNA konvertiert die Sequenz AGTGGG in AGGGTGGG, eine Sequenz, die damit die Qualität einer kryptischen 5'Spleiß-Donor-Stelle hat. Die Basen AG definieren dabei das 3'Ende des Exons, während die Sequenz GTGGG den Anfang einer außerplanmäßigen Intronsequenz markiert (Abbildung 5). Die Deletion der 40 Bp am 3'Ende von Exon 25 ist somit die Folge einer aberrant prozessierten mRNA. Damit verbunden ist eine



Leserahmenverschiebung, die zu einem vorzeitigen Stop-Codon (Codon 808 im neuen Leserahmen) in Exon 26 führt (Abbildung 5). Das Ergebnis einer vorzeitigen Translationstermination wäre ein um 40 kD verkürztes MyBP-C. Dem mutierten Protein, mit einer zu erwartenden Größe von ca. 95 kD, würden die C-terminalen Bindungsstellen für Myosin und Titin fehlen.

Abbildung 4: Fragmentlängenanalyse myokardialer cDNA. Dargestellt ist die interne Verkürzung myokardialer cDNA, die in der Region von Exon 24-26 des MyBP-C Gens identifiziert wurde. WT, Wildtyp-Fragment (322 Bp); verwendet wurde die myokardiale cDNA einer Kontrollperson. MT, Wildtyp-Fragment (322 Bp) und verkürztes cDNA-Fragment (★, 282 Bp). Die untersuchte cDNA wurde an mRNA aus einer Myektomiegewebeprobe des Patienten IV-22 der Familie EA amplifiziert. Marker, Länge der verwendeten DNA-Marker (in Bp). (Abbildung entnommen aus Moolman et al., 2000.)

Ein verkürztes Protein wäre auch dann zu erwarten, wenn kein modifiziertes Spleißen stattfindet, da eine Leserahmenverschiebung infolge der Insertion nach Bp Position 2.525 zu einem Terminationscodon (Codon 832 im neuen Leserahmen) führen kann. Eine derartige mRNA bzw. cDNA wurde jedoch nicht beobachtet.

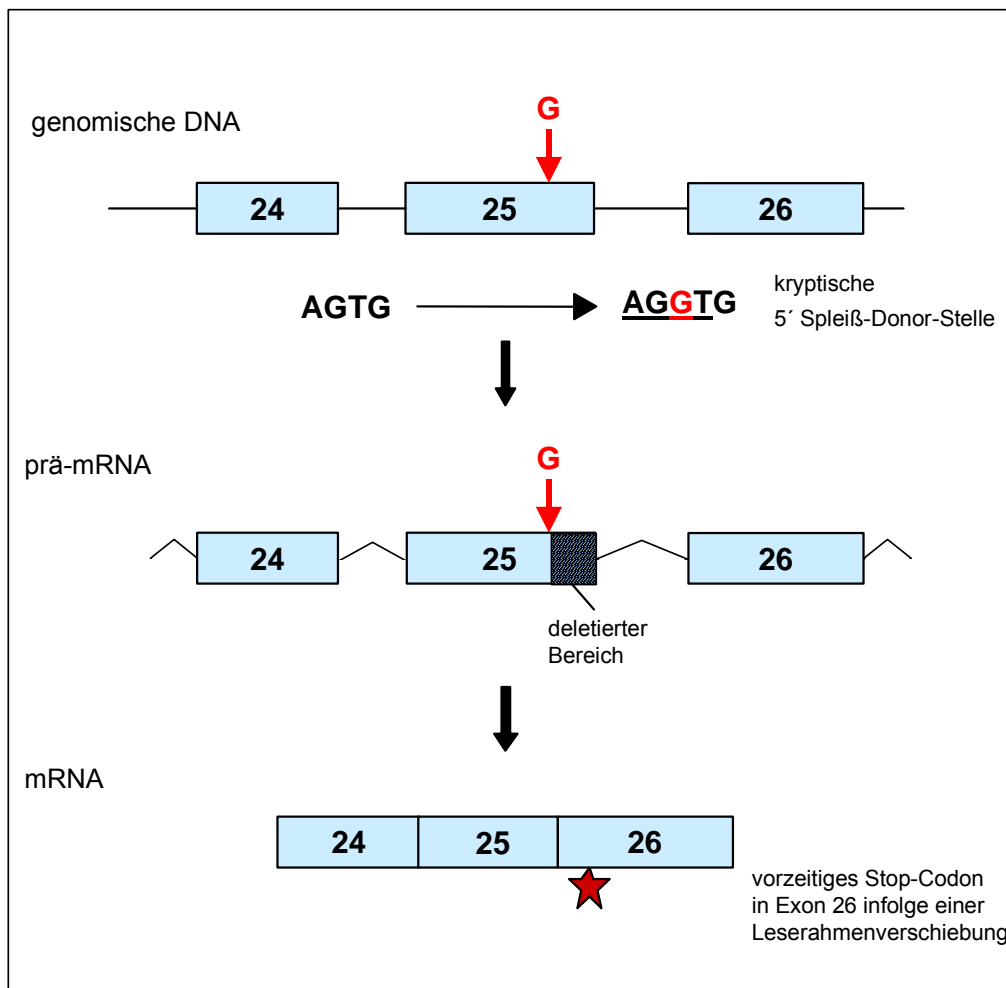
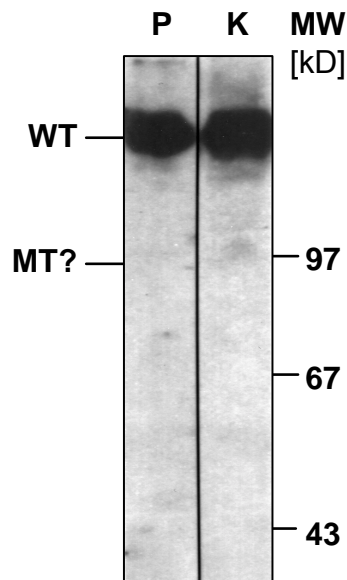


Abbildung 5: Konsequenzen der Insertion eines Guanins in Exon 25 des MYBP-C Gens. Die Position der Guanin-Insertion (G) in Exon 25 der genomischen DNA wird durch einen roten Pfeil markiert. Durch die Insertion entsteht eine unplanmäßige 5' Spleiß-Donor-Stelle; daraus resultiert die Deletion von 40 Bp am 3' Ende von Exon 25 in der zugehörigen mRNA. Das vorzeitige Stop-Codon in Exon 26 ist mit einem roten Stern markiert.

1.3 Analyse der MyBP-C Expression in Myektomiegewebe

In weiteren Versuchen wurde geprüft, ob ein verkürztes MyBP-C in der verfügbaren Myektomiegewebeprobe des Patienten IV-22 nachweisbar ist. In einer Western Blot Analyse



mit zwei polyklonalen anti-MyBP-C Antikörpern (spezifisch für die N-terminalen Proteindomänen C0C1 und C1C2) wurde jedoch nur das 137 kD große, native MyBP-C erkannt. Ein verkürztes Protein mit einer Größe von 95 kD war nicht nachweisbar (Abbildung 6). Immunhistochemische Untersuchungen des betroffenen Herzgewebe ließen zudem nur eine normale Sarkomerstruktur erkennen (persönliche Mitteilung von Prof. Gautel, London).

Abbildung 6: Western Blot Analyse von Gesamtprotein aus der Myektomiegewebeprobe des Patienten IV-22. 20 µg der Gesamtproteinfraktion wurde auf ein 5%iges SDS-Polyacrylamidgel geladen. Die geblotteten Proteine wurden mit einem polyklonalen Kaninchen anti-MyBP-C IgG und einem biotinylierten Maus anti-Kaninchen IgG sowie einer Streptavidin-gekoppelten Peroxidase nachgewiesen. P, Proteinfraktion, isoliert aus dem Herzgewebe des Patienten IV-22. K, Proteinfraktion, isoliert aus einem Kontroll-Herzgewebe. MW entspricht dem Molekulargewicht von Markerproteinen (in kD). WT markiert die Position des nativen MyBP-C Proteins (137 kD), während MT auf die erwartete Position des verkürzten Proteins hinweist. (Abbildung entnommen aus Moolman et al., 2000.)

2 Nachweis des vorzeitigen Stop-Codons in der mRNA des Patienten zum Ausschluß einer RNA-Editierung

Sowohl die Insertion eines Guanins in Exon 25 auf genomischer Ebene als auch die Deletion von 40 Basenpaaren am 3'Ende von Exon 25 auf mRNA Ebene waren bereits anhand von Sequenzierungen nachgewiesen (Moolman et al., 2000). Das Vorhandensein des vorzeitigen Stops in der Position des Codons 808 innerhalb der mutierten mRNA, hervorgerufen durch eine Leserahmenverschiebung infolge der 40 Bp Deletion, war jedoch noch nicht durch eine entsprechende Sequenzierung belegt. Die von J. Moolman klonierten und sequenzierten RT-PCR Produkte schlossen diese Region der cDNA nicht mehr mit ein. Die Existenz dieses vorzeitigen Stop-Codons stand außerdem zur Diskussion, da ein verkürztes MyBP-C im Herzgewebe des Patienten IV-22 nicht nachweisbar war. Die Abwesenheit des vorzeitigen

Stop-Codons könnte durch eine sog. Edition der mutierten mRNA erklärt werden (Powell et al., 1987; Benne, 1990). Bei der RNA-Edition handelt es sich um eine posttranskriptionelle Modifikation, die im Rahmen einer Leserasterkorrektur zur Veränderung des mutierten Transkripts und somit zur Aufhebung des Stop-Codons geführt haben könnte. Die Folge wäre ein Protein, das sich in der Länge nur durch das Fehlen von 13 Aminosäuren im Bereich der Codons 792-804 vom nativen MyBP-C unterscheiden würde. Dieser Größenunterschied von ca. 1,43 kD wäre in der vorgenommenen Western Blot Analyse nicht zu erkennen gewesen.

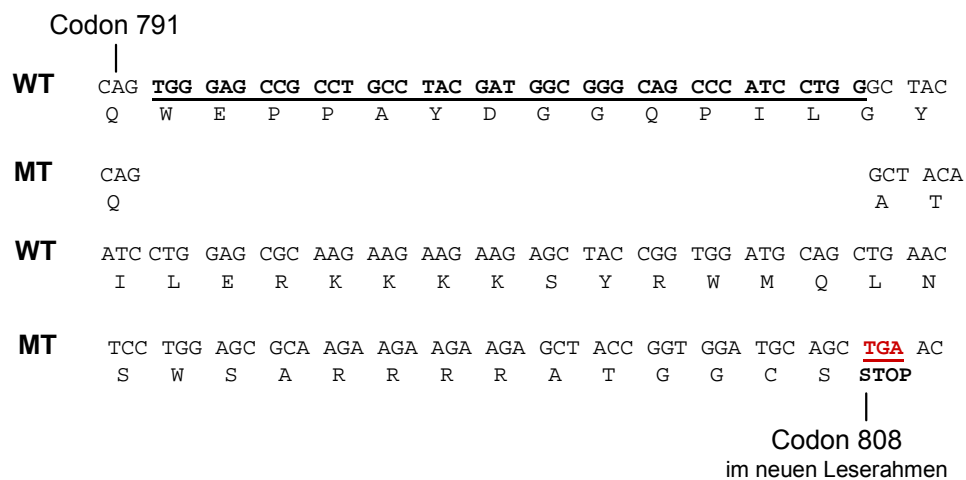


Abbildung 7: Nachweis des vorzeitigen Stop-Codons in der mutierten mRNA. Schematische Darstellung der WT und mutierten (MT) cDNA Teilsequenz in Exon 25 und 26. Gekennzeichnet ist das Codon 791 im nativen Leserahmen und das vorzeitige Stop-Codon (in roter Schrift) in Position Codon 808 im neuen Leserahmen. Der deletierte Bereich (40 Bp) ist unterstrichen. Durch die Leserahmenverschiebung stehen die folgenden 16 Codons für eine vom WT abweichende Aminosäuresequenz.

Zum Nachweis des vorzeitigen Stop-Codons in der mutierten mRNA des Patienten IV-22 wurden RT-PCR Produkte kloniert und sequenziert, die die Region von Exon 23 bis Exon 27 umfassten. Für die RT-PCR Reaktion wurde die aus der Myektomiegewebeprobe des Patienten IV-22 isolierte RNA (750 ng) verwendet. Die Synthese des ersten cDNA Stranges erfolgte in Anlehnung an die Versuche von J. Moolman mit dem Primer 891. Die Synthese des Gegenstranges wurde mit dem Primer 890 durchgeführt. In einer zweiten („nested“) PCR mit den Primern 928-SacI und 1311-HindIII wurde das RT-PCR Produkt vervielfältigt. Die erhaltenen Amplifikate mit einer Länge von 495 Bp und 455 Bp wurden über die mittels PCR eingefügten Schnittstellen *Sac* I und *Hind* III in den Vektor pBluescriptII-SK+ kloniert und anschließend in beide Richtungen mit den universellen Sequenzierprimern (M13 Forward und M13 Reverse) sequenziert. Die Sequenz des 495 Bp langen Fragmentes (Plasmid pBSII-

EW12) entsprach der cDNA Sequenz des kardialen MyBP-C Gens (Accession Nr.: X84075, GenBank). Das 455 Bp lange Fragment (Plasmid pBSII-EMG4) wies die bereits beschriebene Deletion der 40 Basenpaare am 3'Ende von Exon 25 auf und außerdem 48 Basenpaare stromaufwärts die erwartete Sequenz des vorzeitigen Stop-Codons (Codon 808 im neuen Leserahmen; siehe Abbildung 7 mit einem Ausschnitt aus der 455 Bp langen mutierten cDNA Teilsequenz; 16 Aminosäuren entsprechen nicht mehr der WT-Sequenz).

Mit dem Nachweis der Sequenz des vorzeitigen Stop-Codons in der mutierten mRNA des Patienten wurde eine mögliche Korrektur des Leserahmens auf mRNA Ebene ausgeschlossen.

3 Semiquantitative RT-PCR Analyse der mRNA aus betroffenem Herzgewebe

Als eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Abwesenheit des verkürzten MyBP-Cs im Herzgewebe des Patienten wurde der Abbau der mutierten mRNA in Betracht gezogen. Diesbezüglich lieferte die in Kapitel 2 beschriebene „nested“ PCR einen ersten Hinweis. Bei dieser Untersuchung wurde durch visuelle Inspektion festgestellt, dass das verkürzte RT-PCR Produkt am Endpunkt der durchgeführten PCR-Reaktion in geringerem Ausmaß amplifiziert wurde, als das native, nicht mutierte Produkt. Die direkte Ermittlung der jeweiligen WT und mutierten Transkriptmengen im Rahmen einer Northern Blot Analyse war jedoch nicht möglich, da die verfügbare Menge an Myektomiegewebe nicht ausreichte, um genügend RNA isolieren zu können.

Zum relativen Vergleich der Transkriptmengen im Herzgewebe des Patienten IV-22 wurde aufgrund der o.g. Gründe eine semiquantitative RT-PCR aus dem Bereich der Exons 24-26 sowohl mit der aus dem betroffenen Herzgewebe isolierten RNA (750 ng) als auch mit RNA (750 ng) aus einem Kontrollherzgewebe durchgeführt. Für die Synthese des ersten cDNA Stranges wurde der Primer 891 verwendet. Die anschließende Amplifikation des Erststranges erfolgte in einer PCR-Reaktion mit den Primern 2177 und 2148, wobei der Primer 2177 am 5'Ende biotinyliert war. Nach den Amplifikationszyklen 16, 18, 20 und 22 wurden jeweils Proben entnommen und zur Beendigung der Reaktion auf Eis gehalten. Die biotin-markierten Amplifikate (8 µl eines 20 µl Ansatzes, DNA-Menge ansteigend) der verschiedenen Zyklen wurden nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung (8%iges PAA-Gel) auf eine Nylonmembran elektrogeblottet, UV-fixiert und mittels eines Chemilumineszenz-

Detektionsprotokoll für biotinylierte DNA auf einem Röntgenfilm als geschwärzte Banden nachgewiesen (s. Methoden Kap. 2.19).

Die semiquantitative Analyse der biotin-markierten RT-PCR Produkte ergab (Abbildung 8), dass das amplifizierte WT cDNA-Fragment schon nach Zyklus 18 zu erkennen war, während die kürzere mutierte cDNA erst bei Zyklus 20 als Bande nachgewiesen wurde. Eine densitometrische Auswertung der Bandenstärke mit der Bio-Profil[®] Image Analysis Software (LTF Labortechnik) ergab bei Zyklus 20 eine 5-fache Mengendifferenz ($\Delta = 4,95$) zwischen der WT und der mutierten cDNA. Bei Zyklus 22 lag noch eine Mengendifferenz von $\Delta = 1,87$ zwischen beiden RT-PCR Produkten vor. Unter der Voraussetzung, dass beide Transkripte gleichmäßig effizient amplifiziert wurden, war das mutierte RT-PCR-Produkt bei dieser semiquantitativen Analyse unterrepräsentiert. Die unterschiedlichen Mengendifferenzen von Zyklus 20 und 22 basierten möglicherweise darauf, daß sich die durchgeführte PCR nach Zyklus 20 schon nicht mehr im linearen Bereich befand. Die für Zyklus 20 bestimmte Differenz von $\Delta = 4,95$ ist unter Vorbehalt als realistisch zu betrachten, da rein rechnerisch die Zunahme der Konzentration der Amplifikate innerhalb von zwei Zyklen $\Delta = 4$ ist. Eine Aussage über die tatsächlichen Mengenverhältnisse der verschiedenen Transkripte war mit dieser Analyse allerdings nicht möglich (s. Diskussion).

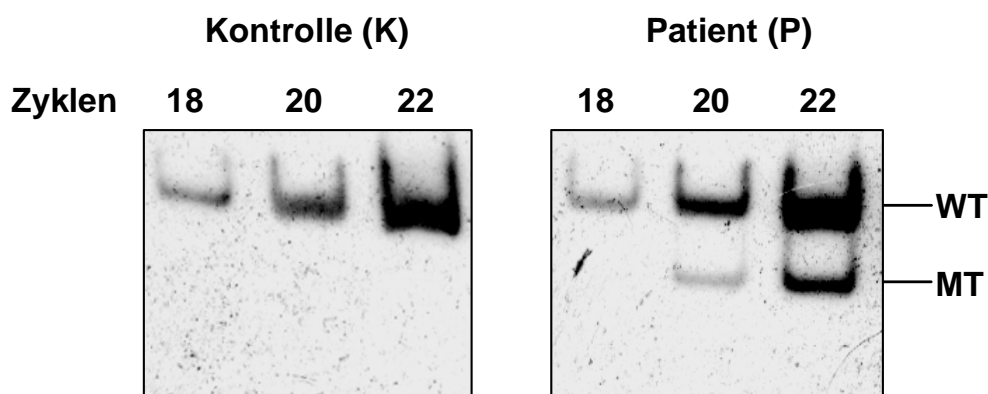


Abbildung 8: Nachweis mutierter mRNA durch semiquantitative RT-PCR Amplifikation myokardialer mRNA. K, biotin-markierte RT-PCR Fragmente nach 18, 20 und 22 Zyklen der RT-PCR. Amplifiziert wurde mRNA aus gesundem Kontrollherzgewebe. P, biotin-markierte RT-PCR Fragmente nach 18, 20 und 22 Zyklen der RT-PCR. Die verwendete mRNA wurde aus der Myektomiegewebeprobe des Patienten IV-22 isoliert. WT und MT bezeichnen WT und mutierte cDNA Fragmente. Es wurden jeweils 8 μ l der RT-PCR Reaktionsansätze (20 μ l) auf ein 8%iges PAA-Gel geladen. Der Nachweis der gebloeteten, biotin-markierten RT-PCR Produkte erfolgte mit Hilfe des Chemilumineszenz-Detektionsprotokolls für biotinylierte DNA.

Diese Daten wurden als erster Hinweis auf einen spezifischen Abbau des aberranten Transkriptes gedeutet. Die Bearbeitung dieser Problematik war jedoch nicht Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit. In erster Linie sollte geklärt werden, was mit dem mutierten MyBP-C geschieht, wenn es synthetisiert wird: Wird das Protein schnell abgebaut oder wird es in die Sarkomere eingebaut, und welchen Einfluss hat es dann auf die myofibrilläre Organisation von Kardiozyten?

4 Klonierung von Wildtyp und mutierter MyBP-C cDNA

Unter der Voraussetzung, dass die mutierte mRNA im Herzgewebe des Patienten (in geringerem Ausmaß, s. Ergebnisse Kap. 3) vorhanden ist, sollten die bereits o.g. Fragestellungen bezüglich der Synthese, ihrem Ausmaß und des Verbleibs des mutierten Proteins sowie mögliche Konsequenzen auf die sarkomere Struktur von Kardiozyten mit Hilfe von *in vitro* Experimenten und in *in vivo* Zellsystemen analysiert werden.

Expressionsanalysen mit entsprechend mutierten MyBP-C cDNAs sollten in nicht-kardialen und kardialen Zellen durchgeführt werden. Für diese Analysen wurden sowohl die vollständige cDNA des humanen kardialen MyBP-C Gens als auch zwei mutierte cDNA Versionen kloniert. In Abbildung 9 sind die erstellten Konstrukte und die entsprechenden Proteine schematisch dargestellt. Die als „Mutante I“ (MTI) bezeichnete mutierte cDNA enthielt die interne 40 Bp Deletion am 3'Ende von Exon 25 (Δ 2.406-2.445) und endete mit dem vorzeitigen Stop-Codon 808. Die MTI cDNA simuliert eine intakte mRNA bezüglich des vorhandenen Stop-Codons und sollte in *in vitro* Systemen und Zellkulturexperimenten zur Synthese eines 95 kD großen Fragmentes des MyBP-C Proteins Anlaß geben. Die als „Mutante II“ (MTII) bezeichnete mutierte cDNA hingegen spiegelt die real mutierte mRNA im Herzgewebe des Patienten IV-22 wider. MTII cDNA unterscheidet sich von der WT cDNA auf Sequenzebene nur durch die interne 40 Bp Deletion in Exon 25 (Δ 2.406-2.445). Aufgrund der Deletion kommt es jedoch zu der o.g. Leserahmenverschiebung (Stop, Codon 808). Trotz der bestehenden Längenunterschiede kodieren beide cDNAs sowohl MTI als auch MTII für dasselbe verkürzte MyBP-C.

Für *in vitro* Transkriptions- bzw. Translationsexperimente und für die Expression in eukaryotischen Zellsystemen wurden alle cDNA-Konstrukte in den für höhere Zellen geeigneten Expressionsvektor pCIneo über die Schnittstellen *Xho* I/*Mlu* I (WT/MTII) bzw.

Xho I/Sal I (MTI) subkloniert. Für die *in vitro* Transkription bzw. Translation stand in diesem Vektor die T7-Promotor Sequenz zur Verfügung, während die Expression der in den Vektor klonierten cDNA in eukaryotischen Zellen unter der Kontrolle der vergleichsweise starken, konstitutiven CMV-Enhancer/Promotor Regionen erfolgte.

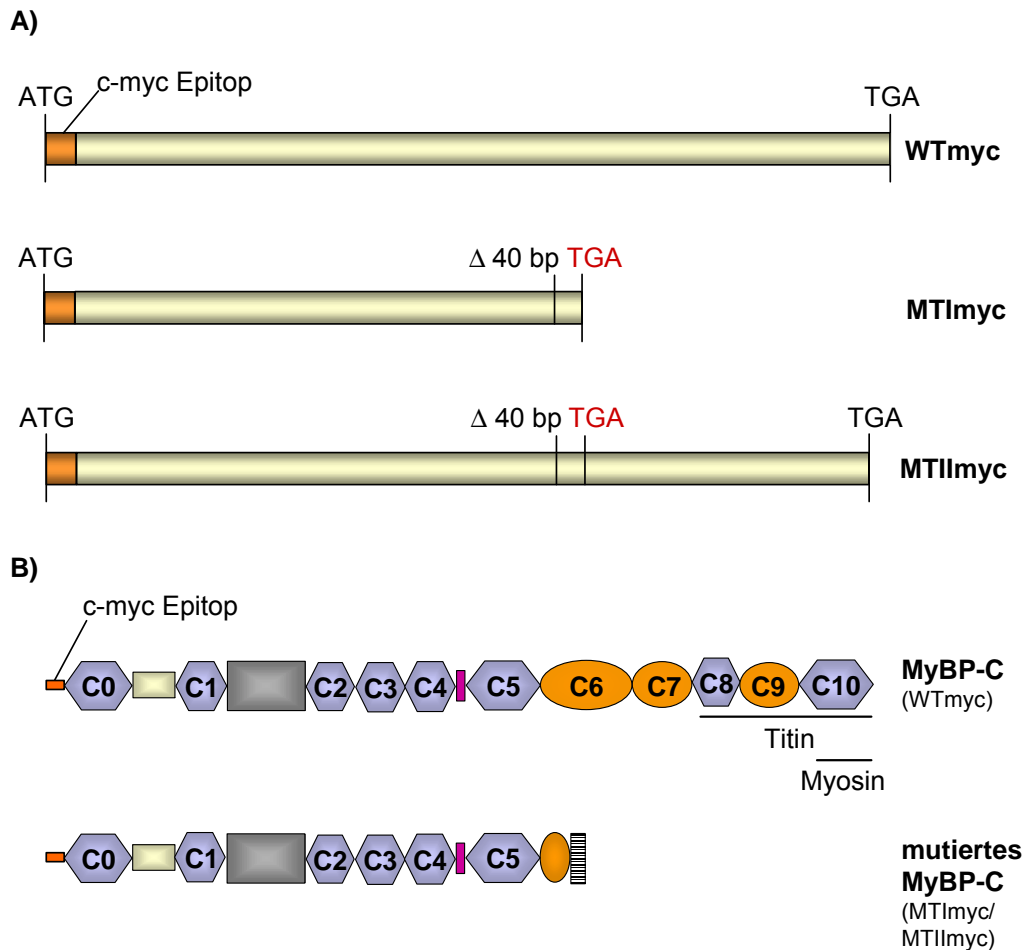


Abbildung 9: Schematische Darstellung von c-myc/MyBP-C cDNAs. **A)** Die kardialen MyBP-C cDNAs WTmyc, MTImyc und MTIImyc. Start- und Stop-Codon sowie die Positionen des vorzeitigen Stop-Codons und der internen 40 Bp Deletion sind eingezeichnet. Die Bezeichnung myc steht für die humane c-myc Epitop-Sequenz (30 Nt = 10 aa), deren Bereich angegeben ist. **B)** Die exprimierten MyBP-C Proteine in Form ihrer modularen Proteinsstruktur. Das kardiale Protein besteht aus Immunglobulindomänen und Fibronektindomänen . Das spezifische kardiale „MyBP-C motif“ wird durch symbolisiert. Die C-terminalen Bindungsstellen für Myosin und Titin sind unterstrichen und das c-myc Epitop ist eingezeichnet. Der quergestreifte Balken am C-terminalen Ende des verkürzten Proteins entspricht 16 Codons im neuen Leserahmen, die von der WT Aminosäuresequenz abweichen.

Neben den bereits beschriebenen cDNA Konstrukten (pCIneo-WT, pCIneo-MTI und pCIneo-MTII) wurde ein Satz von Wildtyp und mutierten cDNA Varianten mit jeweils einer zusätzlichen humanen c-myc Epitop-Sequenz (Evan et al., 1985; Kolodziej und Young, 1991) hergestellt (pCIneo-WTmyc, pCIneo-MTImyc und pCIneo-MTIImyc) (Abbildung 9).

4.1 Herstellung der Wildtyp MyBP-C cDNA

Die Klonierung der vollständigen humanen kardialen cDNA mit der Information für das WT MyBP-C (Abbildung 10) erfolgte unter Verwendung der überlappenden cDNA-Fragmente C0C1, C1C2, C2C5, C5C8 und C8C10 (freundlichst zur Verfügung gestellt von Prof. Gautel, London). Die Bezeichnung der Fragmente verweist auf die einzelnen Proteindomänen, aus denen sich das MyBP-C zusammensetzt (Carrier et al., 1997). Das heißt, die cDNA Sequenz des Fragmentes C0C1 kodiert für die Proteindomänen C0 und C1 usw. Alle cDNA-Fragmente befanden sich ursprünglich jeweils im selben Vektor (pET-6H) und waren alle über die Schnittstellen *Xho* I/*Mlu* I in den Vektor kloniert.

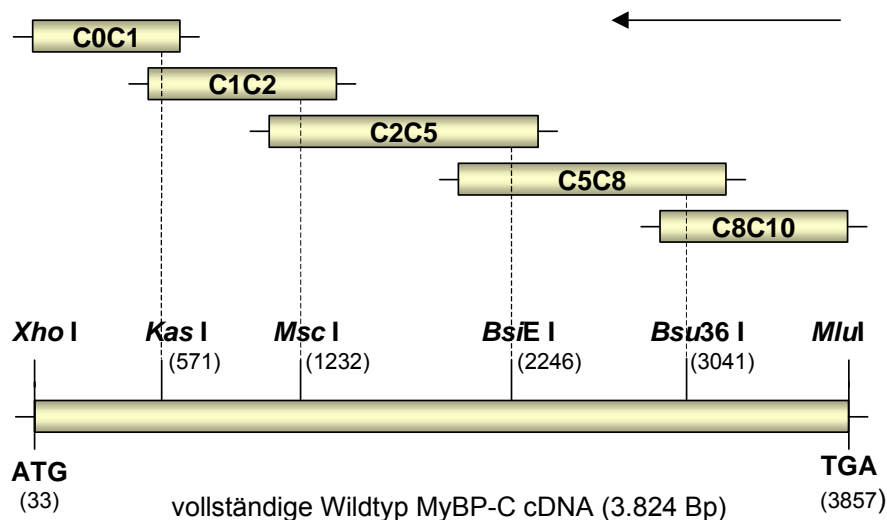


Abbildung 10: Klonierungsschema zur Herstellung der humanen kardialen cDNA des MyBP-C Gens. Die zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet. Alle überlappenden cDNA-Fragmente befanden sich im Vektor pET-6H und wurden beginnend mit C8C10 sukzessive in den Vektor pET-6H kloniert. Die Klonierungsreihenfolge ist mit einem Pfeil angegeben. Die Zahlenangaben in Klammern entsprechen den Bp Positionen innerhalb der MyBP-C cDNA (gemäß Accession Nr.: X84705, GenBank).

Die Ligation der einzelnen cDNA Subfragmente erfolgte im Ausgangsvektor pET-6H unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *Kas* I, *Msc* I, *BsiE* I und *Bsu36* I. Zur vollständigen cDNA-Klonierung wurde in 3'→5'-Richtung kloniert. Der erste Schritt war die Zusammenführung der überlappenden Fragmente C8C10 und C5C8 über die gemeinsame Restriktionsschnittstelle *Bsu36* I. Das daraus entstandene Fragment C5C10 wurde anschließend mit C2C5 über die im überlappenden Bereich befindliche Restriktionsschnittstelle *BsiE* I verbunden. Im nächsten Schritt wurden die Fragmente C2C10 und C1C2 über die gemeinsame Restriktionsschnittstelle *Msc* I zu C1C10 zusammengeführt.

Das letzte cDNA-Fragment C0C1 wurde schließlich unter Verwendung des Restriktionsenzym *Kas I* mit dem Fragment C1C10 verknüpft. Die aus diesen Klonierungsschritten hervorgegangene vollständige MyBP-C cDNA (Länge 3.824 Bp) erstreckt sich vom Translationsstart ATG (Bp 33-35) bis zum regulären Terminationscodon TGA (Bp 3.855-3.857). Die Integrität der Sequenz wurde mit Hilfe von Sequenzierungen überprüft. Anschließend erfolgte die Umklonierung in den Vektor pCIneo. Die Überprüfung der Sequenz sowie die Umklonierung in pCIneo gelten gleichermaßen für alle weiteren aufgeführten Konstrukte.

4.2 Herstellung der mutierten cDNA MTI

Die mutierte Variante MTI dieser cDNA mit einer Länge von 2.423 Bp wurde in zwei aufeinanderfolgenden Klonierungsschritten hergestellt: Das im ersten Klonierungsschritt verwendete klonierte, mutierte RT-PCR Fragment (F1) stammte aus einem cDNA-Klon, der von J. Moolman hergestellt worden war (Plasmid pBSIa-9, Abbildung 11). Diese cDNA entsprach der mutierten mRNA des Patienten der Familie EA, enthielt jedoch nicht den Sequenzbereich des vorzeitigen Stop-Codons. Durch die Ligation eines 34 Bp langen Abschnitts in Form eines doppelsträngigen Oligonukleotids (F2) wurde das mutierte RT-PCR-Fragment über die Restriktionsschnittstelle *Hha I* hinaus in 3' Richtung verlängert und endete mit dem vorzeitigen Stop Codon 808, gefolgt von einer *Sal I* Schnittstelle. In einem zweiten Klonierungsschritt entstand schließlich die cDNA MTI durch Ligation des 5'endständigen WT *Xho I/Acc I*-cDNA Fragmentes (F3) mit dem *Acc I/Sal I*-Fragment (F4).

4.3 Herstellung der mutierten cDNA MTII

Die Klonierung der mutierten cDNA MTII (Abbildung 12) beruhte auf dem Austausch eines internen 294 Bp langen *Acc I/Acc I*-Fragmentes (Bp 2.276-2.570) der Wildtyp cDNA gegen ein 254 Bp langes *Acc I/Acc I*-Fragment, das aus dem in Kapitel 2 beschriebenen mutierten RT-PCR Fragment (pBSII-EMG4) herausgeschnitten wurde. Das *Acc I/Acc I* Subfragment (F6, Abbildung 12) (Bp 2.276-2.570, mit einer Deletion von Bp 2.406-2.445) enthielt das vorzeitige Stop Codon 808.

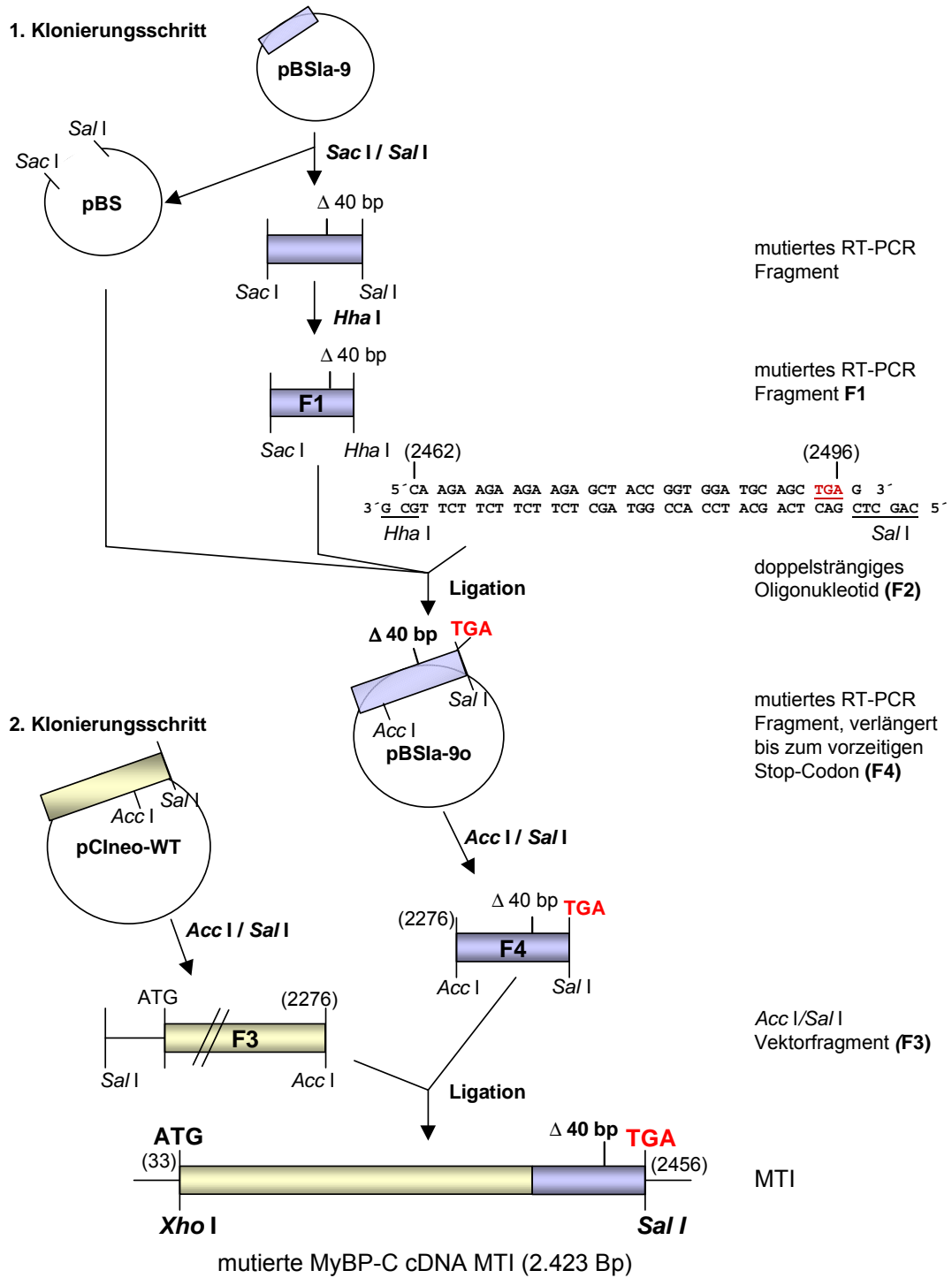


Abbildung 11: Klonierungsschema zur Herstellung des mutierten cDNA Konstruktes MTI. Die einzelnen Klonierungsschritte sind in Kapitel 4.2 erläutert.

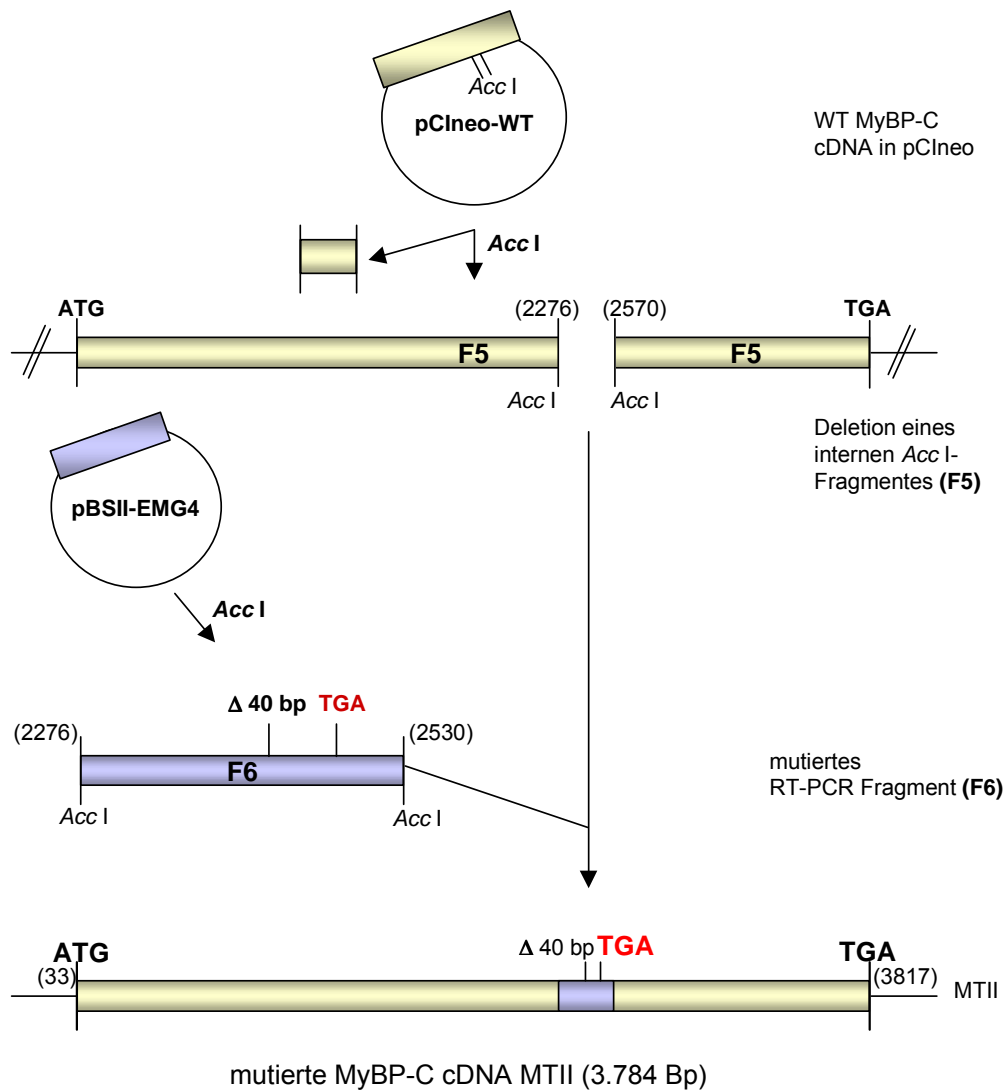


Abbildung 12: Klonierungsschema zur Herstellung der mutierten cDNA MTII. Das Konstrukt pCIneo-WT wurde mit *Acc* I geschnitten, um den MyBP-C Sequenzbereich von Bp Position 2.276-2.570 zu entfernen und das Fragment F5 zu erhalten. Ebenso wurde das Plasmid pBSII-EMG4 mit *Acc* I gespalten, und es wurde ein 254 Bp langes *Acc* I/*Acc* I Fragment isoliert, das dem mutierten RT-PCR Fragment entspricht (F6). Dieses Fragment enthielt neben dem Deletionsbereich das vorzeitige Stop-Codon 808. Das Fragment F6 wurde über die *Acc* I Klonierungsstellen in den Vektor F5 kloniert.

4.4 Einführung eines c-myc Epitops

Die Analyse der subzellulären Lokalisierung von transient exprimiertem humanem MyBP-C in transfizierten, neonatalen Kardiozyten erforderte die Einführung eines sog. „epitope tags“ (Kolodziej und Young, 1991) in die N-terminale proteinkodierende Sequenz der drei MyBP-C cDNA Varianten WT, MTI und MTII. Die antigenische Determinante wird bei dieser Technik

des „epitope tagging“ von einem spezifischen Antikörper erkannt und gebunden und ermöglichte auf diese Weise eine Unterscheidung zwischen dem endogenen MyBP-C und dem rekombinanten, exogenen c-myc/MyBP-C Fusionsprotein. Bei der inserierten DNA handelte es sich um die Sequenz (5'-GAG CAA AAG CTC ATT TCT GAA GAG GAC TTG-3'), die für das 9E10 Peptidepitop (EQKLISEEDL, Aminosäurereste 410-419) des humanen c-myc Proteins kodierte (Evan et al., 1985). Das mit dem MyBP-C fusionierte c-myc Epitop führt, soweit bekannt, zu keiner Beeinträchtigung der Funktion und der nativen Konformation des rekombinanten Proteins (Flavigny et al., 1999; Yang et al., 1998, 1999).

Die c-myc Epitop-Sequenz wurde über eine PCR in die cDNA eingeführt (exemplarisch dargestellt am Beispiel der WT cDNA, Abbildung 13). Für die PCR wurde neben der WT cDNA als Matrize der 5'-modifizierte Primer 1504 und der interne Primer 1503 verwendet. Der Primer 1504 enthielt an seinem 5'-Ende die Restriktionsschnittstellen *Nhe* I und *Xho* I, an die sich ein ATG Start-Codon und die c-myc Epitop-Sequenz anschlossen. Auf die Epitop-Sequenz folgte die MyBP-C cDNA, beginnend mit Bp 36-56. Diese Sequenz entspricht den Codons 2-8 des humanen MyBP-C Gens. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Xho* I und *Kas* I gespalten (F7, Abbildung 13). Die cDNA Konstrukte WT, MTI und MTII wurden ebenso vollständig mit *Xho* I und partiell mit *Kas* I gespalten. Die daraus entstandenen 3'-endständigen *Xho* I/*Kas* I Plasmidfragmente (F8) wurden isoliert. Durch die Ligation der 5'-endständigen c-myc/MyBP-C PCR-Fragmente (F7) mit den jeweiligen 3'-endständigen Plasmidfragmenten (F8) wurden die cDNA Konstrukte pCineo-WTmyc, pCineo-MTImyc und pCineo-MTIImyc kloniert.

Die erstellten Konstrukte dienten als Matrize für die Synthese der WT und mutierten c-myc/MyBP-C Fusionsproteine (WTmyc, MTImyc und MTIImyc, bereits schematisch dargestellt in Abbildung 9).

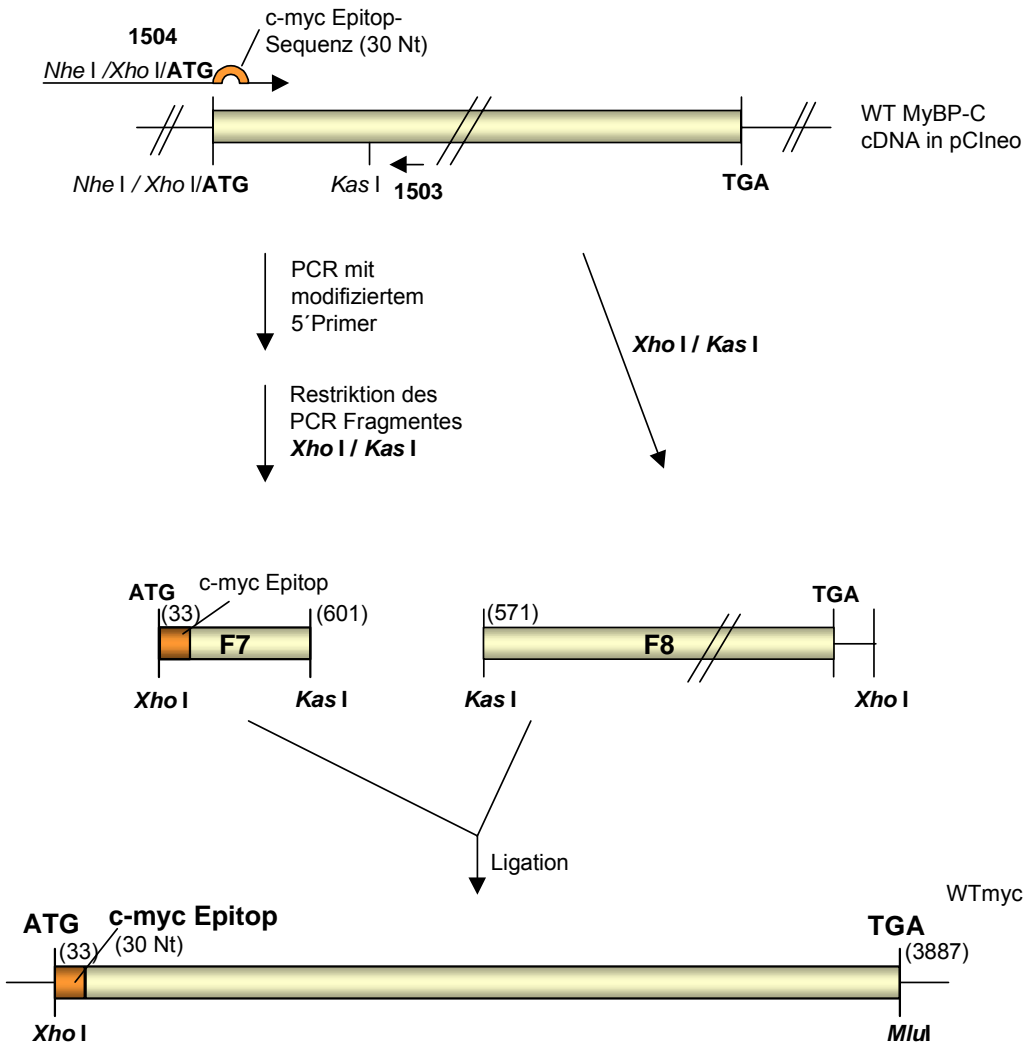


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Insertion der c-myc Epitop-Sequenz in die MyBP-C cDNA Sequenz am Beispiel der Wildtyp cDNA. Eingezeichnet sind die Positionen der verwendeten Primer 1504 und 1503. Das c-myc/MyBP-C PCR-Fragment (F7) wurde mit den Enzymen *Xho* I und *Kas* I gespalten. Die WT cDNA wurde mit denselben Enzymen geschnitten, und es wurde ein *Xho* I/*Kas* I Vektorfragment isoliert (F8). Dem Vektorfragment fehlten die ersten 538 Bp der MyBP-C cDNA Sequenz. Durch Ligation des c-myc/MyBP-C PCR-Fragmentes (F7) mit dem 3'endständigen Vektorfragment (F8) über die gemeinsamen Klonierungsschnittstellen *Xho* I und *Kas* I wurde die cDNA MTII_{myc} hergestellt.

5 Überprüfung der klonierten MyBP-C cDNAs durch *in vitro* Transkription/Translation

Die *in vitro* Transkription und die gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation der klonierten cDNA Konstrukte dienten als Vorversuche für die *in vivo* Expressionsanalysen in transfizierten nicht-kardialen und kardialen Zellen. Anhand dieser Versuche wurden die Transkriptlängen der klonierten cDNAs und die Eignung der hergestellten mRNAs zur Synthese von WT und mutierten MyBP-C Proteinen untersucht. Insbesondere war zu prüfen, ob in der MTII cDNA das vorzeitige Stop-Codon korrekt erkannt wird und zur Synthese eines verkürzten MyBP-Cs führt.

5.1 Analyse der Transkriptgrößen *in vitro* synthetisierter MyBP-C mRNAs

Für die *in vitro* Synthese der WT und mutierten MyBP-C Transkripte wurden das Riboprobe[®] *in vitro* Transkriptionssystem sowie T7 RNA-Polymerase verwendet (s. Methoden Kap. 2.15). In einem Standard-Transkriptionsansatz (20 µl) wurden je 2 µg linearisierte Plasmid-DNA bzw. 1 µg Kontroll-DNA (pGEM Express positive control, Bestandteil des o.g. Kits) eingesetzt. Zur Überprüfung der Größen der Transkripte wurden Aliquots der zuvor mit DNase behandelten Ansätze in einem 1,2%igen Formaldehyd/Agarosegel analysiert.

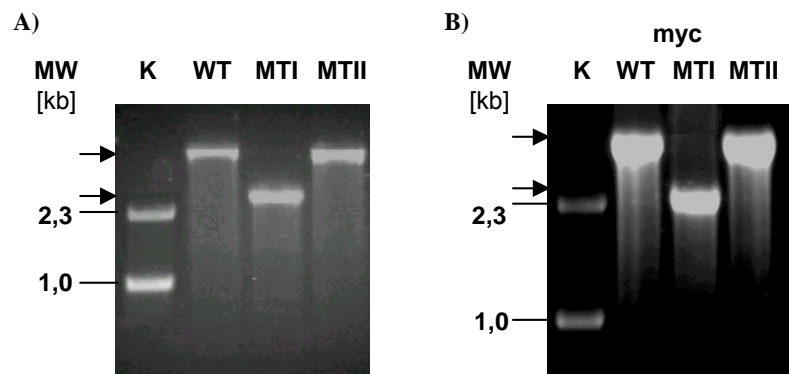


Abbildung 14: Größen von *in vitro* synthetisierter MyBP-C mRNA. **A)** *in vitro* Transkripte der cDNAs WT, MTI und MTII. **B)** *in vitro* Transkripte der cDNAs WTmyc, MTImyc und MTIImyc. 1,2%ige Agarose/Formaldehydgele wurden in **A)** mit je 1 µg RNA pro Transkriptionsreaktion beladen und in **B)** mit je 3 µg RNA pro Reaktionsansatz. K, Kontrolltranskripte, die gleichzeitig als Größenmarker (1,0 kb und 2,3 kb) dienen. Die Größe der nachgewiesenen Transkripte (in kb) wurde anhand der Kontrolltranskripte ermittelt. Die Position der Banden (gekennzeichnet mit Pfeilen) entspricht den erwarteten Größen von 4,1 kb (WT/WTmyc bzw. MTII/MTIImyc) und 2,7 kb (MTI/MTImyc).

In Abbildung 14 sind die Resultate von zwei separat durchgeführten Transkriptionsversuchen dargestellt. In Abb. 14A) sind die Ergebnisse für cDNAs ohne, und in Abb. 14B) für cDNAs mit c-myc Epitop gezeigt. Die unterschiedlichen Bandenstärken in Abb. 14A) und 14B) beruhen auf unterschiedlich analysierten RNA-Mengen ((A): analysierte RNA-Menge von je 1 µg; (B): analysierte RNA-Menge von je 3 µg). Die *in vitro* Transkription der cDNA Konstrukte WT, MTI und MTII bzw. WTmyc, MTImyc und MTIImyc zeigte bei visueller Inspektion keine oder nur geringe Unterschiede in den jeweiligen Transkriptmengen (Abbildung 14). Die Größenunterschiede entsprachen der Erwartung: WT bzw. WTmyc und MTII bzw. MTIImyc ergaben jeweils ein Transkript von ca. 4,1 kb und MTI bzw. MTImyc ein ca. 2,7 kb großes Transkript.

5.2 *in vitro* Synthese verkürzter MyBP-Cs

Für die *in vitro* Synthese von MyBP-C in verschiedenen Versionen wurde das T7 TNT[®] Quick Coupled Transcription/Translation System benutzt (s. Methoden Kap. 2.16). Dieser Kit kombiniert die Bestandteile der *in vitro* Transkription mit der Translation in einem Retikulozytenlysat. In einem Standard-Translationsansatz (50 µl) wurden je 1 µg Plasmid-DNA und 1 mM Methionin eingesetzt (genaue Reaktionsbedingungen s. Methoden Kap. 2.16). Zur Überprüfung der Antigenität und der Proteingröße (in kD) der Translationsprodukte wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Hierfür wurde jeweils ein Aliquot der Reaktionsansätze (6 µl) in einem 6 bzw. 8 %igen SDS-Polyacrylamidgel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die *in vitro* synthetisierten Proteine wurden mit dem polyklonalen anti-MyBP-C Antikörper (R76) nachgewiesen. Auch die c-myc/MyBP-C Fusionsproteine wurden mit R76 sichtbar gemacht. Die *in vitro* erhaltenen Mengen waren für einen Nachweis mit dem monoklonalen anti-myc Antikörper 9E10 zu gering.

Das wichtigste Ergebnis dieses Versuchs war der Nachweis von MyBP-C in den jeweils erwarteten Größen: Mit den cDNAs WT bzw. WTmyc wurde das 137 kD große, native MyBP-C erhalten, während mit den cDNAs MTI bzw. MTImyc und MTII bzw. MTIImyc ein verkürztes, 95 kD großes MyBP-C hergestellt wurde (Abbildung 15). Die transkribierten mRNAs waren funktionsfähig, denn *in vitro* führte in MTII das vorzeitige Stop-Codon an derselben Stelle zum Kettenabbruch, an der dieser in MTI zwingend stattfindet. In beiden Fällen hatte diese Translationstermination ein verkürztes MyBP-C zur Folge. Größere

Unterschiede in den einzelnen synthetisierten Proteinmengen wurden durch visuelle Inspektion nicht festgestellt. Außerdem bestand kein Unterschied bezüglich der Translatierbarkeit zwischen den cDNAs mit und ohne c-myc Epitop.

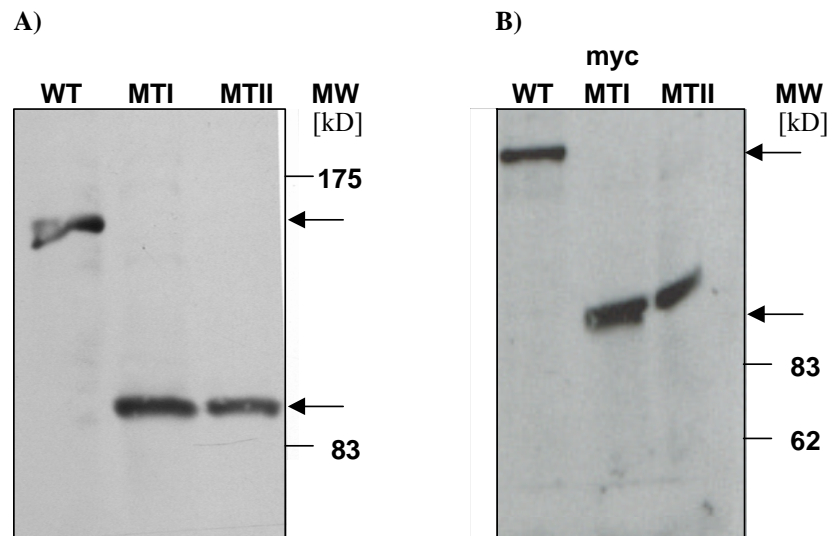


Abbildung 15: Immunologischer Nachweis der *in vitro* erhaltenen MyBP-C Translationsprodukte. Western Blot Analysen der *in vitro* transkribierten/translatierten cDNAs **A)** WT, MTI und MTII bzw. **B)** WTmyc, MTImyc und MTIImyc. Es wurden je 6 μ l der Translationsansätze (50 μ l) auf A) 6%igen und B) 8%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Zum Nachweis der geblohteten Proteine wurde der anti-MyBP-C Antikörper R76 verwendet. Das Molekulargewicht der nachgewiesenen Proteine (in kD) wurde anhand von Markerproteinen bekannter Größe (175 kD und 83 kD bzw. 83 kD und 62 kD) ermittelt. Die Position der Signale (gekennzeichnet mit Pfeilen) entspricht dem erwarteten Molekulargewicht von 137 kD (WT/WTmyc) und 95 kD (MTI und MTII bzw. MTImyc und MTIImyc).

6 Transiente Expression von MyBP-C in COS-1 Zellen

Die transiente Expression der Wildtyp und mutierten cDNA Konstrukte (mit und ohne c-myc Epitop-Sequenz) wurde zunächst in COS-1 Zellen überprüft. Die Verwendung dieses Zellsystems war der erste Schritt einer Analyse der Expression rekombinanter MyBP-C cDNAs nach Transfektion in Zellen verschiedener Spezifität.

6.1 Western Blot Analyse transient transfizierter COS-1 Zellen

Für die transiente Transfektion von COS-1 Zellen wurden jeweils $0,15 \times 10^6$ Zellen/ml in 6-Well-Platten (\varnothing 3,2 cm) ausplattiert. Nach 24 h waren die Zellen zu 50-70% konfluent und wurden mit einem Polyethylenimin (PEI)/DNA-Gemisch transfiziert (s. Methoden Kap. 2.11.1). Für einen Transfektionsansatz wurden jeweils 2 μ g Plasmid-DNA verwendet. 48 h

nach der Transfektion erfolgte die Proteinextraktion (s. Methoden Kap. 2.11.2) für eine anschließende Western Blot Analyse. Der Nachweis der Proteinexpression der rekombinanten WT und mutierten MyBP-C Proteine erfolgte im Immunoblot mit dem polyklonalen Antikörper R76. Für die Markierung der rekombinanten c-myc Fusionsproteine wurden sowohl der monoklonale anti-c-myc 9E10 Antikörper als auch der polyklonale Antikörper R76 eingesetzt. Für den Nachweis von Protein mit dem polyklonalen anti-MyBP-C Antikörper waren 5-15 µg COS-1 Rohextrakte ausreichend. Im Gegensatz dazu wurden 100-130 µg der gesamten Proteinfraction klarer Zellysate benötigt, um die entsprechenden c-myc/MyBP-C Proteinbanden mit dem anti-c-myc Antikörper nachzuweisen. Zur Normalisierung der geblotteten Proteinmengen diente der Nachweis zellulären Aktins mit einem monoklonalen anti-Aktin (Ab-1) Antikörper. Dieser Antikörper bindet an α -, β - und γ -Isoformen des Aktins verschiedener Spezies, u.a. auch an Aktin von Affen (s. das Datenblatt von Oncogene).

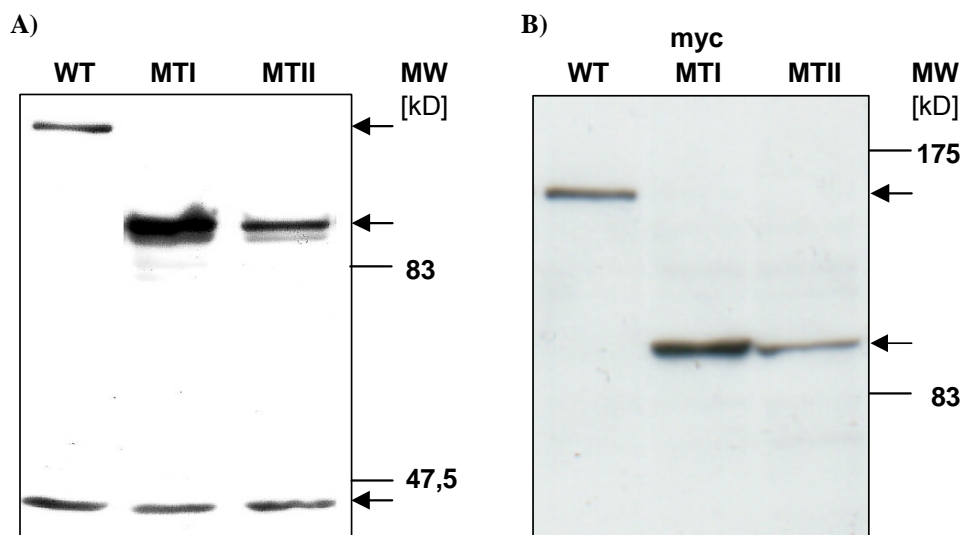


Abbildung 16: Immunologischer Nachweis der Expression von rekombinantem MyBP-C in COS-1 Zellen. Western Blot Analysen der in COS-1 Zellen transient synthetisierten MyBP-C Proteine **A)** WT, MTI und MTII bzw. **B)** WTmyc, MTImyc und MTIImyc. In A) wurden je 10 µg Gesamtprotein der COS-1 Zellysate in einem 8%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. In B) wurden je 130 µg Gesamtprotein der Zellysate analysiert, und es wurde ein 6%iges SDS-Polyacrylamidgel verwendet. Zum Nachweis der geblotteten Proteine wurde in A) der MyBP-C Antikörper R76 und in B) der monoklonale c-myc Antikörper 9E10 benutzt. Zur Normalisierung der geladenen Proteinmenge wurde in A) zelluläres Aktin mit dem monoklonalen Aktin Antikörper (Ab-1) markiert. Das Molekulargewicht der nachgewiesenen Proteine (in kD) wurde anhand von Markerproteinen bekannter Größe (83 kD und 47,5 kD bzw. 175 kD und 83 kD) ermittelt. Die Position der Signale (gekennzeichnet mit Pfeilen) entsprechen den erwarteten Proteingrößen von 137 kD (WT/WTmyc) und 95 kD (MTI/MTImyc und MTII/MTIImyc) sowie von 42 kD (Aktin).

In COS-1 Zellen wurden alle drei MyBP-C cDNA Varianten exprimiert, und zwar sowohl mit als auch ohne c-myc Epitop-Sequenz (Abbildung 16). Die rekombinanten Proteine zeigten die

erwarteten Größen (in kD). Mit der WT MyBP-C bzw. WTmyc MyBP-C cDNA wurde ein 137 kD großes Protein erhalten. Die mutierten cDNA Versionen MTI und MTII bzw. MTImyc und MTIImyc, die sich nur in ihrer cDNA-Länge unterscheiden, sonst aber für das gleiche verkürzte MyBP-C kodieren, wurden ebenfalls korrekt transkribiert und translatiert. In COS-1 Zellen wurde also das vorzeitige Stop-Codon der cDNA MTII als solches erkannt, und in beiden Fällen wurde ein verkürztes MyBP-C mit 95 kD synthetisiert. Der Nachweis der c-myc/MyBP-C Fusionsproteine mit beiden verwendeten Antikörpern demonstrierte außerdem, dass das in die Proteinsequenz eingeführte c-myc Epitop keine negativen Auswirkungen auf die Expression dieser rekombinanten Proteine hatte.

Es ist jedoch anzumerken, dass MTI stets deutlich stärker exprimiert wurde als WT und MTII (s. Abbildung 16 A) und B)).

6.2 Densitometrische Ermittlung der „steady state“ Expression von MTI und MTII in COS-1 Zellen

Die Hauptaussage, die aus den in Kapitel 6.1 beschriebenen Experimenten geschlossen wurde, war: Das vorzeitige Stop-Codon in der cDNA MTII wurde erkannt und die unterschiedlichen MyBP-C cDNA Versionen führten in COS-1 Zellen zu Genprodukten entsprechender Größe. Gleichzeitig wurden jedoch wiederholt Unterschiede in den Expressionsausbeuten zwischen MTI und den beiden anderen cDNAs, WT und MTII, deutlich. Daraus ergaben sich die Fragen, ob es sich hierbei um möglicherweise signifikante Expressionsunterschiede handelte und ob diese u.U. auf einen spezifischen Abbau des verkürzten MyBP-C Proteins MTII hinweisen. Zur Klärung dieser Fragestellungen wurde eine Reihe von unabhängigen Immunoblots densitometrisch ausgewertet.

In diese Auswertung wurden 5 unabhängige Transfektionsexperimente einbezogen. Bei zwei von diesen 5 Experimenten wurden sowohl die cDNAs mit und ohne c-myc verwendet, während bei den übrigen Versuchen nur die cDNAs ohne c-myc transfiziert wurden. Zum Nachweis der rekombinanten Proteinexpression wurde der polyklonale Antikörper R76 verwendet. Als Normalisierung der geladenen Proteinmengen diente der Nachweis von zellulärem Aktin mit dem monoklonalen anti-Aktin Antikörper. Die von den einzelnen Immunoblots hergestellten Röntgenfilme wurden mit einer CCD Kamera aufgenommen und als TIF-Datei gespeichert. Mit Hilfe der Bio-Profil[®] Image Analysis Software (LTF

Labortechnik) wurden die Schwärzungsintensitäten der Proteinbanden von MyBP-C und Aktin in einer Gelspur bestimmt und zueinander in Relation gesetzt. Die einzelnen Werte für jede exprimierte cDNA wurden gemittelt, die so erhaltenen „steady state“ Konzentrationen in Prozentwerten ausgedrückt und statistisch analysiert (s. Methoden Kap. 2.21).

Die densitometrische Bestimmung der Expressionsausbeuten der einzelnen rekombinanten Proteine bestätigte die visuelle Beobachtung. Das mutierte MyBP-C, kodiert von MTI bzw. MTImyc cDNA, wurde am stärksten exprimiert, während sowohl das rekombinante Wildtyp Protein als auch das verkürzte MyBP-C MTII (WT und MTII cDNA jeweils mit und ohne c-myc) um 20% bzw. 30% schwächer exprimiert wurden (Abbildung 17). Die Expressionsprofile der drei wiederholt getesteten cDNAs deuten an, daß MTI effizienter exprimiert wird als MTII oder Wildtyp MyBP-C, und zwar unabhängig von der Anwesenheit des c-myc Epitops.

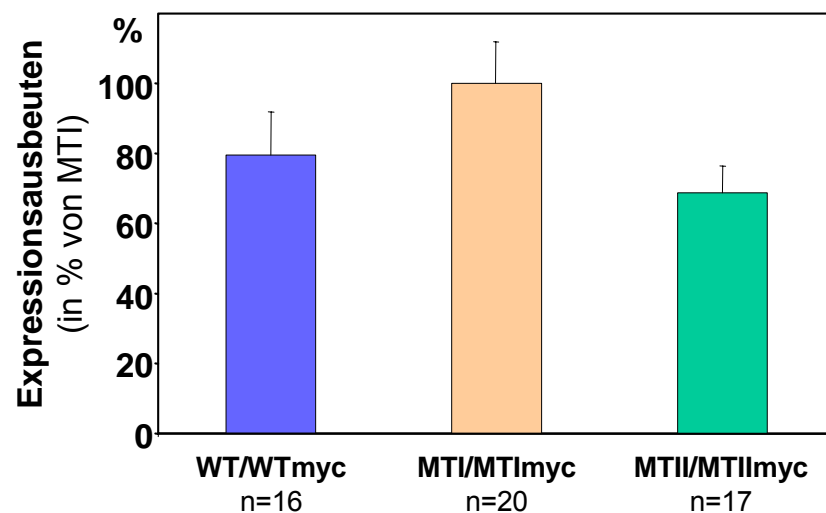


Abbildung 17: Quantifizierung der Akkumulation rekombinanter MyBP-Cs in COS-1 Zellen. Das Diagramm zeigt die densitometrisch ermittelten und statistisch ausgewerteten Expressionsausbeuten (in %) der einzelnen MyBP-C cDNA Konstrukte in COS-1 Zellen (Vgl. Abb. 16). Die Balken im Diagramm entsprechen den prozentualen Mittelwerten mit den jeweiligen Standardabweichungen (SEM). Das mutierte MyBP-C MTI/MTImyc wurde am stärksten exprimiert und der Mittelwert als 100% gesetzt (SEM=11,8%). MTII/MTIImyc (69% von MTI; SEM=7,5%) wurde nur geringfügig schwächer exprimiert als das rekombinante WT/WTmyc Protein (80% von MTI; SEM=12,3%). Die unterschiedlichen Expressionsstärken von MTI und WT bzw. MTI und MTII sind nicht signifikant. (Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Kruskal Wallis Test und der einfaktoriellen Varianzmethode (ANOVA) überprüft.)

Betrachtet man die cDNA-Konstrukte WT und MTII, die annähernd gleich groß sind, so können die jeweiligen „steady state“ Expressionsausbeuten miteinander verglichen werden. Die ermittelte Differenz der Expression der beiden cDNAs ist relativ gering (10%) und

beruhte sehr wahrscheinlich nicht auf unterschiedlichen Transfektionseffizienzen. Möglicherweise deuten diese 10% auf einen als geringfügig zu betrachtenden Abbau des verkürzten Proteins, kodiert von MTII, hin. Es ändert jedoch nichts an der Tatsache, dass die MTII cDNA in COS-1 Zellen exprimiert wird.

Dass MTI um 20-30% stärker als WT und MTII synthetisiert wurde, könnte theoretisch auf einer etwas effizienteren Transfektion beruhen. Das Plasmid MTI ist um ca. 1,4 kb kleiner als die Plasmide WT und MTII. Zur Beurteilung der tatsächlichen Transfektionseffizienz der einzelnen Konstrukte wäre z.B. eine Normalisierung gegen das plasmid-kodierte Neomycin sinnvoll gewesen. Bei dem vorgenommenen Abgleich gegen Aktin handelte es sich lediglich um eine Ladenormalisierung. Zum Zeitpunkt der Analysen war jedoch ein Neomycin Antikörper nicht kommerziell erhältlich.

Zusammengefaßt deuten die erhaltenen Daten nicht auf einen zelltypspezifischen bzw. mutationsspezifischen Abbau des mutierten MyBP-C vom Typ MTII hin.

7 Transiente Expression von MyBP-C in neonatalen Kardiozyten

Der nächste Schritt war die Expressionsanalyse der verschiedenen MyBP-C cDNA Versionen in transient transfizierten neonatalen Kardiozyten. Dazu gehörte der immunologische Nachweis der rekombinanten Proteine im Western Blot. Besonderes Interesse galt dabei der Frage, ob und in welchem Ausmaß ein verkürztes MyBP-C, kodiert von der cDNA MTII, hergestellt wird. Außerdem wurde die Akkumulation (Definition s. Kap. 7.3) und die sarkomere Lokalisierung von Wildtyp und mutierten Myosinbindungsproteinen untersucht. Diese Analysen wurden mit indirekter Immunfluoreszenz und konfokaler Mikroskopie durchgeführt. Die Verwendung von kultivierten neonatalen Kardiozyten aus Ratten (Abbildung 18) als Modellsystem bot im Gegensatz zu COS-1 Zellen die Möglichkeit, die Wirkung von MyBP-C in nativer und verkürzter Form auf die myofibrilläre Organisation und Sarkomerstruktur zu untersuchen.

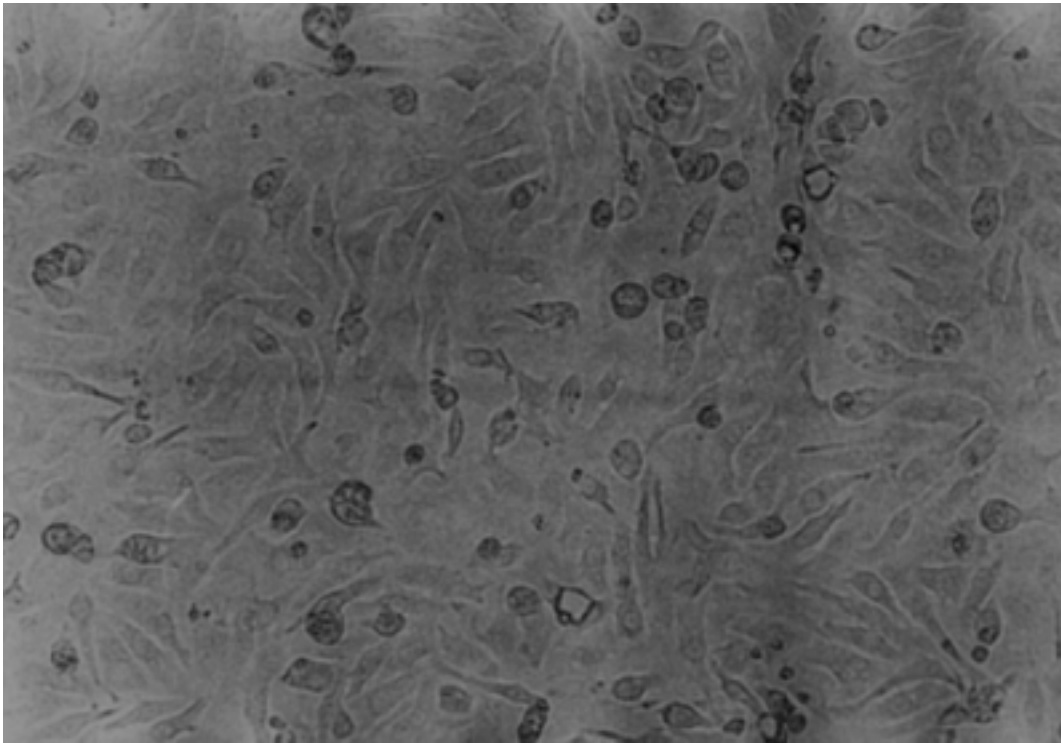


Abbildung 18: Zellkultur neonataler Kardiozyten aus Ratten. Die Abbildung zeigt eine konfluente Zellkultur neonataler Kardiozyten 24 h nach der Präparation (200x Vergrößerung).

7.1 Optimierung der Transfektionseffizienz neonataler Kardiozyten

Die transiente Transfektion neonataler Kardiozyten aus Ratten basierte auf der liposomenvermittelten Aufnahme von DNA in die Zellen mit Hilfe des kationischen Lipids Lipofektin (Felgner et al., 1987, s. Methoden Kap. 2.11.2). Für eine möglichst effiziente Transfektion der Zellen war eine Optimierung des Verhältnisses von Lipid- zu DNA-Konzentration notwendig. Bei einer Reihe von eigenen Vorversuchen wurde bereits eine toxische Wirkung von Lipofektin auf neonatale Kardiozyten festgestellt. Die geringsten negativen Auswirkungen von Lipofektin auf die Vitalität dieser Zellen wurde beobachtet, wenn die Zellen nahezu konfluent ausplattiert wurden ($0,4 \times 10^6$ Zellen/ml/ \varnothing 3,2 cm) und eine Inkubationszeit von 6 h mit dem Lipofektin-DNA Gemisch nicht überschritten wurde (Daten nicht gezeigt). Eine möglichst geringe Menge an DNA, die gleichzeitig eine geringere Menge an Lipofektin zur Folge hatte, diente ebenfalls der Minimierung der Toxizität. Die verwendete DNA-Menge sollte jedoch so hoch konzentriert sein, dass eine transiente Expression rekombinanter Proteine nachzuweisen war. Empirisch lag die DNA-Konzentration bei 10 μ g pro Transfektionsansatz, d.h. pro Well bzw. pro Kammer. Zur Beurteilung der Transfektion diente der Transfektionsindex. Dieser entspricht der Anzahl von Zellen an der Gesamtzahl der

Zellkultur, die erfolgreich transfiziert wurde. In Vorversuchen wurde die Transfizierbarkeit von neonatalen Kardiozyten mit Hilfe eines Reportergens (β -Gal) analysiert. Dazu wurde das Plasmid pSV- β Gal benutzt. Erfolgreiche Transfektionen wurden anhand von Blaufärbung nach X-Gal Behandlung der transfizierten Zellen nachgewiesen.

Zur Bestimmung des β -Gal Transfektionsindex wurden zunächst neonatale Kardiozyten auf gerasterten Zellkulturschalen (\varnothing 3,4 cm, 160 Felder mit je 2 mm Kantenlänge) mit einer Zelldichte von $0,4 \times 10^6$ Zellen/ml ausplattiert. Dies entsprach einer Gesamtzellzahl von 8×10^5 Kardiozyten/Well. Die Zellen wurden repräsentativ mit verschiedenen pSV- β Gal/Lipofektin-Verhältnissen (1:1,5; 1:3 und 1:4,5) transfiziert. Als Negativ-Kontrolle dienten Zellen, die mit dem Plasmid pCineo transfiziert waren (Daten nicht gezeigt). 48 h nach der Transfektion wurden die neonatalen Kardiozyten mit einem Fixativ konserviert und anschließend mit einer X-Gal-Lösung behandelt (s. Methoden Kap. 2.12). Die Zellen, die das Reportergen β -Galactosidase exprimierten, färbten sich blau. Die Blaufärbung ermöglichte ein Auszählen der transfizierten Zellen in jedem Rasterfeld unter dem Mikroskop. Die Anzahl der blaugefärbten Zellen wurde anschließend auf die Gesamtzahl der Zellen pro Rasterfeld bezogen. Die Gesamtzellzahl pro Rasterfeld beruhte auf einer repräsentativen Auswertung von 29 Rasterfeldern einer transfizierten Kardiozyten-Zellkultur (durchschnittlich 2000 Zellen/Rasterfeld, Daten nicht gezeigt). Diesem Mittelwert wurde die Anzahl blau gefärbter Zellen pro Rasterfeld gegenübergestellt.

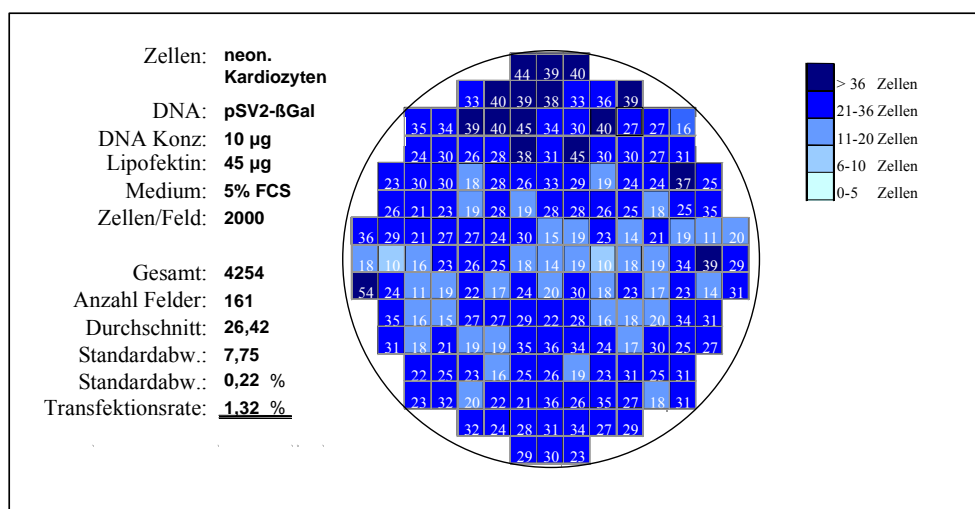


Abbildung 19: Beispiel für die Auswertung der Transfektionseffizienz neonataler Kardiozyten. Die Abbildung zeigt eine gerasterte Schale mit ausplattierten neonatalen Kardiozyten, die mit dem Reportergenplasmid pSV- β Gal transfiziert wurden. Für die Transfektion wurden 10 μ g DNA und 45 μ g Lipofektin verwendet. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit X-Gal gefärbt. Die Anzahl der blauen Zellen in jedem der Rasterfelder wurde ermittelt. Die Intensität der Blaufärbung steigt mit der Anzahl blauer Zellen pro Rasterfeld.

Die erreichten Transfektionsindizes lagen zwischen 0,3-1,3%. Abbildung 19 zeigt exemplarisch einen Versuch mit dem ermittelten optimalen Verhältnis von DNA zu Lipofektin von 1:4,5. 10 µg DNA und 45 µg Lipofektin ergaben in der Regel einen Transfektionsindex von ca. 1% (Daten nicht gezeigt). Anzumerken ist jedoch, dass die optimale Transfektionseffizienz und das optimale Verhältnis von DNA zu Lipofektin mit dem verwendeten Plasmid pSV-βGal lediglich als Richtwerte für die eigentlichen Transfektionen betrachtet wurden, da die Effizienz von Experiment zu Experiment starken Schwankungen unterlag. Die Gründe hierfür sind nicht bekannt.

7.2 Western Blot Analyse transient transfizierter neonataler Kardiozyten

Nach der Optimierung der Transfektionseffizienz wurden primäre Kulturen neonataler Kardiozyten mit den cDNA Konstrukten mit und ohne c-myc Sequenz, wie in Kapitel 7.1 beschrieben, transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für den immunologischen Nachweis der rekombinanten Proteine im Western Blot mit einem entsprechenden Lysepuffer geerntet. Für den jeweiligen Immunoblot wurden zwischen 30-50 µg Protein aus den Lysaten nach Zentrifugation auf 8%igen Proteingelen elektrophoretisch aufgetrennt. Für den immunologischen Nachweis der rekombinanten c-myc/MyBP-C Fusionsproteine wurde der anti-MyBP-C Antikörper R76 verwendet. Die Ausbeuten an rekombinantem Protein waren wegen der niedrigen Transfektionseffizienz so gering, daß ein Nachweis mit dem anti-c-myc Antikörper 9E10 (Roche) nicht möglich war. Zur Normalisierung der geladenen Proteinmengen wurde zelluläres Aktin durch den anti-Aktin Antikörper markiert.

Im Unterschied zu COS-1 Zellen, wurde in neonatalen Kardiozyten nur die cDNA vom Typ MTI gut sichtbar exprimiert (Abbildung 20, Vgl. Abb. 16). Die cDNA MTII führte nicht, bzw. nur in sehr geringem Ausmaß zur Synthese eines C-terminal verkürzten, 95 kD großen MyBP-C in diesen Zellen. Dieses Ergebnis wurde wiederholt gesehen. Eine densitometrische Auswertung der unterschiedlichen „steady state“ Expression von MTI und MTII wird in Kapitel 8 näher beschrieben. (Die unterschiedliche Expression von MTI und MTII ist Abbildung 28 zu entnehmen). Ein Vergleich mit der Expression des rekombinanten WT MyBP-C war nicht möglich, da das exogene humane Wildtyp MyBP-C (137 kD) im Rahmen

dieser Experimente vom endogenen MyBP-C der Ratte nicht zu unterscheiden war. Der polyklonale anti-MyBP-C Antikörper markierte beide Proteine gleichermaßen.

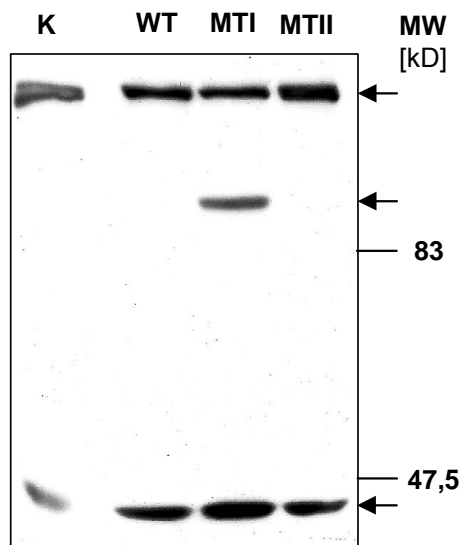


Abbildung 20: Western Blot Analyse transient transfizierter neonataler Kardiozyten. Nur das Genprodukt der cDNA vom Typ MTI war im Immunoblot nachweisbar. In Spur K wurden 40 µg Gesamtprotein eines klaren Zellysates neonataler Kardiozyten auf ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel geladen. Die Zellen waren zuvor mit dem Kontrollplasmid pCineo-myc transfiziert worden. In den Spuren WT, MTI und MTII wurden ebenfalls jeweils 40 µg Gesamtprotein von Zellysaten entsprechend transfizierter neonataler Kardiozyten aufgetragen. Zum Nachweis der geblotteten Proteine wurde der MyBP-C Antikörper R76 verwendet. Zur Normalisierung der geladenen Proteinmenge wurde zelluläres Aktin mit dem monoklonalen Aktin Antikörper (Ab-1) markiert. Die Größen der nachgewiesenen Proteine (in kD) wurden anhand von Markerproteinen mit bekanntem Molekulargewicht

(83 kD und 47,5 kD) ermittelt. Die Position der Signale (gekennzeichnet mit Pfeilen) entsprechen den erwarteten Proteingrößen von 137 kD (endogenes MyBP-C aus Ratte bzw. exogenes humanes MyBP-C) und 95 kD(MTI) sowie 42 kD (Aktin).

7.3 Akkumulation humaner MyBP-Cs in transient transfizierten neonatalen Kardiozyten

Zur Analyse der zellulären Akkumulation der rekombinanten c-myc/MyBP-C Fusionsproteine wurden transfizierte myokardiale Zellen nach der Transfektion fixiert und einer indirekten Immunfluoreszenz-Doppelfärbung unterzogen (s. Methoden Kap. 2.18.2). Als Akkumulation wurde hierbei der Anteil der Kardiozyten definiert, die in einer Kammer eines verwendeten Kulturobjektträgers als Produzenten von rekombinantem MyBP-C identifiziert wurden (pro Kammer wurden 6×10^5 Zellen ausplattiert und transfiziert.). Der Nachweis der rekombinanten c-myc/MyBP-C Fusionsproteine erfolgte unter Verwendung der indirekten Avidin-Biotin-Methode (s. Methoden Kap. 2.18) mit dem c-myc Antikörper 9E10. Im Gegensatz zum Western Blot war der monoklonale Antikörper zur Darstellung der rekombinanten Proteine in den Zellen geeignet. Als sekundärer Antikörper wurden in diesem Fall biotin-gekoppelte IgGs verwendet, die durch das Cy2-Streptavidin Detektionssystem markiert wurden. Mit Hilfe eines geeigneten Filtersystems erschienen die auf diese Weise gefärbten c-myc/MyBP-C Fusionsproteine im Fluoreszenzmikroskop grün. Die 2. Immunfluoreszenzfärbung diente dem Nachweis des endogenen kardialen Titins durch den

polyklonalen Titin Antikörper anti-z1z2 (freundlichst zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Schaper, Bad Nauheim). Dieser Antikörper wurde indirekt mit einem rhodamin-gekoppelten anti-Kaninchen IgG markiert, der im Fluoreszenzmikroskop eine rote Fluoreszenz emittierte. Der Nachweis des kardialen Titins diente der Identifizierung transfizierter Zellen als Kardiozyten. Die doppeltgefärbten Zellpräparate wurden im Anschluß konfokal mikroskopiert.

Benutzt wurden sog. chamber slides, die jeweils 2 Kammern enthielten (s. Material Kap. 1.11). Jede Zellkammer wurde vollständig ausgewertet, um die genaue Anzahl der Kardiozyten zu ermitteln, die das exogene humane c-myc/MyBP-C Fusionsprotein exprimierten. Die vorgenommene Auswertung beruhte auf den Daten von 4 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (Tabelle 9).

Tab. 9: Parameter zur Bestimmung der Akkumulation rekombinanter MyBP-Cs in transient transfizierten neonatalen Kardiozyten.

	Anzahl unabhängiger Experimente	Anzahl analysierter Kammern	Ø Anzahl „c-myc-positiver“ Kardiozyten/Kammer	Anzahl aller ausgewerteten „c-myc-positiven“ Zellen
WTmyc	4	8	330	3898
MTImyc	4	8	120	
MTIImyc	4	12	25	

Gemessen an der Fraktion „c-myc positiver“ Kardiozyten/Kammer war die Akkumulation des verkürzten MyBP-Cs, kodiert von MTII, signifikant reduziert gegenüber dem rekombinanten humanen Wildtyp MyBP-C (Abbildung 21). Zusätzlich wurden signifikante Expressionsunterschiede zwischen den jeweils verkürzten MyBP-Cs, codiert von MTI und MTII, beobachtet. Während die Expressionsausbeute von MTI 35% vom Wildtyp MyBP-C entsprach, wies MTII mit lediglich 7% die geringste Akkumulation auf. Die ermittelten Ergebnisse ließen zum erstenmal einen Vergleich zwischen der Expression des exogenen WT Proteins und der mutierten Proteine MTI und MTII zu, da die Expression des nativen, humanen MyBP-Cs in neonatalen Kardiozyten im Rahmen von Western Blot Analysen nicht untersucht werden konnte (s. Kap. 7.2). Dies ist von Bedeutung, da nun Hinweise darauf vorlagen, dass die verkürzten Proteinprodukte der cDNAs MTI und MTII deutlich schwächer exprimiert werden als das exogene WT Protein. Die Ergebnisse der Western Blot Analyse wurden hiermit unterstützt und erweitert.

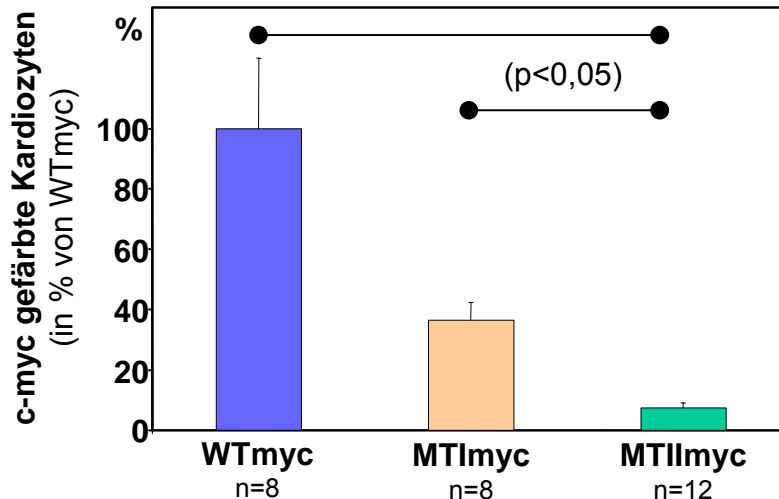


Abbildung 21: Akkumulation rekombinanter MyBP-Cs in transient transfizierten neonatalen Kardiozyten. 48 h nach der Transfektion mit den cDNAs WTmyc, MTImyc und MTIIImyc wurden die neonatalen Kardiozyten indirekt immunfluoreszent markiert und analysiert. Der Nachweis der c-myc/MyBP-C Fusionsproteine erfolgte mit dem Antikörper anti-c-myc 9E10. Zusätzlich wurde endogenes kardiales Titin mit dem Titin Antikörper anti-z1z2 markiert. Die Anzahl c-myc positiver Kardiozyten pro Kammer wurde für jedes cDNA Konstrukt bestimmt. Die ermittelten Durchschnittswerte wurden in % angegeben. Der Mittelwert von WTmyc wurde als 100% gesetzt (SEM=23,3%). Die mutierten MyBP-C Proteine, MTImyc (35% von WTmyc; SEM=6,1%) und MTIIImyc (7% von WTmyc; SEM=1,14) wurden in neonatalen Kardiozyten schwächer exprimiert als das rekombinante WTmyc Protein. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen WTmyc und MTIIImyc einerseits und zwischen MTImyc und MTIIImyc andererseits. (Die Signifikanzberechnungen wurden mit dem Kruskal Wallis Test vorgenommen.)

7.4 Lokalisierung der humanen MyBP-Cs in kardialen Sarkomeren/Zellen

Die in Kapitel 7.3 durchgeführte Analyse der Akkumulation wurde dahingehend erweitert, dass zusätzlich die Lokalisierung der verschiedenen rekombinanten MyBP-Cs innerhalb der sarkomeren Struktur der kardialen Zellen untersucht wurde. Für die Beurteilung der Sarkomerstruktur c-myc positiver Kardiozyten wurden die in Kapitel 7.3 angefertigten, doppeltgefärbten Zellpräparate verwendet. Die transfizierten neonatalen Kardiozyten waren mit zwei verschiedenen Antikörpern immunfluoreszent markiert. Während der monoklonale c-myc Antikörper, wie bereits erwähnt, eine Unterscheidung zwischen dem exogenen humanen und dem endogenen MyBP-C aus Ratte ermöglichte, diente die Markierung von endogenem Titin durch den polyklonalen Antikörper anti-z1z2 zur Kardiozytenidentifizierung und zur Beurteilung der Querstreifung.

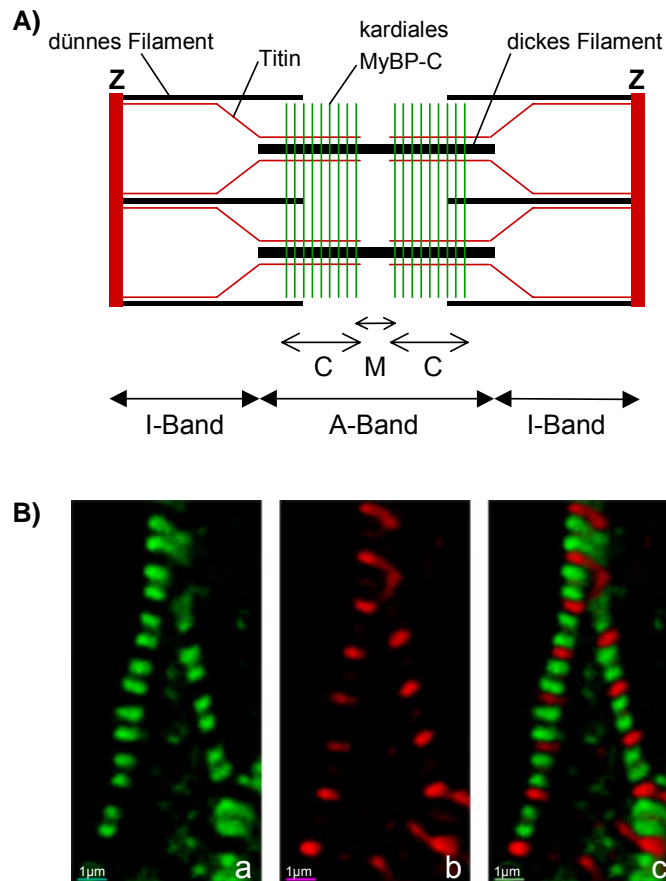


Abbildung 22: Lokalisierung von kardialen MyBP-C und Titin im Sarkomer. A) Schematische Darstellung eines Sarkomers. Eingezeichnet sind die dünnen und dicken Filamente sowie die Lokalisierung des Titins (rot) in den Z-Scheiben und die des kardialen MyBP-C in der C-Zone der A-Bande (grün). B) Ausschnitte einer transfizierten neonatalen Kardiozyte, die 48 h nach der Transfektion mit dem Plasmid WTmyc durch die Antikörpern anti-c-myc 9E10 und anti-z1z2 indirekt immunfluoreszent markiert wurde. Zu erkennen ist die Lokalisierung des c-myc/MyBP-C Fusionsprotein in der A-Bande des Sarkomers in Form von charakteristischen Doppelstreifen (grün, a). Titin (rot, b) ist in der Z-Scheibe lokalisiert. c) zeigt die Überlagerung der beiden Färbungen. Der Maßstab entspricht 1 μm .

Kardiales MyBP-C ist als ein Bestandteil des dicken Filamentsystems in der C-Zone der A-Bande der Sarkomere lokalisiert. Dort liegt es in Form von 7-9 transversalen Streifen vor (Pepe und Drucker, 1975; Craig und Offer, 1976; Dennis et al., 1984). Färbt man das Protein immunfluoreszent an, so erscheint es in dieser Region in Form charakteristischer Doppelstreifen in der A-Bande (s. grüne Markierung in Abbildung 22 A) und B)).

Kardiales Titin wurde Ende der 70er Jahre als das dritte Filamentsystem identifiziert, das dicke und dünne Filamente miteinander verbindet (Maruyama et al., 1977; Wang et al., 1979). Einzelne sehr große und flexible Titinmoleküle (Länge $>1 \mu\text{m}$) erstrecken sich von der Z-Scheibe bis zur M-Linie eines Sarkomers (Abbildung 22 A)) und interagieren mit verschiedenen Proteinen der A-Bande, wie z.B. mit Myosin und MyBP-C (Maryama et al.,

1985; Labeit et al., 1992; Houmeida et al., 1995; Labeit und Kolmerer, 1995; Obermann et al., 1996). Titin werden verschiedene Funktionen zugeordnet, so übt es in der I-Bande eine Elastizitätsfunktion aus und spielt eine große Rolle in der Sarkomerogenese (Maruyama et al., 1985; Wang et al., 1988; Whiting et al., 1989; Fulton und Isaacs, 1991; Freiburg und Gautel, 1996; Gregorio et al., 1999; Ehler et al., 1999). Es eignet sich hervorragend als Marker für die endogene Sarkomerstruktur, zumal es bereits sehr früh im Laufe der Sarkomerogenese exprimiert wird (Fürst und Gautel, 1995). Der in dieser Studie verwendete Titin-Antikörper anti-z1z2 ist spezifisch gegen die N-terminalen Proteindomänen Z1Z2 gerichtet, die an die Z-Scheibe binden. Unter dem Mikroskop betrachtet erscheint Titin in der Z-Bande (siehe rote Markierung in Abbildung 22 A) und B)).

Alle „c-myc positiven“ Kardiozyten wurden im konfokalen Mikroskops untersucht. Dabei wurden 4 verschiedene Kategorien von Zellen unterschieden (Abbildung 23):

- 1.) Die erste Kategorie wurde von Zellen gebildet, die durch eine korrekte Inkorporation von rekombinatem MyBP-C in die A-Bande der Sarkomeren gekennzeichnet waren. Die Organisation der Myofibrillen schien unverändert zu sein.
- 2.) Die zweite Kategorie enthielt Zellen, die eine diffuse Verteilung der rekombinanten MyBP-C Proteine innerhalb des gesamten Sarkoplasmas aufwiesen. Die Sarkomere hingegen waren intakt, soweit beurteilbar.
- 3.) Die dritte Kategorie umfasste c-myc positive Kardiozyten, die sowohl eine diffuse Verteilung der humanen MyBP-C als auch eine veränderte Sarkomerstruktur erkennen ließen.
- 4.) Zur letzte Kategorie gehörten Zellen, die bei Inkorporation der rekombinanten Proteine eine veränderte Sarkomerstruktur aufwiesen.

Zur Kategorie 1 zählten 84% der transfizierten Kardiozyten, die das humane kardiale Wildtyp MyBP-C exprimierten (Abbildung 23). Dieses Protein war korrekt in der A-Bande der Sarkomere lokalisiert. In der Form von charakteristischen Doppelstreifen war es auf beiden Seiten der M-Bande sichtbar (Abbildung 24a). Die Lokalisierung entsprach der des endogenen MyBP-Cs im humanen Herzgewebe (Abbildung 24d, Gewebe gefärbt mit anti-MyBP-C). Das eingeführte c-myc Epitop hatte also keinen Einfluß auf die Funktion des

Proteins. Die Titinfärbung zeigte eine konservierte Querstreifung der gesamten Sarkomerstruktur (Abbildung 24b). Wurden beide Immunfluoreszenzfärbungen superpositioniert (G/B/R Filter, Leica 513836), wurde die alternierende Anordnung von MyBP-C und Titin erkennbar (Abbildung 24c).

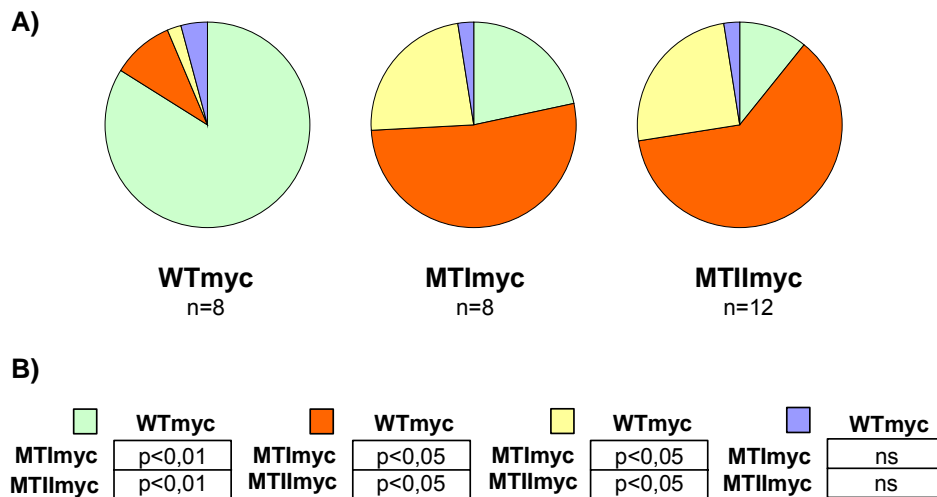


Abbildung 23: Subzelluläre Lokalisierung rekombinanter MyBP-C Proteine in den Sarkomeren neonataler Kardiozyten. Bei der Beurteilung der Sarkomerstruktur c-myc positiver Kardiozyten wurden 4 Kategorien von Zellen unterschieden:

1. Sarkomere mit korrekt integriertem rekombinantem MyBP-C und intakter Struktur ■ 2. Intakte Sarkomere bei diffuser Verteilung der exogenen MyBP-Cs ■ . 3. Zerstörte Sarkomerstruktur und diffuse Verteilung rekombinanter MyBP-Cs ■ . 4. Sarkomere mit inkorporiertem, rekombinantem Protein und veränderter Sarkomerstruktur ■ A) Die Anzahl der Zellen der jeweiligen Kategorie sind in Prozentwerten angegeben und ergeben in der Summe jeweils 100%. B) Die Unterschiede in den Kategorien 1, 2 und 3 zwischen WTmyc und MTImyc bzw. WTmyc und MTIImyc sind signifikant. Die Überprüfung der Signifikanz wurde für die Kategorie 1 mit ANOVA und mit dem Bonferroni Test überprüft, während für die Kategorien 2, 3 und 4 Kruskal Wallis und Dunn's Tests durchgeführt wurden.

Lediglich 22% bzw. 11% aller Zellen, die mit den mutierten cDNAs MTImyc bzw. MTIImyc transfiziert worden waren, zeigten eine korrekte Inkorporation der rekombinanten, verkürzten MyBP-Cs in den Sarkomeren neonataler Kardiozyten (Abbildung 23 und 25 a/d). Zu erkennen waren spezifische Doppelstreifen in der A-Bande der Sarkomere, die geringfügig diffuser erschienen als beim WT Protein. Die endogene Querstreifung erschien ebenfalls konserviert (Abbildung 25 b/e). Überlagerte man beide Färbungen, zeigten die Präparate die beschriebene alternierende Anordnung der mutierten Proteine in der A-Bande und des

endogenen Titins in der Z-Bande (Abbildung 25 c/f). Demnach schließt die Expression von verkürzten MyBP-C Proteinen zumindest strukturell die Formierung originärer Sarkomere nicht grundsätzlich aus.

Die überwiegende Mehrzahl der Zellen, die entweder MTI oder MTII exprimierten, zählten zur zweiten Kategorie. 53% der c-myc positiven Zellen, transfiziert mit cDNA MTImyc und 62% der c-myc positiven Kardiozyten, transfiziert mit cDNA MTIImyc, zeigten eine diffuse Verteilung der exogenen, verkürzten MyBP-Cs innerhalb des gesamten Sarkoplasmas (Abbildung 23 und 26a). Die endogene Querstreifung hingegen blieb vollständig erhalten, erkennbar an der unveränderten Lokalisierung von Titin in der Z-Bande (Abbildung 26b). Das Ergebnis zeigte sich auch bei der Darstellung der Doppelfärbung (Abbildung 26c). Auch diese Daten sprechen gegen einen grundsätzlich dominant-negativen Effekt der verkürzten Proteine auf die Sarkomerstruktur.

23% bzw. 25% der Zellen, die entweder MTI bzw. MTII exprimierten, waren durch eine gestörte Sarkomerstruktur und durch eine diffuse Verteilung der exogenen, mutierten Proteine, gemäß Kategorie 3, gekennzeichnet (Abbildung 23 und 26d-f).

Unabhängig von der Art des exprimierten rekombinanten MyBP-Cs, zeigte nur eine Minderheit der c-myc positiven Kardiozyten (Kategorie 4) eine veränderte sarkomere Struktur (Abbildung 23).

Zusammengefasst, es wurde in Kardiozyten, die C-terminal verkürzte MyBP-C-Moleküle exprimierten, vor allem eine diffuse Verteilung dieser Proteine und in geringerem Ausmaß eine zerstörte Sarkomerstruktur beobachtet. Ferner ist anzumerken, daß die Lokalisierung der rekombinanten Proteine MTI und MTII in den Sarkomeren vergleichbar ist. Sie unterscheiden sich lediglich in den Mengen, in denen sie exprimiert werden.

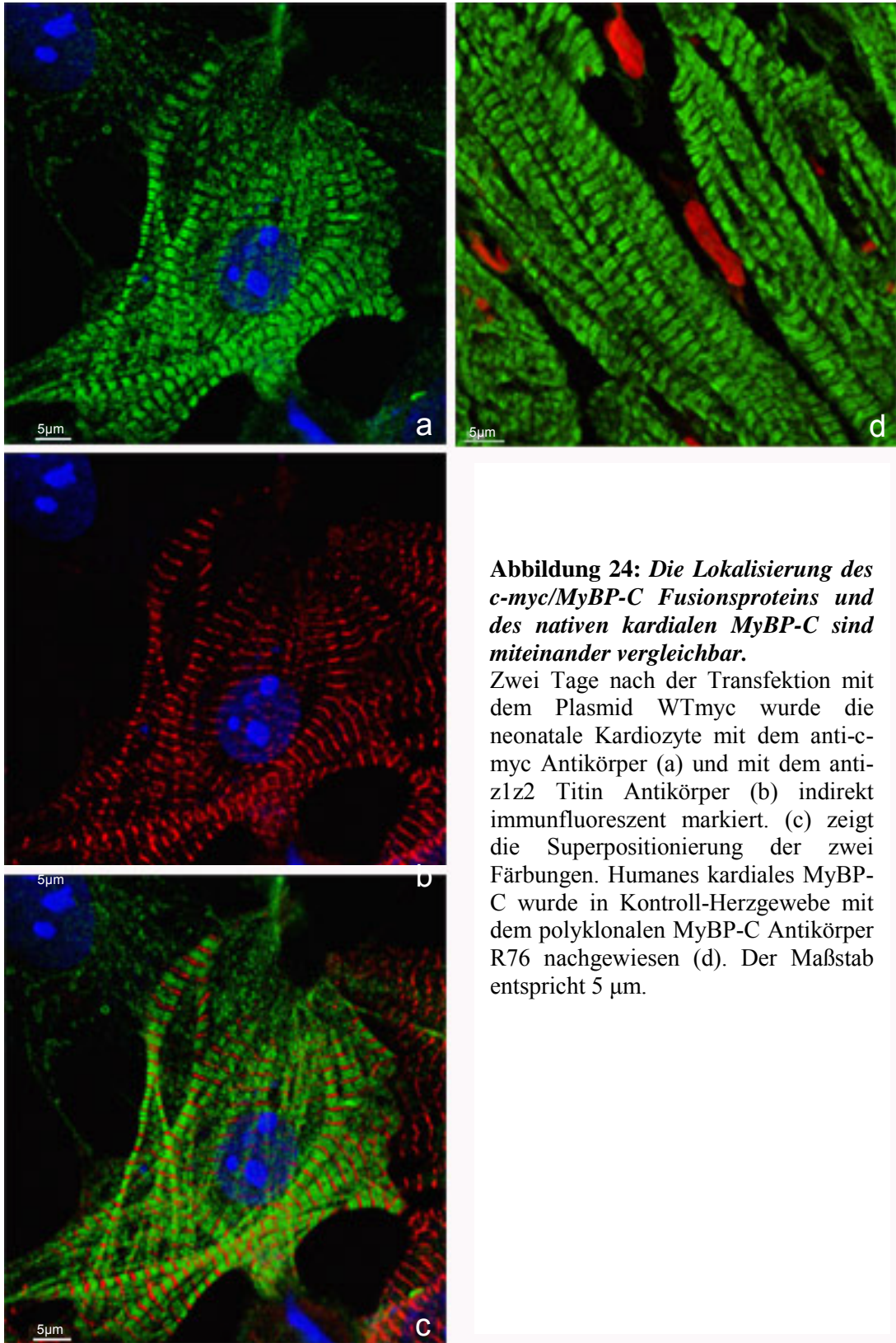


Abbildung 24: Die Lokalisierung des *c-myc/MyBP-C* Fusionsproteins und des nativen kardialen *MyBP-C* sind miteinander vergleichbar.

Zwei Tage nach der Transfektion mit dem Plasmid WTmyc wurde die neonatale Kardiozyte mit dem anti-*c-myc* Antikörper (a) und mit dem anti-z1z2 Titin Antikörper (b) indirekt immunfluoreszent markiert. (c) zeigt die Superpositionierung der zwei Färbungen. Humanes kardiales *MyBP-C* wurde in Kontroll-Herzgewebe mit dem polyklonalen *MyBP-C* Antikörper R76 nachgewiesen (d). Der Maßstab entspricht 5 µm.

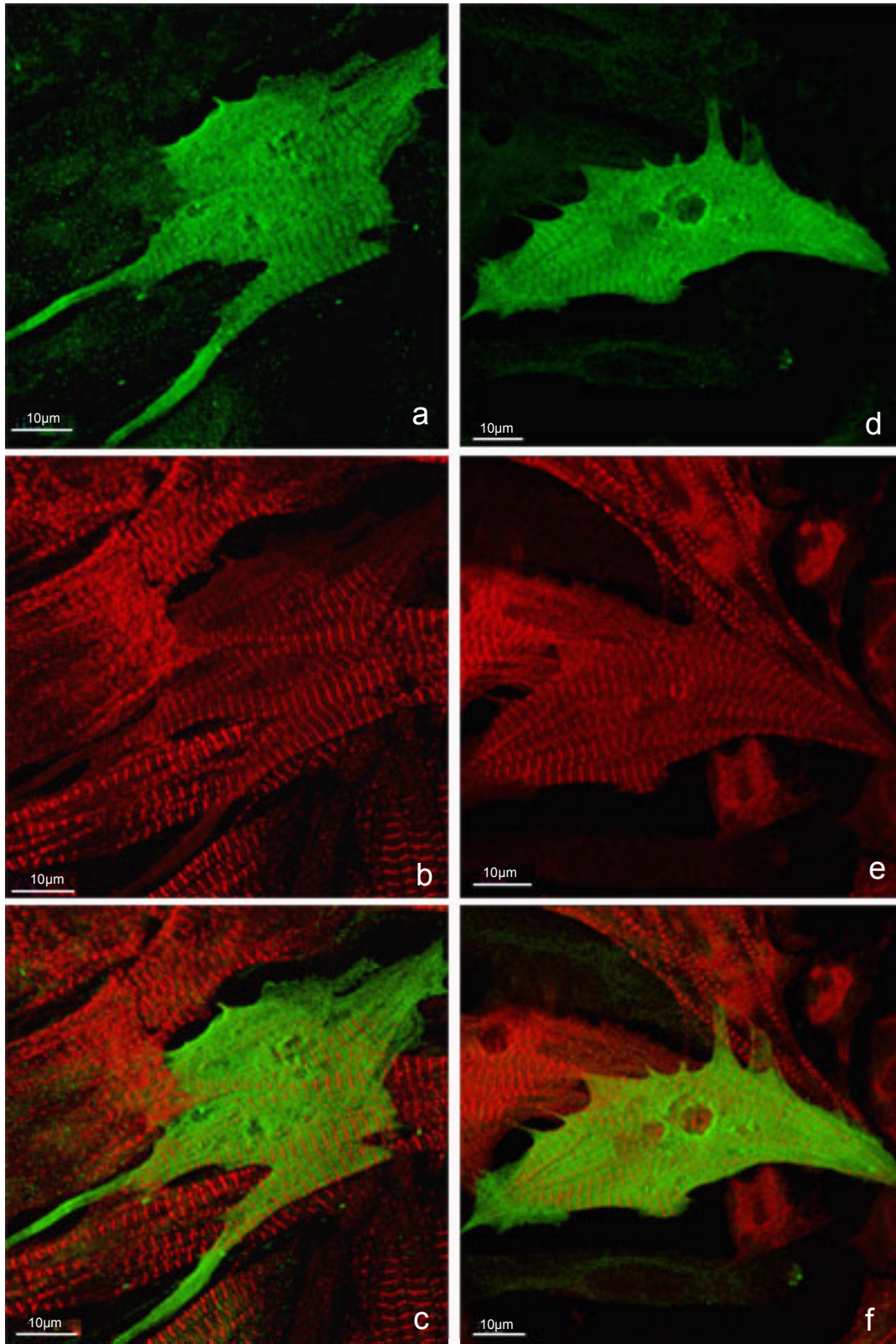


Abbildung 25: Einbau der C-terminal verkürzten c-myc/MyBP-C Fusionsproteine in die A-Bande der Sarkomere. Kardiozyten wurden mit den MyBP-C cDNAs MTImyc (a, b, c) und MTIIImyc (d, e, f) transfiziert. Die immunfluoreszente Markierung der Zellen erfolgte in (a, d) mit dem monoklonalen anti-c-myc Antikörper und in (b, e) mit dem polyklonalen Titin Antikörper. Die Bilder c) und f) zeigen die Doppelfärbung. Der Maßstab entspricht 10 µm.

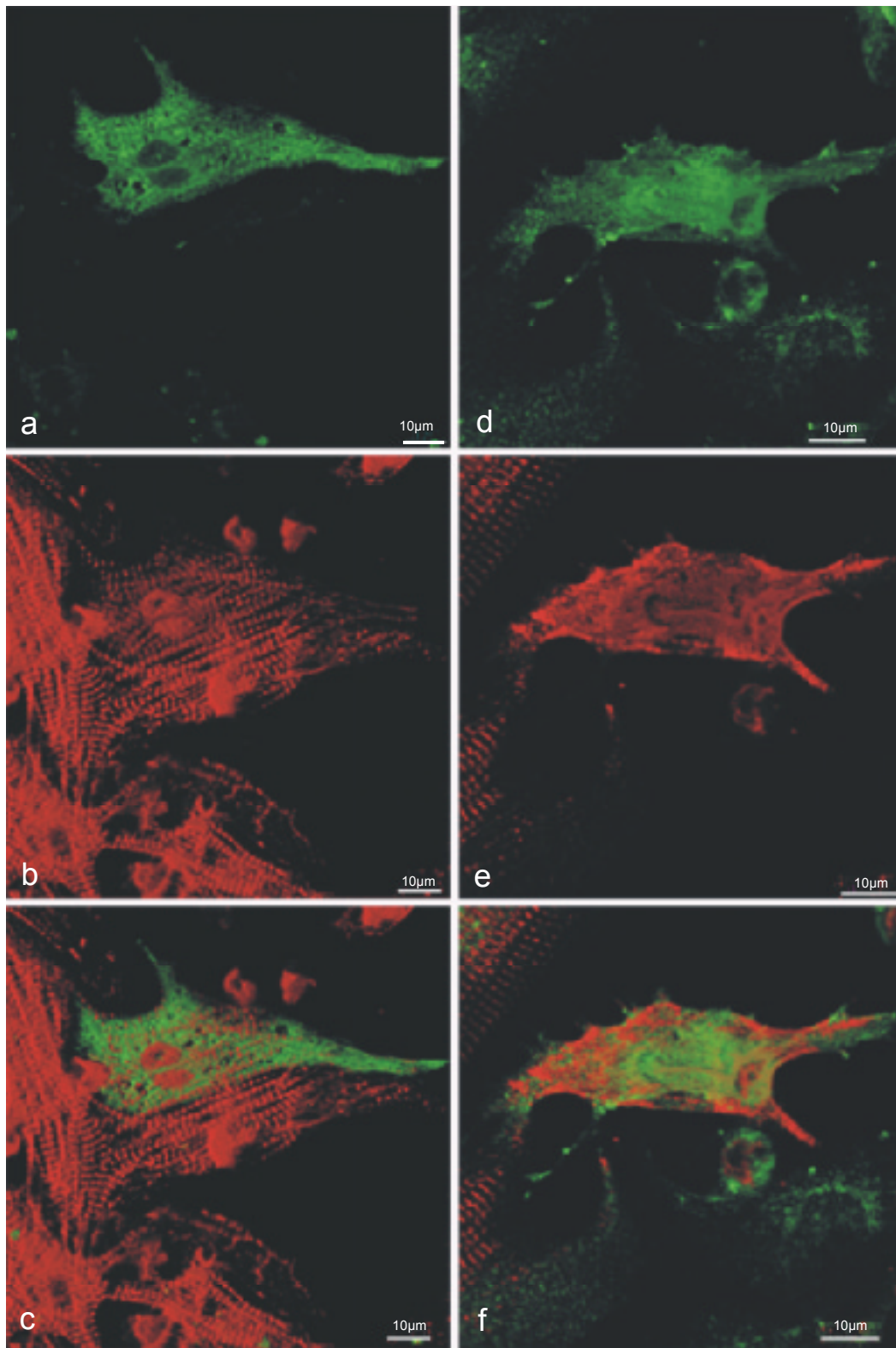


Abbildung 26: Diffuse Verteilung C-terminal verkürzter c-myc/MyBP-C Fusionsproteine innerhalb neonataler Kardiozyten. Die Bilder (a, b, c) zeigen ein typisches Exemplar einer Kardiozyte, in der das c-myc/MyBP-C Fusionsprotein vom Typ MTII_{myc} diffus im Sarkoplasma vorliegt, während die geordnete, endogene Sarkomerstruktur erhalten bleibt. In den Bildern (d, e, f) ist sowohl die diffuse Verteilung des verkürzten MyBP-C vom Typ MTII_{myc} als auch eine zerstörte endogene Sarkomerstruktur der transfizierten Kardiozyte erkennbar. Die Doppelfärbung der Zellen erfolgte mit dem monoklonalen anti-c-myc Antikörper (a, d) und dem polyklonalen Titin Antikörper (b, e) und ist in (c, f) dargestellt. Der Maßstab entspricht 10 µm.

8 Untersuchung von Sequenzelemente die mutmaßlich die Expression von mRNA mit unplanmäßigem Nonsense-Codon beeinträchtigen

Die cDNAs MTI und MTII kodierten beide für dasselbe verkürzte MyBP-C von 95 kD. Der Unterschied zwischen diesen beiden cDNAs bestand darin, daß die MTI cDNA MyBP-C-spezifische Information nur bis zur Position des vorzeitigen Stops enthielt, aber nicht darüber hinaus. (Dabei ist zu berücksichtigen, dass der C-Terminus dieses Rumpfpoteins wegen der Deletion von 40 Bp und der daran anschließenden Änderung des Leserasters über eine Länge von 16 Codons keine Ähnlichkeit mit dem nativen Protein hat.) Im Gegensatz dazu enthielt die cDNA MTII im Anschluß an das vorzeitige Stop-Codon noch die ursprüngliche Sequenz der MyBP-C mRNA. In COS-1 Zellen führten beide cDNAs zum selben Protein-Produkt von 95 kD, in neonatalen Kardiozyten dagegen wurde zwar die MTI cDNA eindeutig exprimiert, die MTII cDNA hingegen nicht, oder fast nicht. Dieser Befund legte die Vermutung nahe, daß es in Kardiozyten einen zelltypspezifischen Mechanismus der Suppression von reifer mRNA gibt, in der ein nicht vorgesehene Stop-Codon einem längeren Abschnitt nativer Sequenzen vorausgeht, so wie es in MTII der Fall ist.

Konstellationen dieser Art mit der Folge reduzierter Expression wurden in der Literatur beschrieben (Frischmeyer und Dietz, 1999). Als Mechanismus wurde ein „nonsense mediated decay“ (abgekürzt NMD) postuliert, dessen molekulare Details allerdings nach wie vor nicht gut verstanden sind. Die mit diesem Mechanismus gekoppelte Kontrolle wurde als „mRNA surveillance“ bezeichnet (Culbertson, 1999; Czaplinski et al., 1999; Hentze und Kulozik, 1999; Hilleren und Parker, 1999; Maquat und Carmichael, 2001). Es handelt sich dabei um ein phylogenetisch weit verbreitetes und in der Evolution konserviertes Verfahren, das der Wirkung von Nonsense-Mutationen (als Folge von Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen) entgegenwirkt. Diese Kontrolle kann als eine Methode betrachtet werden, die möglicherweise in Verbindung mit der präferentiellen Eliminierung von Nonsense-belasteter mRNA die Akkumulation von verkürzten und dysfunktionellen Proteinen verhindert.

Aus der Literatur ergeben sich Hinweise darauf, dass NMD von (bisher nicht eindeutig identifizierten) Sequenzen abhängig ist, die in einer nonsense-mutierten mRNA als sog. „downstream sequence elements“ (DSE) 3' zum irregulären Nonsense-Codon in der reifen mRNA vorkommen (Ruiz-Echevarria et al, 1998). Solche Sequenzen könnten erklären, warum MTI cDNA auch in Kardiozyten erkannt und translatiert wird, MTII dagegen nicht oder nur sehr viel schlechter.

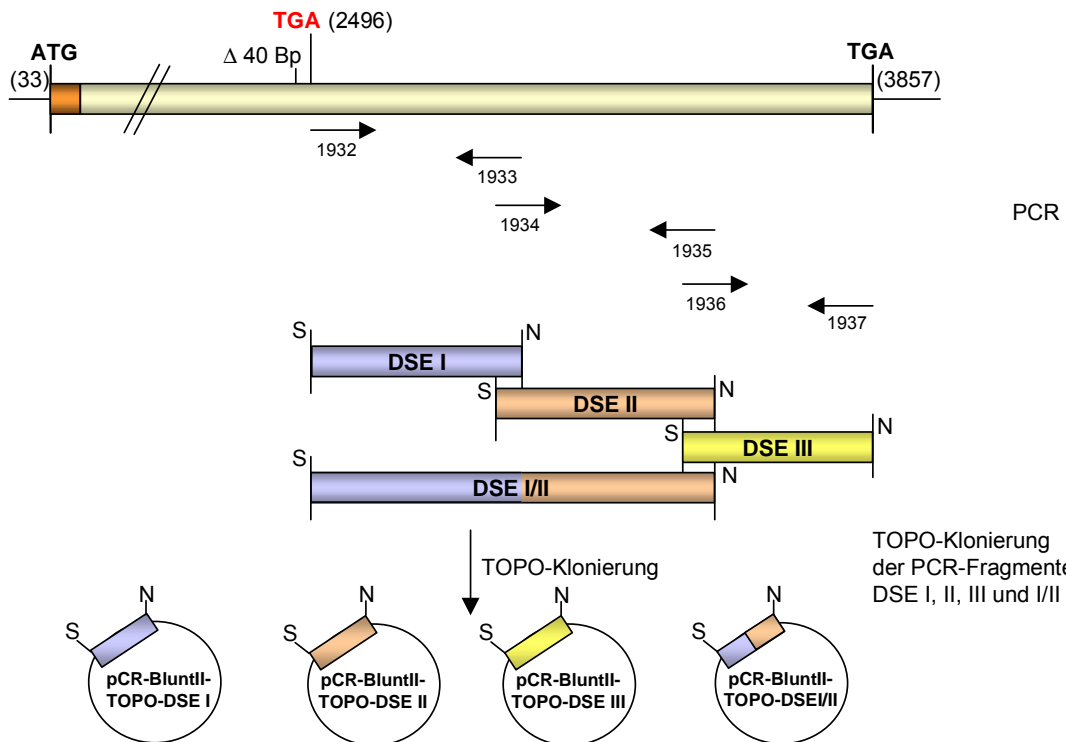
Zur Prüfung einer möglichen Wirkung von DSE in MTII wurde der in dieser cDNA vorliegende Abschnitt zwischen dem Nonsense-Codon im Bereich der 40 Bp Deletion und dem regulären Stop-Codon am Ende der mRNA (Länge: 1.400 Nukleotide) in drei annähernd gleich große, überlappende Abschnitte unterteilt (DSE I bis III, s. dazu die Abbildung 27). Jeder dieser Abschnitte wurde separat amplifiziert und dann einzeln oder in Kombination an das 3' Ende der MTImyc cDNA angehängt. Neben MTII (ca. 1.400 Bp 3' vom vorzeitigen Stop-Codon) lagen dadurch Konstrukte mit 1.000 Bp und 500 Bp im 3' Bereich vor. Die so erhaltenen DSE-modifizierten MTI cDNA-Konstrukte wurden in neonatale Kardiozyten transfiziert. Die Expression der insgesamt vier verschiedenen DSE-cDNAs wurde im Western Blot nach Sichtbarmachung mit dem anti-MyBP-C Antikörper R76 densitometrisch bestimmt.

8.1 Herstellung der MTImyc-DSE cDNA-Konstrukte

Die Klonierung der DSE-Fragmente ist in Abbildung 27 dargestellt. Das Fragment DSE I mit einer Länge von 530 Bp erstreckte sich von Bp 2.497-3.027 und wurde mit den Primern 1932-SalI und 1933-NotI amplifiziert. Das zweite Fragment DSE II wurde mit den Primern 1934-SalI und 1935-NotI amplifiziert und umfaßte mit einer Größe von 546 Bp den cDNA Bereich von Bp 2.964-3.510. Fragment DSE III entsprach der cDNA Region von Bp 3.421-3.857 und war 436 bp lang. Zur Amplifikation dieses Abschnittes dienten die Primer 1936-SalI und 1937-NotI. Das kombinierte Fragment DSE I/II, mit einer Länge von 1.013 Bp, wurde durch Amplifikation mit den Primern 1932-SalI und 1935-NotI erhalten. Als PCR-Template wurde für alle vier Fragmente die Plasmid-DNA MTImyc verwendet. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit (Invitrogen) in den pCR[®]-BluntII-TOPO-Vektor ligiert. Die klonierte DNA wurde anschließend in beiden Richtungen sequenziert. Nach Doppelspaltung der TOPO-DSE-Plasmide mit den Restriktionsenzymen *Sal* I und *Not* I wurden vier verschiedene *Sal* I/*Not* I-DSE-Fragmente erhalten, die einzeln in den mit *Sal* I und *Not* I geöffneten pCIneo-MTImyc Vektor 3' vom vorzeitigen Stop-Codon subkloniert wurden. Auf diese Weise wurden vier expressionsfähige Subklone von MTImyc erhalten, die vier verschiedene Abschnitte aus der cDNA 3' vom vorzeitigen Stop Codon enthielten.

1. Klonierungsschritt

MTI_{myc}



2. Klonierungsschritt

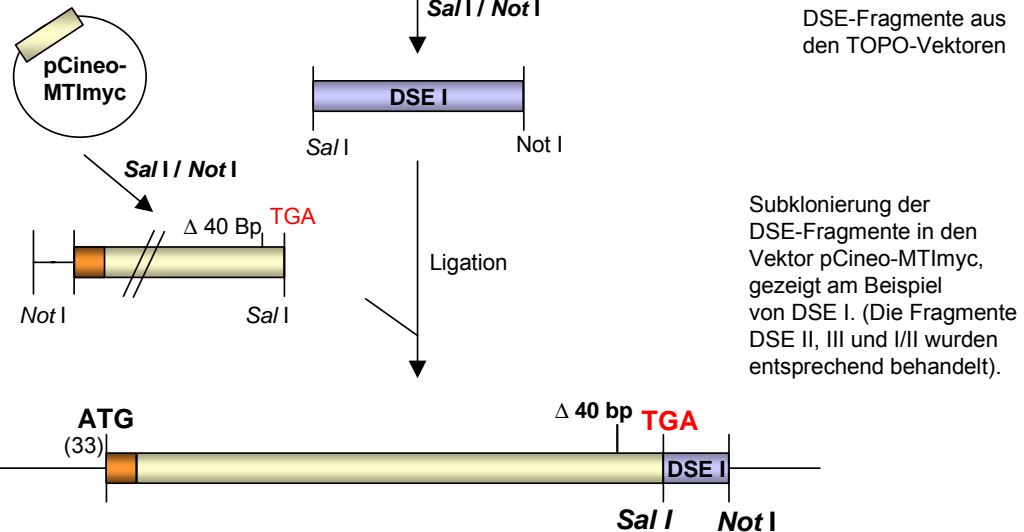


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Klonierung von MTI_{myc}-DSE cDNA. Gezeigt wird nur die Klonierung von MTI_{myc}-DSE I. Die Klonierungsschritte sowie die klonierten DNA-Fragmente sind in Kapitel 8.1 beschrieben.

8.2 Densitometrische Analyse der „steady state“ Expression der MTI_{myc}-DSE cDNA-Konstrukte in neonatalen Kardiozyten

Zur Analyse der Expression der verschiedenen MTI_{myc}-DSE cDNAs wurden Kulturen neonataler Kardiozyten nach dem Lipofektin-Protokoll transfiziert. $0,8 \times 10^6$ Zellen pro

Kulturschale wurden mit einem Gemisch aus 10 µg DNA und 45 µg Lipofektin behandelt. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für Western Blot Analysen mit einem Lysepuffer geerntet (s. Methoden Kap. 2.11.2). Zusätzlich wurden parallel zur Kontrolle die cDNAs MTImyc und MTIImyc transfiziert. Für den immunologischen Nachweis der rekombinanten c-myc/MyBP-C Fusionsproteine wurde der polyklonale Antikörper R76 benutzt. Zur Normalisierung der Proteinmengen wurde, bei der densitometrischen Auswertung der in den Zellen synthetisierten Protein-Produkten, als konstitutiv exprimiertes Referenzprotein Aktin mit dem monoklonalen anti-Aktin Antikörper (Ab-1) nachgewiesen.

Die densitometrische Ermittlung der „steady state“ Expression der MTImyc-DSE cDNA-Konstrukte in transfizierten neonatalen Kardiozyten ergab folgende Resultate (Abbildung 28): Die cDNA MTImyc-DSE I wurde am schwächsten exprimiert. Die Expressionsausbeute lag bei 34,8% (n=14, SEM=3,7) und war signifikant reduziert gegenüber der Expression von MTImyc (100%; n=19, SEM=9,9). Die „steady state“ Expression der cDNA MTImyc-DSE II lag bei 52% (n=16, SEM=7,8) und war damit um die Hälfte signifikant reduziert im Vergleich zu MTImyc. Die cDNAs MTImyc-DSE III und MTImyc-DSE I/II wurden mit „steady state“ Konzentrationen von 65,5% und 63% am stärksten exprimiert (DSEIII: n=14, SEM=7,1; DSEI/II: n=6, SEM=6,4). Zusammengefaßt, es führten alle MTImyc-DSE Konstrukte zu einer Reduktion der Expression im Vergleich zu MTImyc, jedoch wurde mit keinem der einzelnen DSEs eine derartig starke Expressionsreduktion erreicht wie mit dem Komplex DSE I-III, d.h. wie mit MTIImyc.

Diese Ergebnisse erlauben folgenden Schluß: Möglicherweise befindet sich in dem Abschnitt DSE I ein Sequenzelement, das die Nonsense-mutierte mRNA destabilisiert und eine Expressionsreduktion zur Folge hat. Dies kann jedoch nicht der einzige Faktor sein, der die Abwesenheit des mutierten MyBP-C Proteins bedingt. In diesem Fall würde man eine ähnliche Expressionsreduktion für den Abschnitt DSE I/II erwarten, in dem sich das mutmaßliche Sequenzelement ebenfalls befindet. Die Stärke der Expression steht aber auch in keinem direkten Verhältnis zur Länge der exprimierten cDNA, denn das Konstrukt MTImyc-DSE I/II wurde stärker exprimiert als MTImyc-DSE I. Im Hinblick darauf kann gleichzeitig die Vermutung ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlichen Expressionsstärken auf unterschiedlichen Transfektionseffizienzen beruhen. Es ist anzunehmen, dass bei der cDNA MTIImyc mehrere Faktoren die stark reduzierte Expression des verkürzten MyBP-C bewirken. Neben dem Einfluß möglicher mRNA-destabilisierender Sequenzelemente könnten

dies auch bestimmte Sekundärstrukturen sein, die sich zwischen dem vorzeitigen Stop und dem nativen Terminationscodon ausbilden und u.U. die Translation verhindern.

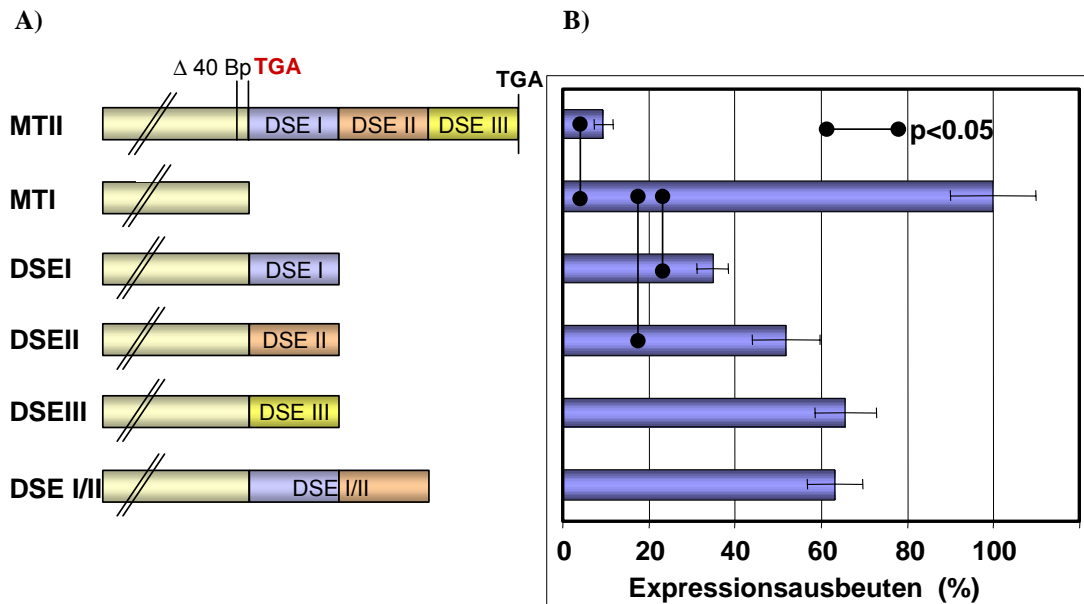


Abbildung 28: Quantifizierung der „steady state“ Expression der MTI-myc-DSE cDNA-Konstrukte in neonatalen Kardiozyten. „Downstream sequence elements“ (DSE) vermitteln die Suppression von verkürztem MyBP-C in neonatalen Kardiozyten. Fragmente des Plasmids pCIneoMTII-myc, die entweder ein oder zwei mutmaßliche DSEs der MyBP-C cDNA umfassen (DSE I, II, III, I/II), wurden 3' zum vorzeitigen Stop in pCIneo-MTI-myc platziert. Die resultierenden Plasmide wurden transient in neonatalen Kardiozyten exprimiert. 48 h nach der Transfektion wurden Gesamtproteinfraktionen der Zellen gewonnen, in 8%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und anschließend geblottet. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit dem anti-MyBP-C Antikörper R76. Zelluläres Aktin wurde zur Ladenormalisierung mit Hilfe des monoklonalen anti-Aktin Antikörpers (Ab-1) markiert. **A)** zeigt schematisch die getesteten cDNA Konstrukte und **B)** die jeweils entsprechenden densitometrisch ermittelten „steady state“ Expressionsausbeuten der MTI-DSE Plasmide. Die Balken entsprechen den prozentualen Mittelwerten mit den jeweiligen Standardabweichungen (SEM). Das mutierte MyBP-C MTI-myc wurde am stärksten exprimiert. Der Mittelwert wurde auf 100% gesetzt. Die unterschiedlichen Expressionsausbeuten von MTI-myc und MTII-myc, von MTI-myc und MTI-myc-DSE I sowie von MTI-myc und MTI-myc-DSE II waren signifikant. (Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Kruskal Wallis und des Dunn's Tests bestimmt.)

IV Diskussion

Der zentrale Gesichtspunkt der vorliegenden Arbeit betrifft den pathogenen Wirkungsmechanismus einer Mutation, die vor einigen Jahren in einer in Bad Nauheim untersuchten HCM-Familie identifiziert wurde.

Anhand einer Kopplungs- und Kandidatengenanalyse wurde in dieser Familie eine Mutation im Gen für das kardiale Myosinbindungsprotein C (*MYBPC3*) auf Chromosom 11 festgestellt. Die Mutation bestand in der Insertion eines Guanins in Exon 25, und zwar zwischen Codon 791 und Codon 792. Die Insertion führt zu einem aberranten Spleiß-Prozess mit der Folge eines vorzeitigen Kettenabbruchs der Translation in Exon 26. Als Ergebnis dieses Abbruchs wird ein C-terminal verkürztes MyBP-C erwartet, dem die Hauptbindungsstelle für Myosin und die Titinbindungsstelle fehlen. Die Familie, in der diese Mutation bei 26 „Genträgern“ nachgewiesen wurde, ist vor allem deshalb von Interesse, weil die Hälfte von ihnen keine oder nur sehr milde Symptome aufwiesen. Die Penetranz innerhalb der Familie ist deswegen unvollständig. Gleichwohl sind auch schwere Verläufe mit letalem Ausgang bekannt: Zwei junge Erwachsene sind an einem plötzlichen Herztod gestorben. Die klinische Analyse der Familie wurde zusammen mit der Identifikation der Mutation publiziert (Moolman et al., 2000).

Der Anlass für die vorliegende Studie, in der die molekularen Konsequenzen der Insertionsmutation in *MYBPC3* analysiert wurden, war der unerwartete Befund, dass das vorausgesagte verkürzte MyBP-C im Herzgewebe eines Patienten nicht nachweisbar war (Moolman et al., 2000). Die immunhistologische Untersuchung der Myektomiegewebeprobe ließ eine im wesentlichen normale Sarkomerstruktur erkennen (Prof. Gautel, pers. Mitteilung). Ähnliche Ergebnisse wurden von anderen Autoren erhalten, denen myokardiales Gewebe eines Patienten für proteinbiochemische Untersuchungen zur Verfügung stand (Rottbauer et al., 1997). In der zurückliegenden Arbeit wurde eine Spleiß-Donor Mutation in Intron 31 des MyBP-C Gens nachgewiesen, die zur Deletion von Exon 32 führt. Als Folge der Mutation wurde ein verkürztes MyBP-C mit einem Molekulargewicht von 124,5 kD erwartet. Dieses wurde in Biopsiegewebe des untersuchten Patienten nicht gesehen.

Die Resultate der Arbeit von J. Moolman (2000) führten zu Anschlußfragen, die in dieser Arbeit untersucht wurden:

- 1) Ist das vorzeitige Stop-Codon in der mutierten mRNA aus Patientengewebe nachweisbar?
- 2) Findet bereits eine Regulation auf mRNA-Ebene statt, d.h. liegen unterschiedliche Transkriptmengen des nicht-mutierten und des mutierten Allels im Herzgewebe des Patienten vor?
- 3) Führt die mutierte mRNA/cDNA in einem kardialen Zellsystem zur Synthese eines verkürzten Proteins? Haben in diesem Zusammenhang mRNA-Sequenzen auf der 3' Seite des vorzeitigen Stop-Codons einen Einfluß auf die Stärke der Proteinsynthese?
- 4) Hat das verkürzte MyBP-C, wenn es exprimiert wird, erkennbare Veränderungen der Sarkomerstruktur zur Folge?

1 Nachweis des vorzeitigen Stop-Codons in der myokardialen mRNA

Zunächst war das erwartete vorzeitige Stop-Codon in Exon 26 der Patienten-mRNA nachzuweisen. (Dieser Nachweis war von J. Moolman nicht erbracht worden.) Auszuschließen war die (nicht sehr wahrscheinliche) gewebespezifische mRNA-Edition, die *in vivo* zu einer Reversion (Suppression) des vorzeitigen Nonsense-Codons in Exon 26 und weiterer folgender Stop-Codons bewirken könnte (Powell et al., 1987; Benne, 1990). Als Translationsprodukt würde dann ein intern deletiertes Protein entstehen, das sich in der Größe nur geringfügig vom nativen MyBP-C unterscheidet. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde RNA aus dem verfügbaren Patienten-Herzgewebe extrahiert und analysiert. Das vorzeitige Stop-Codon in Exon 26 wurde durch die Sequenzierung klonierter RT-PCR-Fragmente in der mutierten, myokardialen mRNA nachgewiesen. Eine mRNA-Edition wurde damit als Ursache für die Abwesenheit des mutierten Proteins ausgeschlossen.

Die Möglichkeit einer tRNA-vermittelten Suppression des vorzeitigen Stop-Codons in Exon 26 erscheint aufgrund des Umstandes, dass 14 weitere Stop-Codons auftreten, die dann auch supprimiert werden müssten, als außerordentlich unwahrscheinlich.

2 Reduzierte Transkriptmengen deuten auf eine Suppression von Nonsense-mRNA hin

MyBP-C wird aufgrund von Proteinsequenz-Homologien und aufgrund seines Ig-typischen modularen Aufbaus der Immunglobulin-Superfamilie zugeordnet. Während der Entwicklung der Lymphozyten werden Immunglobulin-Gene somatisch prozessiert und rearrangiert, was relativ häufig mit der Bildung von nicht-translatierbaren mRNAs einhergeht (Li und Wilkinson, 1998). Aberrante mRNAs sind instabil und werden im Zuge einer mRNA-Qualitätskontrolle („mRNA surveillance“) abgebaut. Ein dafür verantwortlicher Mechanismus ist der sog. „nonsense mediated decay“ (NMD) (Culbertson, 1999). Mit dessen Hilfe werden dysfunktionelle Proteine, die zu „dominant-negativen“ Effekten Anlass geben können, verhindert. Die NMD-abhängige Vermeidung von Transkripten, an denen nicht funktionierende Proteine entstehen könnten, scheint vor allem in Zellen des Immunsystems ausgeprägt zu sein. Dieser Kontrollmechanismus spielt aber auch für die „surveillance“ der mRNA anderer Gene in anderen Zellen eine Rolle (Carter et al., 1995, 1996; Li et al., 1997; Buzina und Shulman, 1999). Es wurde vermutet, dass NMD-gesteuerte Prozesse, wie sie für die Kontrolle von Immunglobulin-mRNA zuständig sind, auch auf Kettenabbruchmutationen in *MYBPC3*-mRNA Anwendung finden.

Zunächst wurde geprüft, ob im Herzgewebe eines „Genträgers“ Wildtyp mRNA und mutierte mRNA in gleichen oder unterschiedlichen Mengen vorliegen. Da das verfügbare Patienten-Herzgewebe für eine Northern Blot Analyse nicht ausreichte, wurden die MyBP-C Transkriptmengen des mutierten und nicht-mutierten Allels mit Hilfe einer semiquantitativen RT-PCR ermittelt. Während das Wildtyp PCR-Fragment bereits nach 18 PCR-Zyklen zu erkennen war, wurde das Fragment mit der mutierten Sequenz erst nach 20 Zyklen nachgewiesen. Die DNA-Banden wurden densitometrisch ausgewertet. Daraus ergab sich rechnerisch, dass die intakte mRNA gegenüber der intern deletierten mRNA im Herzgewebe des Patienten in einem etwa vierfachen Überschuss vorlag. Dieser Wert setzte allerdings voraus, dass die beiden mRNA-Sequenzen bei der reversen Transkription zu Beginn mit gleicher Effizienz in zugehörige einzelsträngige cDNA umgesetzt und anschließend amplifiziert wurden. Unterschiedliche Syntheseraten können nicht a priori ausgeschlossen werden. Zur Kontrolle von denkbaren Einflüssen der Sekundärstrukturen beider mRNAs wurde die Faltung von je 3 kb (vom 3'Ende aus gerechnet) der nicht-mutierten sowie der mutierten mRNA mit Hilfe des Programms „*mfold version 3.1*“ (Zuker et al., 1999; Mathews et al., 1999) bestimmt. Dabei ergaben sich große Ähnlichkeiten sowohl für die räumliche

Faltung der mRNA als auch für die energetische Stabilität der Sekundärstrukturen (ausgedrückt als $-\Delta G$). Der ΔG -Wert für die WT-mRNA war $-1178,71$ kcal/mol, und der für die mutierte mRNA war $-1180,4$ kcal/mol. Die beiden Werte liegen so nahe beieinander, dass Ratenunterschiede bei der reversen Transkription oder bei der zyklischen Amplifikation eher unwahrscheinlich sind.

Es sei angemerkt, dass – im Unterschied zu den hier gezeigten Ergebnissen - in der bereits erwähnten früheren Analyse (Rottbauer et al., 1997) fast identische Werte für MyBP-C Wildtyp und mutierte mRNA gefunden wurden. Es war allerdings nicht eindeutig feststellbar, ob die damaligen Resultate im linearen Bereich der PCR-gesteuerten Produktzunahme erhalten wurden.

Eine präzisere Aussage über die Zahl von mRNA-Molekülen und entsprechende Unterschiede ist mit der Technik der „real time quantitative PCR“ zu erzielen (Heid et al., 1996). Erste Versuche wurden in unserem Labor mit dieser Methode durchgeführt. Sie ergaben einen deutlich größeren Unterschied zwischen WT- und mutierter MyBP-C mRNA als die semiquantitative PCR-Analyse (persönliche Mitteilung von S. Waldmüller). Danach entspricht der Anteil der mutierten mRNA nur einem Zehntel der WT mRNA-Menge. Die Menge an MyBP-C WT mRNA im Patienten-Herzgewebe beträgt zudem nur etwa die Hälfte der Menge, die in einem Herzgewebe eines Nicht-HCM Probanden bestimmt wurde. Das heißt, im Myokard des hier untersuchten Patienten wird der Verlust an mRNA als Folge der Mutation nicht durch vermehrte Expression des Wildtyp-Allels kompensiert.

3 Expressionsanalysen mutierter MyBP-C cDNA

Zur weiteren Analyse der Expression von intern deletierter MyBP-C mRNA wurden Modellexperimente *in vitro* und mit transient transfizierten Zellen in Kultur durchgeführt. Dazu wurden drei verschiedene cDNAs hergestellt: eine cDNA mit der Wildtyp-Sequenz (WT); eine cDNA, die die interne Deletion enthielt und mit dem Stop-Codon in Exon 26 endete (MTI); und eine intern deletierte cDNA, die aber nicht mit dem (vorzeitigen) Stop-Codon endete, sondern im Anschluß an dieses Codon die gesamte ursprüngliche mRNA-Sequenz bis zum physiologischen Stop enthielt (MTII). MTII war also 1.400 Bp länger als MTI.

Es war zu prüfen, ob diese zusätzliche Sequenz einen Einfluß auf die Menge des verkürzten MyBP-C in transient transfizierten Zellen verschiedener Herkunft hatte, und – wenn dies der Fall war – ob dafür NMD oder NMD-ähnliche Vorgänge verantwortlich gemacht werden können.

„Nonsense mediated decay“ existiert in zwei Versionen, einer im Zellkern lokalisierten Form, die bevorzugt oder sogar ausschließlich auf intron-haltige RNA-Moleküle wirkt (Sun und Maquat, 2000; Carter et al., 1996) und einer cytoplasmatischen Form, die vollständig gespleißte, also intron-lose mRNA als Substrat akzeptiert (Brocke et al., 2002; Rajavel und Neufeld, 2001). Untersuchungen, die den cytoplasmatischen Abbaumodus analysierten, wurden vor allem in *Saccharomyces cerevisiae*, *Xenopus laevis*, in CHO-Zellen transient transfiziert mit der humanen HEXA cDNA, und in transgenen Mäusen durchgeführt (Hentze und Kuzolik, 1999; Whitfield et al., 1994; Rajavel und Neufeld, 2001; Lim und Maquat, 1992; Lim et al., 1992; Moriarty et al., 1997, 1998).

In Vorversuchen mit zellfreien Retikulozytenextrakten wurde zunächst nachgewiesen, dass mit der Wildtyp cDNA ein Protein voller Länge erhalten wird, und daß die Mutanten cDNAs MTI und MTII beide zu identisch verkürzten Formen von MyBP-C ($\approx 66\%$ der Masse des nativen Proteins) führen. Damit wurde erstens bestätigt, dass die Stop-Codons in Exon 26 in der erwarteten Weise funktionierten, und es wurde zweitens gezeigt, dass die unterschiedlichen Längen von MTI und MTII zumindest *in vitro* keinen Einfluß auf die Exprimierbarkeit der mutierten cDNAs haben.

3.1 Expression mutierter MyBP-C cDNAs in COS-1 Zellen und in neonatalen Kardiozyten

Die drei cDNAs WT, MTI und MTII wurden anschließend in COS-1 Zellen analysiert. Alle drei Formen der cDNA wurden exprimiert, und zwar prinzipiell ähnlich wie in Retikulozytenextrakten *in vitro*. Es gab geringe, aber statistisch nicht signifikante Unterschiede im Expressionsniveau der drei cDNAs (WT, n=16; MTI, n=20; MTII, n=17). Damit wurde gezeigt, dass in COS-1 Zellen beide Formen, die lange (MTII) wie die kurze Form (MTI), in nahezu gleichem Umfang für die Synthese eines verkürzten Myosinbindungsproteins geeignet sind. Das heißt, die Anwesenheit von nativen, aber nicht translatierbaren Sequenzen in der an MTII gebildeten mRNA beeinflusst deren Menge und Verwendung in COS-1 Zellen offenbar nicht.

Im Gegensatz dazu wurden erhebliche Unterschiede in den Expressionsniveaus der drei cDNAs nach Transfektion von neonatalen Rattenkardiozyten beobachtet. Untersucht wurden einerseits Western Blots von Gesamtprotein der Zellen (mit polyklonalem anti-MyBP-C Antikörper R76) und andererseits Zellen nach immunhistologischer Färbung (mit monoklonalem anti-c-myc Antikörper) und Auszählung von markierten Zellen im konfokalen Mikroskop.

Im Western Blot war die Expression der WT cDNA wegen der Kreuzreaktion des polyklonalen Antikörpers mit dem Rattenprotein in den Kardiozyten nicht auswertbar. Das verkürzte Protein, das mit MTI erhalten wurde, war deutlich markiert (s. Abb. 20). Zellen, die mit MTII transfiziert wurden, enthielten dagegen kein entsprechendes, verkürztes MyBP-C.

Die indirekte Immunfluoreszenz hat dieses Bild verfeinert. Da bei dieser Methode der monoklonale anti-c-myc Antikörper verwendet werden konnte, wurden auch Zellen sichtbar gemacht, in denen das rekombinate Wildtyp-Protein exprimiert worden war. Nach Auswertung von mehreren tausend Zellen ergab sich hinsichtlich der Häufigkeit, mit der protein-positive Kardiozyten gesehen wurden, ein klarer Gradient: WT > MTI > MTII oder in Prozent: WT 100% (n=8) > MTI 35% (n=8) > MTII 7% (n=12). Die Differenzen zwischen WT und MTII sowie zwischen MTI und MTII waren statistisch signifikant.

Dieses Ergebnis zeigt an, dass weniger Zellen in der Lage sind, MTII zu exprimieren als MTI oder WT. Die wenigen MTII-positiven Zellen waren – nach visueller Inspektion – nicht wesentlich schwächer gefärbt als MTI- oder WT-positive Zellen. Das deutet darauf hin, dass die wenigen Zellen, die das verkürzte Protein herstellten, in ihrer Synthesefähigkeit nur wenig beeinträchtigt waren. Die einzelne Zelle war entweder ganz oder gar nicht befähigt, verkürztes MyBP-C zu produzieren – eine Beobachtung, die vorläufig nicht erklärbar ist.

Die Differenz zwischen der Expression von WT und MTI könnte plausiblerweise auf einen von Ubiquitin abhängigen Abbau von nicht funktionellen Proteinfragmenten zurückgeführt werden (Benharouga et al., 2001; Hershko et al., 2000). Ein solcher Mechanismus würde dann auch das Expressionsniveau von MTII betreffen. Daß heißt, das niedrige Niveau der MTII-Expression könnte auf zwei Faktoren zurückgeführt werden, auf RNA-Abbau (oder RNA-Inhibition) und auf Protein-Abbau.

3.2 Einfluß von „downstream“ Sequenzen auf die Expression von MTI

Mit der Annahme, dass NMD-verwandte Prozesse für die Suppression der MTII-Expression verantwortlich sind, entstand die Frage, ob in der MTII mRNA Sequenzen nachgewiesen werden können, die einen solchen Prozess möglicherweise steuern. Aus der Analyse von NMD in Hefe sind Sequenzmotive (Konsensussequenzen) bekannt, die als sog. „downstream sequence element“ (DSE) auf der 3' Seite eines vorzeitigen Stops zu NMD beitragen (Peltz et al., 1993; Hagan et al, 1995; Zhang et al., 1995). Hier wurde zunächst geprüft, ob es in der mRNA (bzw. cDNA) 3' zum außerplanmäßigen Stop Sequenzen gibt, die zur bekannten Hefe-DSE Konsensussequenz (Zhang et al., 1995) homolog sind. Drei solcher DSE-Kandidatensequenzen wurden in der mRNA von MyBP-C identifiziert. Sie sind im folgenden Schema dargestellt:

Hefe-DSE:	5'-.....TGY YGATG YYYYY.....-3'
1. DSE:	5'-TGTACG AGATG CGCGTCTACGCGGTC-3'
2. DSE:	5'-AGGCCTG GATG GCTACAGCGTGGAGT-3'
3. DSE:	5'-ACCC CAGATG TCGGCAACACGGAAAC-3'
Konsensus DSE 1-3:	5'-NNNN CNNGATG NNNNNYNNNNNNN G NNY-3'

Abbildung 29: Vergleich der Hefe-DSE Konsensussequenz mit Sequenzen der MyBP-C cDNA. Homologe Sequenzen sind fett dargestellt. Übereinstimmungen innerhalb der drei MyBP-C Sequenzen sind unterstrichen. Y steht für T oder C; N steht für A, T, G oder C.

Die perfekte Homologie in einem Kernbereich dieser Sequenzen (5'-**GATG**-3') war Anlass zur Herstellung von modifizierten MTI-cDNAs. Die 1.400 Bp lange Sequenz, die in MTII 3' zum vorzeitigen Stop, die drei DSE-Motive enthielt, wurde in drei Subregionen, DSE I, II und III, unterteilt. Diese Subregionen wurden einzeln und in einer Zweierkombination (DSE I plus DSE II) an MTI angehängt. Nach Transfektion in Kardiozyten wurde gefunden, dass MTI in seinem Expressionsniveau tatsächlich beeinträchtigt war, und zwar zeigte sich folgender Gradient in der Stärke der Beeinträchtigung: DSE I > DSE II > DSE III (s. Abb. 28; DSE I, n=14; DSE II, n=16; DSE III, n=14). Es liegt nahe, diesen Gradienten mit dem Vorkommen von DSE-Konsensusmotiven in den Regionen I bis III zu korrelieren. DSE I enthält zwei, DSE II eine und DSE III keine Konsensussequenz. Diese Verteilung könnte die Vorstellung stützen, dass die Konsensusmotive etwas mit der Suppression von MTII zu tun hat. Da eine Kombination von DSE I und II aber nicht zu einer stärkeren, sondern eher zu einer verminderten Suppression führt, muß vermutet werden, daß noch andere Faktoren auf die Exprimierbarkeit der RNA einwirken (z. B. Faltungszustände der RNA).

4 Inkorporation von rekombinanten MyBP-C Produkten in Sarkomerstrukturen

Die indirekte Immunfluoreszenzmarkierung von transfizierten Kardiozyten erlaubte in Kombination mit der Laser-Scanning Mikroskopie nicht nur die Bestimmung, wieviele Zellen transfiziert wurden, sondern es konnte auch festgestellt werden, wie die rekombinanten Proteine in den Zellen verteilt waren und welchen Einfluß sie auf die Struktur der Sarkomere hatten. Die in Abb. 23 gezeigte Verteilung von intakten und in der Struktur veränderten Sarkomere, sowie von diskret und diffus verteilten Myosinbindungsproteinen zeigt ziemlich klar ein im wesentlichen dichotomes Muster. Zunächst gibt es zwischen MTI und MTII zwar einen deutlichen Unterschied in der Bereitschaft der Zellen, rekombinantes Protein zu exprimieren, aber die relativen Anteile der verschiedenen Strukturmuster entsprechen sich beim Vergleich dieser beiden Mutantenversionen. (Das konnte auch erwartet werden, denn MTI-Zellen enthalten dasselbe Proteinfragment wie MTII-Zellen.) Auffällige Unterschiede gibt es dagegen zwischen Zellen mit WT-Protein und Zellen mit Mutantenprotein. WT-Protein wird überwiegend (zu ca. 80%) mit Sarkomeren assoziiert gefunden, und die Sarkomere erscheinen intakt. Das Proteinfragment dagegen wird überwiegend (> 75%) diffus angeordnet gefunden. In 2/3 dieser Zellen (also der Mehrheit) sind die Sarkomere offenbar intakt, aber in einem Drittel werden die normalen Sarkomerstrukturen weitgehend zerstört. Solche groben Beeinträchtigungen der Sarkomerstruktur wurden mit WT-Protein nur in ganz wenigen Ausnahmefällen gesehen.

Man kann also zusammenfassend feststellen, daß die hier untersuchte Mutantenversion des MyBP-C nur selten in normale Sarkomerstrukturen inkorporiert wird, überwiegend diffus verteilt vorliegt und die normale Architektur der Myofilamente relativ oft stark beeinträchtigt.

Es gibt in der Literatur nur wenige Berichte, mit denen diese Resultate konfrontiert werden können. Zu berücksichtigen ist wegen einer Fragestellung, die der hier bearbeiteten ähnlich war, vor allem eine französische Studie von Flavigny und Mitarbeitern (Flavigny et al., 1999). In dieser Studie wurden vier unterschiedlich mutierte MyBP-C cDNA-Klone getestet: Zunächst eine auf die Hälfte verkürzte cDNA; ferner eine normal lange cDNA mit einer Missense-Mutation in der Basenposition 1.656 (das entspricht etwa der Mitte des Proteins); sodann eine cDNA normaler Länge mit einem außerplanmäßigen Stop-Codon, das zu einer Verkürzung des Proteins um etwa 60% führt; und schließlich eine cDNA mit einer internen Deletion der Exon 7-Sequenz. Diese letztere cDNA kodierte für ein Rumpfprotein, das lediglich noch etwa 20% vom N-Terminus des Proteins enthielt (Verkürzung um 80%). Die

von diesen cDNAs abgeleiteten Produkte wurden nach der transienten Transfektion von fötalen Kardiozyten auf ihre Fähigkeit zur Inkorporation in Sarkomere getestet. Beurteilt wurde dabei zugleich, in welchem Umfang die Integrität der normalen Sarkomerstrukturen beeinflusst wurde.

Zu den wichtigsten Ergebnissen gehörte, dass nicht mutiertes und missense-mutiertes MyBP-C normaler Länge relativ gut, verkürzte Myosinbindungsproteine aber nur schlecht in die sarkomerischen A-Banden eingebaut wurden. Die letzteren Proteine wurden zum Teil diffus verteilt im Cytoplasma nachgewiesen. In etwa 50% der Zellen, in denen sie nachweisbar waren, wurde eine erhebliche oder sogar vollständige Desorganisation der myofibrillären Architektur beobachtet. Vor allem dieses Resultat war für die Autoren Anlaß, den pathogenen Mechanismus der verkürzten Myosinbindungsproteine auf einen dominant-negativen Effekt („poison polypeptides“) zurückzuführen.

Ferner wurden unterschiedliche Expressionsniveaus für die verschiedenen Mutanten aufgezeigt. Insbesondere wurden die stark verkürzten Proteine (mit Verkürzungen um 60, bzw. 80% der nativen Länge, bzw. Masse) nur sehr ineffizient exprimiert. Einen direkten Vergleich zwischen cDNAs, die – wie in MTI und MTII – bei unterschiedlichem Sequenzgehalt für gleich lange (verkürzte) Proteine kodieren, gab es in dieser Studie nicht.

Die Ergebnisse der Arbeit aus Paris sind zwar nicht identisch mit den hier berichteten Resultaten, aber in einem gewissen Umfang ergänzen sie sich. So korrespondiert das extrem niedrige Expressionsniveau der cDNAs, die für stark verkürzte Formen von MyBP-C kodieren und im übrigen eine ähnliche Sequenzkonfiguration haben wie die hier verwendete cDNA MTII, mit den vorliegenden Beobachtungen an neonatalen Kardiozyten.

Ferner gibt es eine relativ gute Übereinstimmung bei der Beeinträchtigung der Sarkomerstrukturen durch verschiedene Formen der rekombinanten Proteine. Kurz gesagt, gestörte Strukturen mit vollständig langem Wildtyp Protein oder ebenfalls vollständig langem mutiertem Protein mit lediglich einem Aminosäureaustausch werden selten gesehen. Mit verkürzten Proteinen wurden sie dagegen deutlich oder sogar überwiegend gefunden.

Zu betonen ist, dass eine Beeinträchtigung des Expressionsniveaus bei Vorliegen von Nonsense-Mutationen durch (vermutlich) NMD-vermittelten Abbau von mRNA in der französischen Studie nicht untersucht und auch nicht diskutiert wurde.

5 Haploinsuffizienz oder dominant-negative Wirkung? Die Bedeutung dieser Ergebnisse für ein Verständnis der Krankheit

Die Autoren der zitierten französischen Studie haben sich festgelegt, indem sie ihre Befunde als Argument dafür gewertet haben, daß Mutationen im Gen des MyBP-C eine dominant-negative Wirkung haben. Der wichtigste Punkt war dabei die mit verkürzten Proteinen häufig assoziierte Störung (oder Zerstörung) der Sarkomerstrukturen.

Diese Assoziation wird zwar durch die Befunde dieser Arbeit im Prinzip bestätigt. Jedoch führen die eigenen Resultate zu einer anderen Interpretation. Erstens werden verkürzte cDNAs (wie MTI) in deutlich weniger Zellen exprimiert als WT-cDNA. Zweitens reduziert sich diese Zahl noch einmal erheblich, wenn die cDNA den Zellen in der Form von MTII angeboten wird. Das ist die Form, die der mRNA im Herzgewebe jenes Patienten entspricht, dessen Mutation hier untersucht wurde. Drittens wurde bei einer Subfraktionierung des 3'-Bereichs jenseits der Nonsense-Mutation in Exon 26 eine Sequenz identifiziert, deren Wirkung auf das Expressionsniveau von MTI mit NMD als „RNA surveillance“ (also Abbau von nonsense-mutierter RNA) interpretiert werden kann. (Weitere Untersuchungen sind hier allerdings angezeigt.) Viertens schließlich ist die Beobachtung eines fehlenden mutierten Proteins sowie einer erheblich reduzierten mRNA im Patientengewebe durchaus kompatibel mit den Resultaten, die in dieser Arbeit erhalten wurden.

Es wird also zusammenfassend davon ausgegangen, dass der biologische Ausgangspunkt für die Genese jener Form der HCM, die diese Analyse veranlasst hat, ein Mangel an kardialem MyBP-C ist. Mit anderen Worten wäre „Haploinsuffizienz“ und nicht eine „dominant-negative“ Wirkung die angemessene Interpretation für den von der Mutation ausgelösten Mechanismus.

Diese Schlußfolgerung schließt nicht aus, dass es MyBP-C Mutationen gibt, deren Modus eine „dominant-negative“ Wirkung ist. Die Studie aus Paris liefert dazu auch einen Hinweis. Missense-Mutationen, bei denen es nicht zum Kettenabbruch kommt, werden mit ihren Proteinen in Sarkomerstrukturen integriert, ohne daß diese gestört zu sein scheinen. Solche

Proteine könnten in wenig gestörten Sarkomeren funktionell als „poison polypeptides“ wirken. Man könnte also – etwas spekulativ – postulieren, daß Kettenabbruchsmutationen eher für einen Haploinsuffizienz-Modus, und Missense-Mutationen eher für einen dominant-negativen Wirkungsmechanismus verantwortlich sind.

V Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Klärung des pathogenen Mechanismus einer Mutation im kardialen Myosinbindungsprotein C Gen. Diese Mutation (eine G-Insertion), die zu einer intern deletierten mRNA mit vorzeitigem Stop Codon führt, wurde im Rahmen einer HCM-Familienanalyse identifiziert. Ein C-terminal verkürztes MyBP-C war jedoch im Herzgewebe eines Patienten nicht nachweisbar (Moolman et al., 2000). Es stellte sich die Frage, ob die Krankheit in dieser Familie auf einen „dominant-negativen“ Effekt von sehr wenigen veränderten Proteinen oder auf einen Mangel an normalem MyBP-C (Haploinsuffizienz) zurückzuführen ist. Zur Überprüfung einer möglichen Suppression des mutierten Allels auf mRNA Ebene wurde eine semiquantitative RT-PCR-Analyse myokardialer RNA durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass die nicht-mutierte mRNA in einem vierfachen Überschuß gegenüber der mutierten mRNA im Patienten-Herzgewebe vorliegt. In Modellversuchen wurde sodann die Expression der intern deletierten mRNA in transient transfizierten Zellen untersucht. Hierfür wurden drei MyBP-C cDNAs verwendet: (1) die vollständige Wildtyp cDNA (WT), (2) eine intern deletierte cDNA, die mit dem vorzeitigen Stop-Codon endet (MTI) und (3) eine cDNA, die sich nur durch die interne Deletion von der WT-Sequenz unterscheidet (MTII). Aufgrund einer Leserahmenverschiebung enthält die cDNA MTII (wie die mutierte Patienten-mRNA) zusätzlich zum nativen Stop-Codon ein vorzeitiges Terminationscodon. In COS-1 Zellen führten alle drei cDNAs zur Synthese der erwarteten Genprodukte. In neonatalen Kardiozyten wurde nur das verkürzte Protein vom Typ MTI eindeutig exprimiert. Die cDNA MTII führte nicht, bzw. nur in sehr geringem Ausmaß zur Synthese eines verkürzten MyBP-C (Western Blot). Die Analyse immunfluoreszent markierter Kardiozyten für das c-myc/MyBP-C-Fusionsprotein und für Titin ergab folgende „steady state“ Expressionen: WT>MTI>>MTII. In der Mehrzahl der Zellen, die MTI oder MTII exprimierten, lagen die Rumpfproteine diffus im Cytoplasma vor, ohne eine erkennbare Veränderung der endogenen Sarkomerstruktur hervorzurufen. Ein relativ geringer Anteil von Zellen zeigte eine korrekte, sarkomere Inkorporation der verkürzten Proteine. Aufgrund der unterschiedlichen „steady state“ Konzentration von MTI und MTII in Kardiozyten und aufgrund der Expressionsunterschiede in den verschiedenen Zelltypen wurde ein zelltypspezifischer und intron-unabhängiger Mechanismus vermutet, der die Suppression der Nonsense-mRNA (MTII) und damit eine Reduktion der Synthese des verkürzten MyBP-C bewirkt. Dieser Effekt wurde auf den Einfluß von Sequenzen zurückgeführt, die sich in der

reifen mRNA 3' vom vorzeitigen Stop-Codon befinden. Zur Eingrenzung dieser Sequenzen wurde der Bereich zwischen dem vorzeitigen und dem nativen Stop-Codon in überlappende Fragmente unterteilt und an das Stop-Codon der cDNA MTI angefügt. Die transiente Expression dieser cDNA-Konstrukte (MTI-DSE I, II, III, I/II) führte in Kardiozyten ebenfalls zu einer reduzierten Synthese des verkürzten MyBP-C. Die erhaltenen Ergebnisse, d.h. sowohl die reduzierte Transkriptmenge des mutierten MyBP-C Allels im Patienten-Herzgewebe als auch die geringe Akkumulation verkürzter MyBP-C Proteine in transient transfizierten Kardiozyten erklären den pathogenen Mechanismus der untersuchten MyBP-C Mutation nicht vollständig. Jedoch unterstützen sie die Vermutung, dass die Abwesenheit des verkürzten MyBP-C auf einer Suppression der MyBP-C Nonsense-mRNA basiert und bekräftigen die Vorstellung, dass die HCM in der untersuchten Familie mit einem Mangel an Myosinbindungsprotein C im Myokard assoziiert ist (Haploinsuffizienz). Ein „dominant-negativer“ Effekt einer sehr geringen Menge von veränderten Molekülen auf die Struktur oder auf die regulatorische Funktion der kardialen Sarkomere kann allerdings nicht völlig ausgeschlossen werden.

Literaturverzeichnis

Akhaven-Tafti, H. et al. (1994) *Biolum. And Chemilum. Fundamentals and Applied Aspects* S.199-202, Chichester

Akhaven-Tafti, H. et al. (1995) *Clin. Chem.* 41, 1368-1369

Alyonycheva, T.N., Mikawa, T., Reinach, F.C., Fischman, D.A. (1997) Isoform-specific interaction of the myosin-binding proteins (MyBPs) with skeletal and cardiac myosin is a property of the C-terminal immunoglobulin domain. *J Biol Chem* 272: 20866-20872

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K (2000) *Current protocols in molecular biology*. Wiley Interscience, New York

Bähler, M., Eppenberger, H.M., Walliman, T. (1985) Novel thick filament protein of chicken pectoralis muscle: the 86 kd protein, I: purification and characterization. *J Mol Biol* 186: 381-391

Benharouga, M., Haardt, M., Kartner, N., Lukacs, G.L. (2001) COOH-terminal truncations promote proteasome-dependent degradation of mature cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from post-Golgi compartments. *J Cell Biol* 153(5): 957-970

Benne, R. (1990) RNA editing in trypanosomes: is there a message? *Trends Genet.* 6: 177-181

Bibliography of References using the TNT® Coupled Transcription/Translation Systems #BL001 (1996) Promega Corporation

Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7:1513-1523

Blair, E., Redwood, C., Ashrafian, H., Oliveira, M., Broxholme, J., Kerr, B., Salmon, A., Östman-Smith, I., Watkins, H. (2001) Mutations in the γ_2 subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis. *Human Mol Genet* 10 (11): 1215-1220

Blondel, B., Roijeu, I., Cheneval, J.P. (1971) Heart cells in culture: a simple method for increasing the portion of myoblasts. *Experienta* 27 (3): 356-358

Bonne, G., Carrier, L., Bercovici, J., Cruaud, C., Richard, P., Hainque, B., Gautel, M., Labeit, S., James, M., Beckmann, J., Weissenbach, J., Vosberg, H.-P., Fiszman, M., Komajada, M., Schwartz, K. (1995) Cardiac myosin binding protein-C gene splice acceptor site mutation is associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet.* 11: 438-440

Bonne, G., Carrier, L., Richard, P., Hainque, B., Schwartz, K. (1998) Familial hypertrophic cardiomyopathy from mutations to functional deficits. *Circ Res* 83: 580-593

Bottinelli, R., Coviello, D.A., Redwood, C.S., Pellegrino, M.A., Maron, B.J., Spirito, P., Watkins, H., Reggiani, C. (1998) A mutant tropomyosin that causes hypertrophic cardiomyopathy is expressed in vivo and associated with an increased calcium sensitivity. *Circ Res* 82: 106-115

Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Sherman, D., Demeneix, B., Behr, J.P. (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *PNAS* 92: 7297-7301

- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Brocke, K.S., Neu-Yilik, G., Gehring, N.H., Hentze, M.W., Kulozik, A.E. (2002) The human intronless melanocortin 4-receptor gene is NMD insensitive. *Hum Mol Genet.* 11(3):331-5.
- Buja, L.M., Muntz, K.H., Rosenbaum, T., Haghani, Z., Buja, D.K., Sen, A., Chien, R.K., Willerson, J.T. (1985) Characterization of a potentially reversible increase in β -adrenergic receptors in isolated, neonatal rat cardiac myocytes with impaired energy metabolism. *Circ. Res.* 57 (4): 640-645
- Burnette, W.N. (1981) Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *A. Anal. Biochem.* 112: 195-203
- Buzina, A. und Shulman, M.J. (1999) Infrequent translation of a nonsense codon is sufficient to decrease mRNA level. *Mol Biol Cell.* 10(3):515-24.
- Calvin, N.M. und Hannawalt, P.C. (1988) High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.* 170: 2796-2801
- Carrier, L., Bonne, G., Bahrend, E., Yu, B., Richard, P., Niel, F., Haingue, B., Cruaud, C., Gary, F., Labeit, S., Bouhour, J.B., Dubourg, O., Desnos, M., Hagege, A.A., Trent, R.J., Komajada, M., Fiszman, M., Schwartz, K. (1997) Organization and sequence of human cardiac myosin binding protein C gene (MYBPC3) and identification of mutations predicted to produce truncated proteins in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 80: 427-434
- Charron, P., Dubourg, O., Desnos, M., Isnard, R., Hagege, A., Bonne, G., Carrier, L., Tesson, F., Bonhour, J.B., Buzzzi, J.C., Feingold, J., Schwartz, K. und Komajada, M. (1998) Genotype-phenotype correlations in familial hypertrophic cardiomyopathy: a comparison between mutations in cardiac myosin binding protein-C and beta myosin heavy chain genes. *European Heart Journal* 19: 139-145.
- Carter, M.S., Doskow, J., Morris, P., Li, S., Nihm, R.P., Sandstedt, S., Wilkinson, M.F. (1995) A regulatory mechanism that detects premature nonsense codons in T-cell receptor transcripts in vivo is reversed by protein synthesis inhibitors in vitro. *J. Biol. Chem.* 270: 28995-29003
- Carter, M.S., Li, S., Wilkinson, M.F. (1996) A splicing-dependent regulatory mechanism that detects translation signals. *EMBO J.* 15: 5965-5975
- Chiang, M.-Y., Chan, H., Zounes, M.A., Freier, S.M., Lima, W.F. und Bennett, C.F. (1991) Antisense oligonucleotides inhibit intracellular adhesion molecule 1 expression by two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* 266:18162
- Craig, R. und Offer, G. (1976) The localization of C-protein in rabbit skeletal muscle. *Proc Roy Soc London ser B* 192: 451-454
- Cuda, G., Fananapazir, L., Epstein, N.D., Sellers, J.R., (1997) The in vitro motility activity of β -cardiac myosin depends on the nature of the β -myosin heavy chain gene mutation in hypertrophic cardiomyopathy. *J. Muscle Res. Cell Moti.* 18: 275-283
- Culbertson, M.R. (1999) RNA-surveillance unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer. *Trends Genet.* 15: 74-80
- Czaplinski, K., Ruiz-Echevarria, M.J., Gonzalez, C.I. und Peltz, S.W. (1999) Should we kill the messenger? The role of the surveillance complex in translation termination and mRNA turnover. *Bioessays* 21: 685-696

- Davies, M.J. (1984) The current status of myocardial disarray in hypertrophic cardiomyopathy. *Br Heart J* 51: 361-363
- Davis, J. S., Hassanzadeh, S., Winitzky, S., Lin, H., Sartorius, C., Vemuri, R., Aletras, A. H., Wen, H., Epstein, N.D. (2002) The overall pattern of cardiac contraction depends on a spatial gradient of myosin regulatory light chain phosphorylation. *Cell* 107: 631-641
- Dennis, J.E., Shimizu, F., Reinach, F.C., Fischman, D.A. (1984) Localization of C-protein isoforms in chicken skeletal muscle: ultrastructural detection using monoclonal antibodies. *J Cell Biol* 98: 1514-1522
- Dower, W.J., Miller, J.F. and Rangsdaie, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* 16: 6127-6145
- ECL+Plus System, Manual, Amersham Pharmacia
- Edlund, T., Walker, M.D., Barr, P.J., Rutter, W.J. (1985) Cell-specific expression of the rat insulin gene: evidence for role of two distinct 5' flanking elements. *Science* 230, 912-916
- Ehler, E., Rothen, B.M., Hammerle, S.P., Komiyama, M. und Perriard, J.C. (1999) Myofibrillogenesis in the developing chicken heart: assembly of Z-disk, M-line and the thick filaments. *Journal of Cell Science* 112: 1529-1539
- Einheber, S. und Fischman, D.A. (1990) Isolation and characterization of a cDNA clone encoding avian skeletal muscle C-protein: an intracellular member of the immunoglobulin superfamily. *PNAS USA* 87: 2157-2161
- Evan, G.I., Lewis, G.K., Ramsay, G. und Bishop, J.M. (1985) Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol. Cell. Biol.* 5: 3610-3616
- Fatkin, D., Christe, M.E., Aristizabal, O., McConnell, B.K., Srinivasan, S., Schoen, F.J., Seidman, C.E., Turnbull, D.H., Seidman, J.G. (1999a) Neonatal cardiomyopathy in mice homozygous for the Arg403Gln mutation in the α -cardiac myosin heavy chain gene. *J Clin Invest* 103: 147-153
- Felgner, P.L., Gadeh, T.R., Holm, M., Roma, R., Chan, H.W. Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. und Danielsen, M. (1987) Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-7417
- Ferrans, V.J., Morrow, A.G., Roberts, W.C. (1972) Myocardial ultrastructure in idiopathic hypertrophic subaortic stenosis. A study of operatively excised left ventricular outflow tract muscle in 14 patients. *Circulation* 45: 769-792
- Flavigny, J., Souchet, M., Sebillon, P., Berrebi-Bertrand, I., Hainque, B., Mallet, A., Brie, A., Schwartz, K. und Carrier, L. (1999) COOH-terminal truncated cardiac Myosin-binding protein C mutants resulting from Familial Hypertrophic Cardiomyopathy mutations exhibit altered expression and/or incorporation fetal rat cardiomyocytes. *J. Mol. Biol.* 00: 1-14
- Fougerousse, F., Delzoide, A-L., Fiszman, M.Y., Schwartz, K., Beckmann, J.S., Carrier, L. (1998) Cardiac myosin binding protein C is specifically expressed in heart during murine and human development. *Circ Res* 82: 130-133
- Freiburg, A. und Gautel, M. (1996) A molecular map of the interactions between titin and myosin-binding protein C. Implications for sarcomeric assembly in familial hypertrophic cardiomyopathy. *European Journal of Biochemistry* 235: 317-323

- Frischmeyer, P.A. und Dietz, H.C. (1999) Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum. Mol. Genet.*, 8: 1893-1900
- Frohman, M.A., Dush, M.K. und Martin, G.R. (1988) Rapid production of full length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85: 8998-9002
- Fulton, A.B. und Isaacs, W.B. (1991) Titin, a huge, elastic sarcomeric protein with a probable role in morphogenesis. *Bioessays* 13: 157-161
- Fürst, D.O. und Gautel, M. (1995) The anatomy of a molecular giant. How the sarkomere cytoskeleton is assembled from Immunglobulin-Superfamily molecules. *J Mol. Cell. Cardiol.* 27: 951-959
- Fürst, D.O., Vinkemeyer, U., Weber, K. (1992) Mammalian skeletal muscle C-protein purification from bovine muscle, binding to titin and the characterization of a full-length cDNA. *J Cell Sci* 102: 769-778
- Gautel, M., Fürst, D.O., Cocco, A., Schiffiano, S. (1998) Isoform transitions of the mouse binding protein C family in developing human and mouse muscles: lack of isoform transcomplementation in cardiac muscle. *Circ Res* 82: 124-129
- Gautel, M., Zuffardi, O., Freiburg, A., Labeit, S. (1995) Phosphorylation switches specific for the cardiac isoform of myosin binding protein-C: a modulator of cardiac contraction? *EMBO J.* 14: 1952-1960
- Geisterfer-Lowrance, A.A.T., Christe, M., Conner, D.A., Ingwall, J.S., Schoen, F.J., Seidman, C.E., Seidman, J.G. (1996) A mouse model of hypertrophic cardiomyopathy. *Science* 272: 731-734
- Geisterfer-Lowrance, A.A.T., Kass, S., Tanigawa, G., Vosberg, H.-P., McKenna, W., Seidman, C.E., Seidman, J.G. (1990) A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy. *Cell* 62: 999-1006
- Gilbert, R., Kelly, M.G., Mikawa, T., Fischman, D.A. (1996) The carboxyl terminus of myosin binding protein C (MyBP-C, C-protein) specifies incorporation into the A-band of striated muscle. *J Cell Sci* 109: 101-111
- Gluzman, Y. (1981) SV40-Transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23:175-182
- Gollob, M. H., Green, M. S., Tang, A. S., Roberts, R. (2002) PRKAG2 cardiac syndrome: familial ventricular preexcitation, conduction system disease, and cardiac hypertrophy. *Curr Opin Cardiol.* 17(3):229-34.
- Gollob, M. H., Roberts, R. (2002) AMP-activated protein kinase and familial Wolff-Parkinson-White syndrome: new perspectives on heart development and arrhythmogenesis. *Eur Heart J.* 23(9):679-81.
- Goodwin, J.F und Oakley, C. (1972) The cardiomyopathies. *Br Heart J.* 34: 545-552
- Greener, A. (1990) *Strategies Mol. Biol.* 166: 1-19
- Gregorio, C.C., Granzier, H., Sorimachi, H., Labeit, S. (1999) Muscle assembly: a titanic achievement? *Current Opinion in Cell Biology* 11: 18-25
- Greve, G., Bachinski, L., Friedman, D.L. (1994) Isolation of a de novo mutant myocardial β MHC protein in a pedigree with hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* 3: 2073-2075

- Grün, M. und Gautel, M. (1999) Mutations in beta-myosin S2 that cause familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC) abolish the interaction with the regulatory domain of myosin binding protein-C. *J Mol Biol* 286: 933-949
- Gruen, M., Prinz, H., Gautel, M. (1999) cAPK-phosphorylation controls the interaction of the regulatory domain of cardiac myosin binding protein C with myosin-S2 in an on-off fashion. *FEBS Lett.* 453(3):254-9.
- Hagan, K.W., Ruiz-Echevarria, M.J., Quan, Y., Peltz, S.W. (1995) Characterization of cis-acting sequences and decay intermediates involved in nonsense-mediated mRNA turnover. *Mol. Cell. Biol.* 15: 809-823
- Harary, I. und Farley, B. (1963) In vitro studies on single beating rat heart cells. *Exp. Cell Res*, 29: 451-465
- Harris, S.P., Bartley, C.R., Hacker, T.A., McDonald, K.S., Douglas, P.S., Greaser, M.L., Powers, A., Moss, R.L. (2002) Hypertrophic cardiomyopathy in cardiac myosin binding protein-C knockout mice. *Circ Res* 90 (5): 594-601
- Hartzell, H.C. und Glass, D.B. (1984) Phosphorylation of purified cardiac muscle C-protein by purified cAMP- dependent and endogenous Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 259: 15587-15596
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. und Williams, P.M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6, 986-994
- Hentze, M.W. und Kulozik, A.E. (1999) A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* 96: 307-310
- Hilleren, P. und Parker, R. (1999) Mechanisms of mRNA surveillance in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 33: 229-260
- 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. *Human Mutation* 17(6): 524
- Houmeida, A., Holt, J., Tskhovrebova, L. und Trinick, J. (1995) Studies of the interaction between titin and myosin. *Journal of Cell Biology* 131: 1471-81
- Idowu, S.M., Gautel, M. und Pfuhl, M. (2002) Letter to the editor: sequence specific resonance assignment of the central domain of cardiac myosin binding protein-C. *J Biomol NMR* 22: 199-200
- Invitrogen, 2000. Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit, Instruction Manual. Carlsbad, USA.
- Jaecock, S und England, P. (1980) Phosphorylation of a myofibrillar protein of Mr 150 000 in perfused rat heart, and the tentative identification of this as C-protein. *FEBS Lett* 122: 129-132
- Jeschke, B., Uhl, K., Weist, B., Schröder, D., Meitinger, T., Dohlemann, C., Vosberg, H.-P. (1998) A high risk phenotype of hypertrophic cardiomyopathy associated with a compound genotype of two mutated beta-myosin heavy chain genes. *Hum Genet.* 102(3):299-3
- Khyse-Anderson, J. (1984) Biophys. *Biochem. Methods* 10: 203-209
- Kimura, A., Harada, H., Park, J.E., Nishi, H., Satoh, M., Takahashi, M., Hiroi, S., Sasaoka, T., Ohbuchi, N., Nakamura, T., Koyanagi, T., Hwang, T. H., Choo, J.A., Chung, K.S., Hasegawa, A., Nagai, R., Okazaki, O., Nakamura, H., Matsuzaki, M., Sakamoto, T., Toshima, H., Koga, Y.,

- Imaizumi, T., Sasazuki, T. (1997) Mutations in the troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat. Genet.* 16 (4): 379-382
- Kolmerer, B., Olivieri, N., Witt, C.C., Herrmann, B.G, Labeit, S. (1996) Genomic organization of M line titin and its tissue-specific expression in two distinct isoforms. *J Mol Biol.* 256(3): 556-63.
- Kolodziej, P.A. und Young, R.A. (1991) Epitope tagging and protein surveillance. *Methods Enzymol.* 194: 508-519
- Koshida, S., Kurarsawa, M., Yasuda, M., Sato, N., Obinata, T. (1995) Assembly of cardiac C-protein during myofibrillogenesis in myogenic cells in culture. *Cell Struct Funct* 20: 153-261
- Kunst, G., Kress, K.R., Gruen, M., Uttenweiler, D., Gautel, M., Fink, R.H. (2000) Myosin binding protein C, a phosphorylation-dependent force regulator in muscle that controls the attachment of myosin heads by its interaction with myosin S2. *Circ Res* 86: 51-58
- Labeit, S., Gautel, M., Lakey, A. und Trinick, J. (1992) Towards a molecular understanding of titin. *EMBO J.* 11: 1711-1716
- Labeit, S., und Kolmerer, B. (1995) Titins, giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* 270: 293-296
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. und Boedtke, H. (1977) RNA molecular weight determination by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16: 4743-4751
- Lichtman, J.W. (1994) Konfokale Mikroskopie. *Spektrum der Wissenschaft* 10: 78-84
- Li, S., Leonard, D., Wilkinson, M.F. (1997) T cell receptor (TCR) mini-gene mRNA expression regulated by nonsense codons: a nuclear-associated translation like mechanism. *J. Exp. Med.* 185: 985-992.
- Li, S. und Wilkinson, M.F. (1998) Nonsense surveillance in lymphocytes? *Immunity* 8: 135-141
- Lim, S.K. und Maquat, L.E. (1992) Human beta-globin mRNAs that harbor a nonsense codon are degraded in murine erythroid tissues to intermediate lacking regions of exon I or exons I and II that have a cap-like structure at the 5' termini. *EMBO J* 11: 3271-3278
- Lim, S.K., Sigmund, C.D., Groß, K.W., Maquat, L.E. (1992) Nonsense codons in human beta-globin mRNA result in the production of mRNA degradation products. *Mol. Cell. Biol.* 12: 1149-1161.
- Lin, D., Bobkova, A., Homsher, E., Tobacman, L.S. (1996) Altered cardiac troponin T in vitro function in the presence of a mutation implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 97: 2842-2848
- Lin, Z., Lu, M.H., Schultheiss, T., Choi, J., Holtzer, S., Di Luulo, C., Fishman, D.A., Holtzer, H. (1994) Sequential appearance of muscle-specific proteins in myoblasts as a function of time after cell division: evidence for a conserved myoblast differentiation program in skeletal muscle. *Cell Motil Cytoskel* 29: 1-19
- Malone, R.W., Felgner, P.L. und Verma, I.M. (1989) Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6077-6081

- Mandel, M. und Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53: 159-162
- Maquat, L.E. und Carmichael, G.G. (2001) Quality control of mRNA function. *Cell* 104: 173-176
- Maron, B.J., Bonow, R.O., Cannon III R.O., Leon, M.B., Epstein, S.E. (1987) Hypertrophic cardiomyopathy. Interrelations of clinical manifestations, pathophysiology and therapy. Part I. *New England J Med* 316: 780-790
- Maron, B.J., Bonow, R.O., Cannon III R.O., Leon, M.B., Epstein, S.E. (1987) Hypertrophic cardiomyopathy. Interrelations of clinical manifestations, pathophysiology and therapy. Part II. *New England J Med* 316: 844-852
- Maron, B.J., Gardin, J.M., Flack, J.M., Gidding, S.S., Kurosaki, T.T., Bild, E.D. (1995) Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA study. *Circulation* 92: 785-789
- Maron, B.J., Roberts, W.C., McAllister, H.A., Rosing, D.R., Epstein, S.E. (1980) Sudden death in young athletes. *Circulation* 62: 218-229
- Maruyama, K., Murakami, F., Ohashi, K. (1977) Connectin, an elastic protein of muscle. *Comparative Biochemistry. Journal of Biochemistry* 82: 339-345
- Maruyama, K., Yoshioka, T., Higuchi, H., Ohashi, K., Kimura, S. und Natori, R. (1985) Connectin filaments link thick filaments and Z lines in frog skeletal muscle as revealed by immunoelectron microscopy. *Journal of Cell Biology* 101: 2167-72
- Mathews, D.H., Sabina, J., Zuker, M., Turner, D.H. (1999) Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J. Mol. Biol.* 288: 911-940
- Maurizi, M.R., Trisler, P., Gottesmann, S. (1985) Insertional mutagenesis of the lon gene in E.coli: lon is dispensable. *J. Bacteriol* 164: 1124-1135
- McDonnell, M.W., Simon, M.N. und Studier, F.W. (1977). Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J. Mol. Biol.* 110:119-146
- McKenna, W.J. (1996) Hypertrophic cardiomyopathy. In: Julian, D.G., Camm, A.J., Fox, K.M., Hall, R.J.C., Poole-Wilson, P.A., eds. *Disease of the heart*, 2nd edition London: Saunders: 506-617
- McKenna, W.J. und Camm, A.J. (1989) Sudden death in hypertrophic cardiomyopathy: Assessment of patients at high risk. *Circulation* 80: 1489-1492
- McKenna, W.J., Spirito, P., Desnos, M., Komajada, M. (1997) Experience from clinical genetics in hypertrophic cardiomyopathy: proposal for new diagnostic criteria in adult members of affected families. *Heart* 77: 130-132
- Mendell, J.T. und Dietz, H.C. (2001) When the message goes awry: disease-producing mutations that influence mRNA content and performance. *Cell* 107(4) 411-4
- Modrich, T. und Lehman, I.R. (1975) Enzymatic joining of polynucleotides. *J. Biol. Chem.* 245: 3626-3631

- Mogensen, J., Klausen, I. C., Pedersen, A. K., Egeblad, H., Bross, P., Kruse, T. A., Gregersen, N., Hansen, P. S., Baandrup, U., Borglum, A. D. (1999) α -Cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* 103: R39-R43
- Moolman, J.A., Reith, S., Uhl, K., Bailey, S., Gautel, M., Jeschke, B., Fischer, C., Ochs, J., McKenna, W., Klues, H., und Vosberg, H.-P. (2000) A newly created splice donor site in exon 25 of the MyBP-C gene is responsible for inherited hypertrophic cardiomyopathy with incomplete disease penetrance. *Circulation* 101: 1396-1402
- Moos, C., Offer, G., Starr, R., Bennet, P. (1975) Interaction of C protein with myosin, myosin rod and light meromyosin. *J. Mol. Biol.* 97: 1-9
- Moos, C., Mason, C.M., Besterman, J.M., Feng, I.N.M., Dubin, J.H. (1978) The binding of skeletal muscle C-protein to F-actin with myosin subfragment-1. *J Mol Biol* 124: 571-586
- Moriarty, P.M., Reddy, C.C., Maquat, L.E. (1997) The presence of an intron within the rat gene for selenium-dependent glutathione peroxidase 1 is not required to protect nuclear RNA from UGA-mediated decay. *RNA* 3: 1369-1373
- Moriarty, P.M., Reddy, C.C., Maquat, L.E. (1998) Selenium deficiency reduces the abundance of mRNA for Se-dependent glutathione peroxidase 1 by a UGA-dependent mechanism likely to be nonsense codon-mediated decay of cytoplasmic mRNA *Mol. Cell. Biol.* 18: 2932-2939
- Morwinski, R. (1986) The cultured, myocardial cells as a model in cardiac research. *Biomed. Biochim. Acta* 45 ½: 237-240
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350
- Nielsen, D.A. und Shapiro, D.J. (1986) Preparation of capped RNA transcripts using T7 RNA polymerase. *Nucl. Acid. Res.* 14: 5936
- Niimura, H., Bachinski, L.L., Sangwatanaroj, S., Watkins, H., Chudley, A.E., Mc Kenna, W., Kristinsson, A., Robert, R., Sole, M., Maron, B.J., Seidman, J.G., Seidman, C.E. (1998) Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine* 338: 1248-1257
- 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
- Nishi, H., Kimura, A., Harada, H., Koga, Y., (1995) A myosin missense mutation, not a null allele, cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 91: 2911-2915
- Obermann, W.M., Gautel, M., Steiner, F., van der Ven, P.F., Weber, K. und Fürst, D.O. (1996) The structure of the sarcomeric M-band: localization of defined domains of myomesin, M-protein, and the 250-kD carboxy-terminal region of titin by immunoelectron microscopy. *Journal of Cell Biology* 134: 1441-1453
- Obinata, T., Reinach, F.C., Bader, D.M., Masaki, T., Kitani, S., Fischman, D.A. (1984) Immunochemical analysis of C-protein isoform transitions during the development of chicken skeletal muscle. *Dev Biol* 101: 116-124
- Offer, G., Moos, C., Starr, R. (1973) A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal myofibrils. *J Mol Biol* 74: 653-676

- Okagaki, T., Weber, F.E., Fischman, D.A., Vaughan, K.T., Mikawa, T., Reinach, F.C. (1993) The major myosin-binding domain of skeletal muscle MyBP-C (C-protein) resides in the COOH-terminal immunoglobulin C2 motif. *J Cell Biol* 123: 619-626
- Olson, T.M., Karst, M., Whitby, F.G., Driscoll, D.J. (2002) Myosin Light Chain mutations causes autosomal recessive cardiomyopathy with mid-cavitary hypertrophy and restrictive physiology. *Circulation* 105: 2337-2340
- Peltz, S.W., Brown, A.H. und Jacobson, A. (1993) mRNA destabilization triggered by premature translational termination depends on at least three cis-acting sequence elements and one trans-acting factor. *Genes Dev.* 7: 1737-1754
- Pepe, F. und Drucker, B. (1975) The myosin filament III C-protein. *J Mol Biol* 99: 609-617
- 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
- Promega, (1996) Bibliography of references using TNT[®] Coupled Transcription/Translation Systems #BL001, Promega Corporation
- Powell, L.M., Wallis, S.C., Pease, R.J., Edwards, Y.H., Knott, T.J., Scott, J. (1987) A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein B-48 in intestine. *Cell* 50: 831-840
- Qiagen, 1997. Qiagen Plasmid Purification Handbook. Qiagen, Germany
- Qiagen, 2000. Qiagen Spin Handbook 2000, Qiagen, Germany
- Rajavel, K.S. und Neufeld, E.F. (2001) Nonsense-mediated decay of human *HEXA* mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 21(16): 5512-5519
- Richardson, P., McKenna, W., Bristow, M., Maisch, B., Mautner, B., O'Connell, J., Olsen, E., Thiene, G., Goodwin, J., Gyarfás, I., Martin, I., Nordet, P. (1996) Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation* 93: 841-842
- Rottbauer, W., Gautel, M., Zehelein, J., Labeit, S., Franz, W.M., Fischer, C., Vollrath, B., Mall, G., Dietz, R., Kübler, W., Katus, H.A. (1997) Novel splice donor site mutation in the cardiac myosin-binding protein-C gene in familial hypertrophic cardiomyopathy: characterization of cardiac transcript and protein. *J. Clin. Invest.* 100:475-482
- Ruiz-Echevarria, M.J., Gonzalez, C.I., Peltz, S.W. (1998) Identifying the right stop: determining how the surveillance complex recognizes and degrades an aberrant mRNA. *EMBO J.* 17: 575-589
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Ehrlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- Sambrook, J., Fritsch, E. und Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467

- 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
- Schlender, K. und Bean, L.J. (1991) Phosphorylation of chicken cardiac C-protein by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 266: 2811-2817
- Sebillon, P., Bonne, G., Flavigny, J., Venin, S., Rouche, A., Fiszman, M., Vikstrom, K., Leinwand, L., Carrier, L., Schwartz, K. (2001) COOH- terminal truncated human cardiac MyBP-C alters myosin filament organization. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life Sciences* 324: 251-260
- Seidman, J.G. und Seidman, C.E. (2001) The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* 104: 557-567
- 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
- Shuman, S. (1991) Recombination mediated by *Vaccinia* Virus DNA topoisomerase I in *E. coli* is sequence specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10104-10108
- Shuman, S. (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using *Vaccinia* DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 269: 32678-32684
- Soteriou, A., Gamage, M. und Trinick, J. (1993) A survey of interactions made by the giant protein titin. *Journal of Cell Science* 104, 119-123
- Southern, E. (1979) Gel electrophoresis of restriction fragments. *Meth. Enzymol.* 68:152-176
- Spindler, M., Saupe, K.W., Christe, M.E. (1998) Diastolic dysfunction and altered energetics in the α MHC^{403/+} mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 101: 1775-1783
- Starr, R. und Offer, G. (1971) Polypeptide chains of intermediate molecular weight in myosin preparations. *FEBS Lett.* 15: 40-44
- Starr, R. und Offer, G. (1978) The interaction of the C-protein with heavy meromyosin and subfragment-2. *Biochem J* 171: 813-816
- Studier, F.W. und Moffat, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189: 113-130
- Sun, X. und Maquat, L. E. (2000) mRNA surveillance in mammalian cells: the relationship between introns and translation termination. *RNA* 6(1): 1-8
- Sweeney, H.L., Straceski, A.J., Leinwand, L.A., Tikunov, B.A., Faust, L (1994) Heterologous expression of a cardiomyopathic myosin that is defective in its actin interaction. *J Biol Chem* 269: 1603-1605
- Tabor, S. und Richardson, C.C. (1985) A bacteriophage T7 RNA Polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1074-1078
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354

- Thierfelder, L., Watkins, H., MacRae, C., Lamas, R., McKenna, W., Vosberg, H.-P., Seidman, J. G., Seidman, C. E. (1994) α -tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell* 77: 701-712
- Vincent, R. und Nadeau, D. (1983) A micromethod for the quantification of cellular proteins in Percoll with the Coomassie Brilliant Blue Dye-Binding Assay. *Analytical Biochem.* 135: 355-362
- Vincent, R. und Nadeau, D. (1984). Adjustment of the osmolality of Percholl for the isopycnic separation of cells and cell organelles. *Anal. Biochem.* 141: 322-328
- Vosberg, H.-P. (1998) Die genetischen Ursachen der hypertrophischen Kardiomyopathie. *Medizinische Klinik* 93: 252-259
- Wang, K., McClure, J., Tu A. (1979) Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *PNAS USA* 76: 3698-702
- Wang, S.M., Graeser, M.L., Schultz, E., Bulinski, J.C., Lin, J.J., Lessard, J.L. (1988) Studies on cardiac myofibrillogenesis with antibodies to titin, actin, tropomyosin and myosin. *Journal of Cell Biology* 107: 1075-83
- Watkins, H., Conner, D., Thierfelder, L., Jarcho, J.A., MacRae, C., McKenna, W.J., Maron, B.J., Seidman, J.G., Seidman, C.E. (1995) Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet.* 11: 434-437
- Watkins, H., Thierfelder, L., Hwang, D.S., McKenna, W., Seidman, J.G., Seidman, C.E (1992) Sporadic hypertrophic cardiomyopathy due to de novo myosin mutations. *J. Clin. Invest.* 90: 1666-1671
- Weber, F.E., Vaughan, K.T., Reinach, F.C., Fischman, D.A. (1993) Complete sequence of human fast-type and slow-type muscle myosin-binding protein-C (MyBP-C): differential expression, conserved domain structure and chromosome assignment. *Eur J Biochem.* 216: 661-669
- Weeks, I., Beheshti, I., McCapra, F., Campbell, A.K., Woodhead, J.S. (1983) Acridinium esters a high-specific-activity labels in immunoessays. *Clin. Chem.* 29:1474-1479
- Weisberg, A. und Winegrad, S. (1996) Alteration of myosin cross bridges by phosphorylation of myosin-binding protein C in cardiac muscle. *PNAS USA* 93: 8999-9003
- Weisberg, A. und Winegrad, S. (1998) Relation between crossbridges structure and actomyosin ATPase activity in rat heart. *Circ Res* 83: 60-72
- Whitfield, T.T., Sharpe, C.R., Wylie, C.C. (1994) Nonsense-mediated mRNA decay in *Xenopus* oocytes and embryos. *Dev. Biol.* 165: 731-734
- Whiting, A., Wardale, J., Trinick, J. (1989) Does titin regulate the length of muscle thick filaments? *Journal of Molecular Biology* 205: 263-268
- Wigle, E.D., Sasson, Z., Henderson, M.A. et al. (1985) Hypertrophic cardiomyopathy: the importance of the site and the extent of hypertrophy: A review. *Prog. Cardiovasc. Dis* 28: 1-83
- Winegrad, S. (2000) Myosin binding protein C, a potential regulator of cardiac contractility. *Circ Res* 86: 6-7
- Winegrad, S. (2001) Gene mutation in cardiac myosin binding protein C. *J Mol Cell Cardiol* 33: 1555-1559

- Yamamoto, K. und Moos, C. (1983) The C-proteins of rabbit red, white, and cardiac muscles. *J Biol Chem* 258: 8395-8401
- Yang, Q., Anbe, A., Osinska, H., Hewett, T.E., Klevitsky, R. und Robbins, J. (1999) In vivo modeling of myosin binding protein-C familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation Research* 85: 841-847
- Yang, Q., Sanbe, A., Osinka, H., Hewett, T.E., Klevitsky, R., Robbins, J. (1998) A mouse model of myosin binding protein C human familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 102: 1292-1300
- Yasuda, M., Koshida, S., Sato, N., Obinata, T. (1995) Complete primary structure of chicken cardiac C-protein (MyBP-C) and its expression in developing striated muscle. *J Mol Cell Cardiol* 27: 2275-2286
- Zhang, S., Ruiz-Echevarria, M.J., Quan, Y., Peltz, S.W. (1995) Identification and characterization of a sequence motif in nonsense-mediated mRNA decay. *Mol. Cell. Biol.* 15: 2231-2244
- Zuker, M., Mathews, D.H., Turner, D.H. (1999) Algorithms and thermodynamics for RNA secondary structure prediction: A practical guide. *RNA Biochemistry and Biotechnology*: 11-43. J. Barciszewski und B.F.C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers.

Anhang

Sequenzen verwendeter Oligonukleotide

In der folgenden Tabelle sind die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten Oligonukleotide aufgelistet. Dabei befindet sich in der ersten Spalte die laborinterne Nummer des Primers, gefolgt von der Sequenz und in der letzten Spalte das betreffende Gen bzw. Anmerkungen zum Verwendungszweck.

Primer Nr.:	Sequenz	Gen/Verwendungszweck
890 F	CAA GAT TGA CTT CGT ACC CAG GCA GC	MyBP-C, Bp 1934 cDNA
891 R	ACT TGA GGG AGA CCG TGG TGT	MyBP-C, Bp 2700 cDNA
892 F	GGT GAC AGC GAT GAG TGG GTG	MyBP-C, Bp 2148 cDNA
893 R	TCT TCT TGC GCT CCA GGA TGT	MyBP-C, Bp 2469 cDNA
928Sac I/F	TAT CAG AGC TCG GTG ACA GCG ATG AGT GGG TG	MyBP-C, Bp 2148 cDNA
1155	5'GAC CGG CGC AAG AAG AAG AAG AGC TAC CGG TGG ATG CAG CTG AGT CGA CAG CTC 3'	Klonierungsoligonukleotid für das Konstrukt MIT
1156	5'GAG CTG TCG ACT CAG CTG CAT CCA CCG GTA GCT CTT CTT CTT CTT GCG CCG GTC3'	Klonierungsoligonukleotid für das Konstrukt MIT
1180 R	ACT GTC AGC GTA TGC CGT GTG	MyBP-C, Bp 235cDNA
1184	GAC TCT TCC ACT ACG ACG G	MyBP-C, Bp 558 cDNA
1192	ATG CCT GAG CCG GGG AAG AA	MyBP-C, Bp 33 cDNA
1193	CGC GGG CTG AGA AGG TGA TG	MyBP-C, Bp 564 cDNA
1195 F	ACC GTG GGT GGC AGC ATC AC	MyBP C, Bp 531 cDNA
1265	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	universeller Primer T7
1266	AGG GTC CTC CAG GCT TCT AC	universeller Primer T3
1311HindIII/R	AGC TCA AGC TTT GGG GGG ACC GAT AGG CAT GA	MyBP-C, Bp 2643 cDNA
1433 F	TTA AGG CTA GAG TAC TTA ATA	T7EEV Promotor-Primer
1503 R	TGT GCA GCT CGA ACA GAT AGA CCT TG	MyBP-C, BP 683 cDNA
1504 F	5'GCT AGC CTC GAG ATG GAG CAA AAG CTC ATT TCT GAA GAG GAC TTG CCT GAG CCG GGG AAG AAG CCA3'	enthält die c-myc Epitop- Sequenz
1527 R	CCA TTT GCC CTT GAA CCA CTT	MyBP-C, Bp 589 cDNA
1805 F	GGG ATT CTG GAC TTC AGC TC	MyBp-C, Bp 871 cDNA
1806	CAG GTG TGA CGT CGT CAA TG	MyBP-C, Bp 1838 cDNA
1807 F	GGG CTG ACA GAG CAC ACA TC	MyBP-C, Bp 2795 cDNA
1824 R	GCC CTT GAG CCT CTT TAG CAT G	MyBP-C
1825 F	CCA GGC GGT GTT CAA ATG TGA G	MyBp-C, Bp 1711 cDNA

1932SalI/F	GAG CTG TCG ACA CTT CGA CCT GAT TCA GGA GCT	Klonierung DSE I und I/II
1933NotI/R	TTT TCC TTT TGC GGC CGC CCT GGA AAG GGA TGA GAA GG	Klon. DSE I

<u>Primer Nr.:</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Gen/Verwendungszweck</u>
1934SalI/F	GAG CTG TCG ACC ACC TGC GCC AGA CCA TTC A	Klon. DSE II
1935NotI/R	TTT TCC TTT TGC GGC CGC TAA AGA CGG GCT CCT TGG TGG	Klon. DSE II und I/II
1936SalI/F	GAG CTG TCG ACT CAT TGG CAA TGG CTA CTA CTT C	Klon. DSE III
1937NotI/R	TTT TCC TTT TGC GGC CGC TCA CTG AGG CAC TCG CAC	Klon. DSE III
2177 R	CAA GGA CCG CAG CAT CTT CAC	RT-PCR
2148 F	TCT GCG CGT AGA GCA TGT GGT	RT-PCR

Bedingungen für RT-PCR und „nested“ PCR:

RT-Reaktion Ansatz:

	RNA (750 ng)
	1,0 µl Primer 891 (150 ng / µl)
ad	11,5 µl ddH ₂ O

Die Inkubation dauerte 5 min bei 70°C. Die Proben wurden dann sofort auf Eis gestellt und wie folgt auf 20 µl aufgefüllt:

RT-Reaktion Ansatz:

4 µl	5x RT-Puffer (Invitrogen)
2 µl	DTT (0,1 M)
0,5 µl	Rnasin (40 U / µl)
1 µl	dNTPs (je 2,5 mM)
1 µl	MoMULV-RT (200 U / µl)

Die Inkubation dauerte 1 h bei 37°C, gefolgt von einem Denaturierungsschritt 5 min bei 95°C.

1. PCR Ansatz:

8 µl	10x PCR-Puffer
6 µl	25 mM MgCl ₂
8 µl	dNTPs (je 2,5 mM)
2 µl	Primer 890 (150 ng / µl)
1 µl	Taq DNA-Polymerase
ad	80 µl ddH ₂ O

Die PCR-Bedingungen waren

1 Zyklus:	94°C / 4 min
30 Zyklen:	58°C / 50 s
	72°C / 60 s
	94°C / 50 s
1 Zyklus:	72°C / 8 min

2. PCR Ansatz:

5 µl	PCR-Produkt aus der 1. PCR
5 µl	10x PCR-Puffer

3 μl MgCl_2 (25 mM)
 4 μl dNTPs (je 2,5 mM)
 1 μl Primer 928 (150 ng / μl)
 1 μl Primer 1311 (150 ng / μl)
 1 μl Taq DNA-Polymerase (1 U / μl)
 ad 50 μl dd H_2O

Die PCR-Bedingungen waren 1 Zyklus: 95°C / 4 min
 30 Zyklen: 58°C / 50 s
 72°C / 60 s
 94°C / 50 s
 1 Zyklus: 72°C / 8 min

Bedingungen für die RT-PCR und die PCR mit biotinyliertem Primer 2177:

RT-PCR Ansatz: RNA (750 ng)
 1 μl Primer 891 (20 μM)
 ad 11 μl dd H_2O

Die Inkubation dauerte 5 min bei 70°C. Die Proben wurden dann sofort auf Eis gestellt und wie folgt auf 20 μl aufgefüllt:

RT-PCR Ansatz: 4 μl 5x 1st Strang Puffer
 2 μl DTT (0,1 M)
 1 μl dNTPs (je 2,5 mM)
 1 μl Rnase out (40 U / μl)

Vorinkubation 2 min bei 42°C, dann wurde

1 μl Super Script II RT (200 U / μl) hinzugefügt, kurz durchmischt und der gesamte Ansatz 50 min bei 42°C und dann 15 min bei 70°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend auf Eis abgekühlt.

PCR Ansatz: 2,5 μl 10x PCR-Puffer
 1,5 μl MgCl_2
 2,0 μl dNTPs (je 2,5 mM)
 1 μl Primer 2177
 1 μl Primer 2148
 2,0 μl 1st Strang Reaktion
 0,1 μl Goldstar Taq DNA-Polymerase
 ad 25 μl dd H_2O

Die PCR-Bedingungen waren siehe Stephan! Nach den Zyklen 14, 16 18, 20 und 22 wurden jeweils Proben entnommen und sofort eingefroren.

Lebenslauf

Name: Yvonne Mücke

Geburtsdatum: 04.11.1968

Geburtsort: Bad Nauheim

Familienstand: verheiratet, ein Kind

Schulbildung: 1975-1979 Grundschule in Ober-Wöllstadt
1979-1985 gymnasialer Zweig Gesamtschule Friedberg (Hessen)
1985-1988 Burggymnasium Friedberg (Hessen)
Abitur im Juni 1985

Berufsausbildung: 1988-1991 Ausbildung zur Augenoptikerin bei der Firma „Brille und Linse“ in Gießen

Studium: WS 91/92 bis SS 93 Grundstudium im Fach Biologie/Diplom an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt a. M.
September 1993 Vordiplom

WS 93/94 bis WS 95 Hauptstudium im Fach Biologie/Diplom an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt a. M.
März 1996 Diplom

Mai 1996 bis März 1997 Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt a. M.
Thema der Diplomarbeit: „Genetische Charakterisierung der essentiellen Gene *YBR155w*, *YBR156c* und *YBR 159w* von *Saccharomyces cerevisiae*.

Juni 1997 Beginn der Dissertation am Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung in Bad Nauheim.