

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

(Direktor: Prof. Dr. med. J. Neumann)

**Untersuchung zur altersabhängigen Expression der Proteine Plakoglobin,
Plakophilin und ZASP/Cypher im menschlichen Myokard**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Winnie Mangold

geboren am 23.04.1982 in Vorwerk

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Joachim Neumann
2. Prof. Dr. Wolfram-Hubertus Zimmermann, Göttingen
3. Prof. Dr. med. Frank Ulrich Müller, Münster

11.03.2014

28.04.2015

Referat

Strukturproteine in Desmosomen, die benachbarte Kardiomyozyten verbinden, sowie der Z-Scheibe, die Sarkomere und den kontraktile Apparat der Zelle mit der Zellmembran verbindet, sind wichtig für die Aufrechterhaltung und Organisation des Herzmuskels. Mutationen oder die Abwesenheit vieler dieser Proteine wie auch der desmosomalen Proteine Plakoglobin und Plakophilin und des Z-Scheiben-Proteins ZASP/Cypher stehen mit Herzerkrankungen wie ARVC und DCM in Verbindung.

In dieser Studie sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Expression der Proteine Plakoglobin, Plakophilin und ZASP/Cypher einer altersabhängigen Expression unterliegt. Dafür wurden 53 Proben männlicher Patienten (Durchschnittsalter 67) mittels Immunhistologie und Western Blot Verfahren untersucht. Alle Patienten waren mit β -Blockern behandelt worden, die meisten auch mit ACE-Hemmern (oder AT1-Antagonisten), ASS und Statinen. Das mittlere NYHA-Stadium lag bei 2 ($\pm 0,4$).

Die Ergebnisse der Studie sind nicht eindeutig. Eine lineare Korrelation konnte nicht nachgewiesen werden, wohl aber signifikante Unterschiede zwischen Altersgruppen. Es konnten außerdem eine positive Korrelation zwischen ZASP/Cypher und Plakoglobin und signifikante Einflüsse von ASS und ACE-Hemmern auf die Plakoglobin-Expression festgestellt werden. Um eindeutigere Ergebnisse zu bekommen, sind größer angelegte Studien nötig.

Mangold, Winnie: Untersuchung zur altersabhängigen Expression der Proteine Plakoglobin, Plakophilin und ZASP/Cypher im menschlichen Myokard, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 65 Seiten, 2014

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Desmosom	2
1.2 Armadillo-Proteine	3
1.2.1 Plakoglobin	3
1.2.2 Plakophilin	5
1.3 Z-Scheibe	8
1.3.1 Cypher/ZASP	9
2 Zielstellung	11
3 Material und Methoden	12
3.1 Humane Proben	12
3.2 Auswahl der Patienten	12
3.3 Homogenisation	13
3.4 Proteinbestimmung	13
3.5 Proteinabhängigkeit	13
3.6 SDS-Gelelektrophorese	14
3.7 Western Blot	14
3.8 Immunologische Identifizierung der Proteine	14
3.9 Quantifizierung der Proteinexpression	15
3.10 Statistische Auswertung	16
3.11 Immunhistologische Darstellung der Proteine	16
3.12 Bezugsquellen	16
4 Ergebnisse	17
4.1 Immunhistologie	17
4.1.1 Cypher	17

4.1.2 Plakoglobin	17
4.1.3 Plakophilin	18
4.2 Proteinabhängigkeit	19
4.3 Western Blot	21
4.4 Altersabhängigkeit	23
4.5 Abhängigkeit von der EF	30
4.6 Korrelation der Proteine untereinander	31
4.7 Lineares Regressions Modell	31
4.8 Vergleich von Vorhof und Ventrikel	33
5 Diskussion	37
5.1 Altersabhängigkeit	38
5.2 Veränderte Expression bei Erkrankungen	40
5.3 Abhängigkeit von Medikamenten	43
5.3.1 Plakoglobin und Medikamenteneinnahme	44
6 Zusammenfassung	46
7 Literaturverzeichnis	47
8 Anhang	58
8.1 Übersicht der eingeschlossenen Patienten	58
8.2 Zusammensetzung der Lösungen und Puffer	60
8.3 Bezugsquellen	62
8.3.1 Bezugsquellen der verwendeten Substanzen	62
8.3.2 Bezugsquellen der verwendeten Geräte	64
9 Thesen	65

Abkürzungsverzeichnis

A	Atrium
Abb.	Abbildung
ACE-Inhibitor	Angiotensin converting enzyme-Inhibitor, Angiotensin-Konversionsenzym-Hemmer
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ASS	Acetylsalicylsäure
AT ₁ Rezeptorantagonisten	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1-Antagonisten
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BSA	Albumin aus Rinderserum
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CCS	Canadian Cardiovascular Society
CSQ	Calsequestrin
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DMF	N,N,-Dimethylformamid
DTT	Dithiothreitol
ECF	enhanced chemifluorescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat
EF	Ejektionsfraktion
et al.	et alii
f. c.	final concentration
h	hour, ≙ Stunde

HCl	Chlorwasserstoff
HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
HRP	horseradish peroxidase
kDa	Kilodalton
M	Molar
m	Milli
mA	Milliampère
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
n	Anzahl
NaCl	Natrium Chlorid
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
NYHA	New York Heart Association
pH	potentia hydrogenii, negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PGM1	Phosphoglutamase 1
PKC	Proteinkinase C
PKP	Plakophilin
rel.	relativ
rpm	rounds per minute, $\hat{=}$ Umdrehungen/Minute
s.	siehe
SDS	Natriumlaurylsulfat

SEM	standard error of the mean, $\hat{=}$ Standardfehler des Mittelwertes
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences, benutzte Version SPSS 14.01; 2006, SPSS Inc., Chicago, USA
s. u.	siehe unten
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
V	Ventrikel
w/v	weight per volume, $\hat{=}$ Gewicht/Volumen
ZASP	Z band alternatively spliced PDZ-containing protein, Z Scheiben-assoziertes-Protein

Einleitung

1 Einleitung

Für die Entstehung und Aufrechterhaltung mehrzelliger Organismen ist die Stabilität einzelner Zellen sowie die Stabilität von Zellverbänden von grundlegender Bedeutung. Für diese Stabilität und die Kommunikation der Zellen miteinander sind Zell-Zell-Verbindungen verantwortlich. Eine Form dieser Zell-Zell-Verbindung ist das Desmosom (s. Abb. 1).

Mit Plakoglobin und Plakophilin werden in der vorliegenden Studie zwei Proteine untersucht, die beim Aufbau der Desmosomen eine wichtige Rolle einnehmen.

Außerdem essentiell für das Überleben höher entwickelten Organismen ist die Fähigkeit des Herzmuskels zur Kontraktion und damit zur Aufrechterhaltung der Blutzirkulation. Bei dieser Kontraktion spielt die Gliederung der Muskelfasern in Myofibrillen und weiter in Sarkomere eine entscheidende Rolle. Die Grenzen zwischen den Sarkomeren werden durch sogenannte Z-Scheiben gebildet (s. Abb. 1). Cypher (beim Menschen ZASP genannt) ist ein Protein, das in den Z-Scheiben vorkommt und in dieser Arbeit näher untersucht wird.

Vor dem Hintergrund der demographischen Entwicklung in der westlichen Welt wird das Verständnis der Prozesse die bei der Alterung des menschlichen Herzens ablaufen immer wichtiger. Es dient der Entwicklung neuer therapeutischer Angriffspunkte und Prognosestandards. Mit zunehmendem Alter werden erworbene Herzerkrankungen wie Arrhythmien und Herzinsuffizienz häufiger. In der vorliegenden Studie wurden drei Proteine (s. o.) untersucht, deren fehlerhafte Funktion oder veränderte Expression eine Veränderung der mechanischen Stabilität und Kontraktilität des menschlichen Herzens nach sich ziehen können. Sie könnten damit mitverantwortlich sein für altersbedingte Veränderungen am menschlichen Herzen und damit verbundene erhöhte Anfälligkeit für verschiedene Erkrankungen.

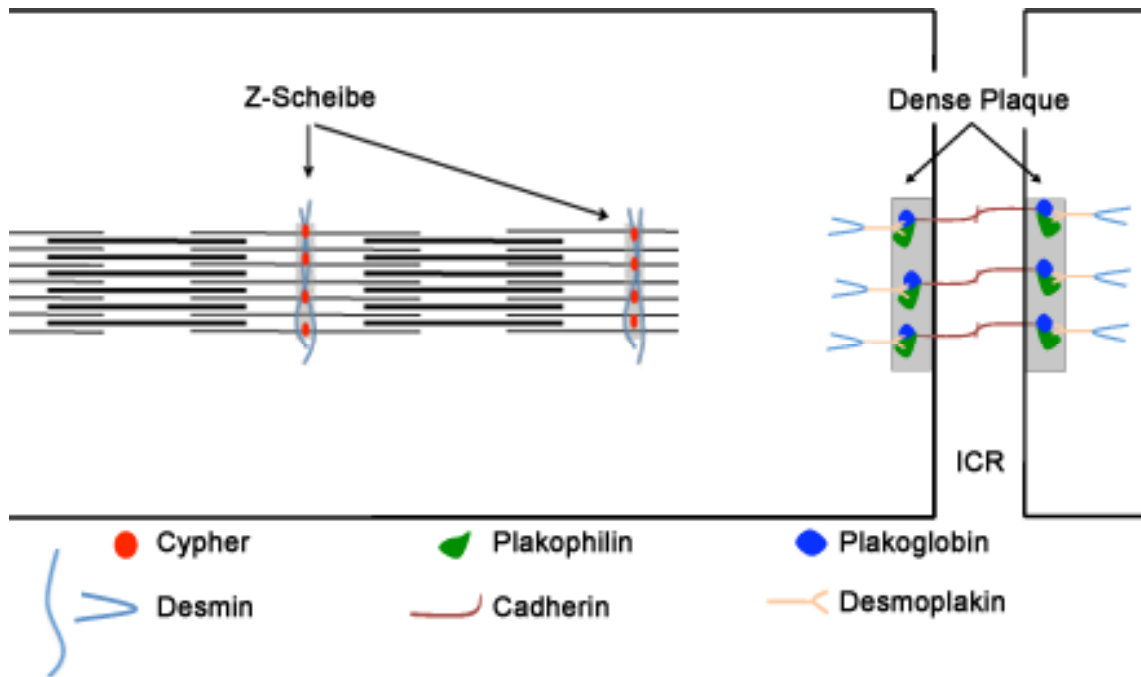


Abb. 1 (basierend auf Clark et al., 2002 und Goossens und van Roy, 2005):

Schema von zwei angeschnittenen Herzmuskelzellen, die über ein Desmosom verbunden sind. Plakoglobin und Plakophilin befinden sich in den "dense Plaques" des Desmosomen. Sie binden Cadherine, die die Zellen im Interzellularraum verbinden. Über Desmoplakin verankern sie Intermediärfilamente (Desmin).

Cypher ist in den Z-Scheiben lokalisiert. Z-Scheiben begrenzen Sarkomere und werden durch Quervernetzungen der Aktinfilamente z. B. durch Desmin gebildet.

ICR = Interzellularraum

1.1 Desmosom

Desmosomen (Maculae adhaerentes) sind Zell-Zell-Verbindungen, die v. a. in Geweben mit mechanischer Beanspruchung wie dem Herzmuskel oder der Epidermis vorkommen. Sie sind extrem wichtig für den Zusammenhalt des entsprechenden Gewebes (Kowalczyk et al., 1997), da sie mechanische Stabilität verleihen, ohne dabei den parazellulären Transport zu behindern. Die Zusammensetzung von Desmosomen ist je nach Zelltyp und Epithelschicht leicht variabel. Die Hauptbestandteile sind jedoch immer: desmosomale Cadherine (Desmoglein, Desmocollin), Plakoglobin, Plakophilin (beides Armadillo-Proteine) und Plakine (z.B. Desmoplakin).

Desmosomen bestehen aus zwei intrazellulären Plaques (dense plaques), die sich jeweils in eine innere und eine äußere Schicht untergliedern lassen. Zur äußeren

Einleitung

Schicht gehören neben den Proteinen Plakoglobin und Plakophilin der C-Terminus der desmosomalen Cadherine und der N-Terminus von Desmoplakin. Zur inneren Schicht gehören der C-Terminus von Desmoplakin und die Verbindungen zu den Intermediärfilamenten (z. B. Desmin).

Die desmosomalen Cadherine der benachbarten Zellen überbrücken den Interzellularspalt und bilden in dessen Mittellinie durch ihre Interaktion eine elektronenmikroskopische Verdichtung (Grossmann et al., 2004).

Im Herzmuskel sitzen die Desmosomen hauptsächlich an den Glanzstreifen (Disci intercalares), den End-zu-End-Verbindungen der Herzmuskelzellen (Schiebler, 2002).

1.2 Armadillo-Proteine

Die Armadillo-Protein-Familie (armadillo-like-proteins) ist eine Gruppe von Adhäsionsmolekülen, die aus drei Untergruppen besteht: die klassischen Catenine, zu denen Plakoglobin und β -Catenin gehören, die Plakophiline 1-3 und die p120-verwandten Proteine (Franke et al., 1989; Reynolds et al., 1992; Mertens et al., 1996). Ihren Namen erhielt diese Gruppe nach dem Armadillo-Gen, das erstmalig bei *Drosophila* entdeckt wurde (Peifer et al., 1990; Kowalczyk et al., 1997; Bierkamp et al., 1999). Gekennzeichnet werden die Vertreter der Familie durch eine unterschiedliche Anzahl von Aminosäure-Sequenz-Wiederholungen. Eine Armadillo-Sequenz hat jeweils eine Länge von ca. 42 Aminosäuren. Neben dem Vorkommen in der Zellmembran und dem dortigen Wirken als Adhäsionsmoleküle wurde auch die Lokalisierung der Armadillo-Proteine im Zellkern beschrieben (Mertens et al., 1996).

1.2.1 Plakoglobin

Plakoglobin, auch γ -Catenin genannt (Sacco et al., 1995; Bierkamp et al., 1999; Kodama et al., 1999), ist ein Protein, das zur Gruppe der Armadillo-Proteine gehört. Zusammen mit β -Catenin bildet es eine eigene Untergruppe dieser Familie. Beide Proteine sind homolog, d. h. sie stammen von einem gemeinsamen Vorläufer ab und weisen in ihren Aminosäuresequenzen eine hohe Übereinstimmung auf (Butz et al., 1992). Sie bestehen beide aus 12 Armadillo-Wiederholungen (je 42 Aminosäuren) in ihrer zentralen Domäne. Insgesamt sind sie zu 66% identisch und in ihren Armadillo-Wiederholungen stimmen sie sogar zu 77% überein (Kodama et al., 1999). Studien an Plakoglobin-Knockout-Mäusen zeigen in diesen Mäusen eine erhöhte β -Catenin-Konzentration. So kann zumindest ein Teil der verlorenen Zellfunktion über eine vermehrte Expression des Homologes kompensiert werden (Swope et al.; 2012).

Einleitung

Die Tatsache, daß Plakoglobin zu 63% identisch ist mit Armadillo (Peifer und Wleschhaus, 1990) und auch eine hohe Übereinstimmung zwischen menschlichem und bovinem Plakoglobin gezeigt wurde, spricht für einen hohen Konservierungsgrad in der Evolutionsgeschichte (Franke et al., 1989; Peifer et al., 1994) und somit auch für die große Bedeutung von Plakoglobin für den Organismus.

Dafür spricht auch, daß Plakoglobin als einziges Protein überhaupt sowohl in Desmosomen als auch in den Zonula adherens vorkommt (Franke et al., 1989; Sacco et al., 1995; Mertens et al., 1996). In Desmosomen bestehen Bindungen mit den transmembranen Cadherinen Desmoglein und Desmocollin und zu Desmoplakin, welches mit den Intermediärfilamenten der Zelle interagiert. In den Zonulae adherentes ist Plakoglobin mit klassischen Cadherinen (v. a. E-Cadherin) und α -Catenin verbunden (Kowalczyk et al., 1997; Chitaev et al., 1998).

Folgen veränderter Expression und Mutation von Plakoglobin

Plakoglobin spielt eine wichtige Rolle bei der Architektur von Glanzstreifen und der Stabilität von Herzgewebe (Ruiz et al., 1996). So führt eine Phosphorylierung gebundenen Plakoglobins (z. B. über EGF-Signalwege) zu einer Translokation von der Zell-Zell-Verbindung in das Zytoplasma. Dies führt zu einer verminderten Zell-Zell-Adhäsion (Yin und Green, 2004). Zu Phosphorylierungen kann es auch über Tyrosin-Kinasen (Hamaguchi et al., 1993) oder über eine Bindung an Axin kommen. Axin fördert die Herabregulation von Plakoglobin (Kodama et al., 1999).

Eine Studie an Plakoglobin-Knockout-Mäusen zeigt, daß das Fehlen von Plakoglobin bereits in der Embryogenese letal verläuft (Ruiz et al., 1996). Die Todesursache ist eine gestörte Herzfunktion: eine deutlich schwächere Herzkontraktion, die durch eine höhere Herzfrequenz im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen kompensiert werden muss. Zudem kommt es zu häufigen Ventrikelrupturen. In der Immunfluoreszenz zeigt sich außerdem, daß zwar das Herz der Knockout-Mäuse voll ausgebildet ist, Desmosomen jedoch fehlen. In anderen Geweben wie dem Epithel sind Desmosomen dagegen nachweisbar. Bemerkenswert ist: das Fehlen von Desmosomen kann auch schon nachgewiesen werden, bevor das Herz zu schlagen beginnt und somit mechanischem Stress ausgesetzt ist. Dies deutet darauf hin, daß die Ursache der Herzfunktionsstörungen nicht in der mechanischen Belastung zu suchen ist, sondern diese letztendlich nur die durch die Abwesenheit von Plakoglobin verursachten Störungen offenbart (Ruiz et al., 1996).

In den Disci intercalares kann in Abwesenheit von Plakoglobin eine neue Art von Zell-Zell-Verbindungen nachgewiesen werden. In ihnen kommen mit β -Catenin (sonst in

Einleitung

Zonula Adherentes vorkommend) und Desmoplakin (sonst in Desmosomen vorkommend) zwei Proteine nebeneinander vor, die sonst nicht gemeinsam auftreten (Ruiz et al., 1996).

Mechanischer Stress kann über die Aktivierung intrazellulärer Signalwege durch Phosphorylierung von FAK zu einer Hochregulation von Plakoglobin führen, die mit einer Vermehrung der Zell-Zell-Verbindungen im Myokard einhergeht (Yamada et al., 2005).

Eine Studie an Hunden zeigt im Gegensatz zu der oben beschriebenen erhöhten Plakoglobinexpression bei mechanischer Belastung, eine Plakoglobinverminderung bei induzierter terminaler Herzinsuffizienz über eine Downregulierung des auf Chromosom 17q21 lokalisierten Plakoglobin-Gens (Gao et al., 2006).

Mutationen im Plakoglobin-Gen können zu arrhythmogener rechts-ventrikulärer Kardiomyopathie (ARVC) (Franz et al., 2001; Kirchhof et al., 2006, Asimaki et al., 2007) und deren Unterform der Naxos-Krankheit führen (Rampazzo et al., 2002; Kirchhof et al., 2006). Die Naxos-Krankheit zeigt, daß Plakoglobin nicht nur für eine korrekte Herzfunktion, sondern für verschiedenen Funktionen des Organismus wichtig ist. Sie wurde erstmalig auf der gleichnamigen Insel entdeckt und geht einher mit wolligem Haar, palmoplantarem Keratoderma und ARVC. Ursache hierfür ist eine Deletion von zwei Basen, die letztendlich die Stabilisierung der Zell-Zell-Kontakte durch Plakoglobin verhindert (McKoy et al., 2000). Die Veränderungen der Epidermis sind unter anderem durch eine erhöhte Apoptoserate und vermehrte Zellproliferation hervorgerufen (Deqiang et al., 2012).

Für die Entstehung einer ARVC ohne die Symptome der Naxos-Krankheit konnten Asimaki et al. eine Insertionsmutation von 3 Basen im Plakoglobin-Gen anschuldigen (Asimaki et al., 2007).

Heterozygote Plakoglobin-defiziente Mäuse entwickeln eine ARVC, die klinisch durch Ausdauertraining noch verstärkt wird. Diese Mäuse zeigen einen vergrößerten rechten Ventrikel und das vermehrte spontane Auftreten von ventrikulären Arrhythmien und Tachykardien im Alter. Bei jungen Mäusen hingegen wird kein gehäuftes Vorkommen von ventrikulären Arrhythmien beschrieben (Kirchhof et al., 2006).

1.2.2 Plakophilin

Plakophilin ist wie Plakoglobin ein Protein der Armadillo-Familie. Dabei bilden die Plakophiline 1, 2 und 3 zusammen eine eigene Untergruppe dieser Familie (Mertens et al., 1996). Sie ist gekennzeichnet durch 9 Armadillo-Wiederholungen (Mertens et al., 1996; Choi und Weis, 2004). Diese werden von einem kurzen C-Terminus und einem

Einleitung

langen N-Terminus begrenzt. Die Kopf-Domäne am N-Terminus besteht aus einer konservierten Sequenz und ist verantwortlich für alle Bindungen zu anderen Proteinen (Franke et al., 1989; Choi und Weis, 2004; Stokes, 2007). Die drei Varianten sind fast ausschließlich in Zellverbindungen des desmosomalen Typs lokalisiert und dienen dessen Stabilisierung (Hatzfeld, 2006). Sie können aber auch in Zellkernen nachgewiesen werden (Mertens et al., 1996; Bonn  et al., 1999). Daß Plakophiline sowohl in der Zellmembran als auch im Zellkern zu finden sind, spricht für eine zusätzlich zur mechanischen Funktion bestehende Funktion in der Signaltransduktion der Zelle (Schmidt et al., 1997; Hatzfeld, 2006).

Plakophilin 1 und 2 sind in ihrem Aufbau sehr ähnlich und kommen jeweils in zwei unterschiedlich langen Spleiß-Varianten vor. Dabei beschreibt a die kürzere und b die längere Form (Mertens et al., 1996; Chen et al., 2002). Bisher ist kein funktioneller Unterschied zwischen den verschiedenen Plakophilinen bekannt. Sie kommen aber teilweise in unterschiedlichen Geweben vor.

Plakophilin 1 ist vor allem in Epithelien lokalisiert und kommt dort hauptsächlich in den suprabasalen Schichten vor (Hatzfeld et al., 2000). Es bindet desmosomale Proteine wie Desmoplakin (Kowalcyk et al., 1999) und Keratine (Hatzfeld et al., 2000). Au erdemverst rkt es die Rekrutierung von Desmoplakin in die Zell-Zell-Verbindungen und hat so Einfluss auf die Stabilität der Zellmembran (Kowalcyk et al., 1999). Auch für die Desmosomenanzahl und – größe ist Plakophilin 1 von Bedeutung (Hatzfeld et al., 2000; McMillan et al., 2003). Ein Verlust des Proteins führt zu epidermaler Instabilität (McMillan et al., 2003).

Plakophilin 3 ist eine kaum untersuchte Variante des Plakophilins. Es wird in den meisten ein- und mehrschichtigen Epithelien exprimiert. Außerdem ist es in einigen nicht-epithelialen Zellen nachweisbar (z.B. T-Zellen). In Kardiomyozyten und Hepatozyten wird es nicht messbar exprimiert (Bonn  et al., 1999). Im Gegensatz zu Plakophilin 1 und 2 sind keine Spleiß-Varianten bekannt (Bonn  et al., 1999).

Plakophilin 1 und 3 spielen außerdem eine Rolle in der Entwicklung von Tumoren. So konnte für einige Tumoren eine Überexpression von Plakophilin 1 und 3 nachgewiesen werden (Villaret et al., 2000). Genauso konnten jedoch auch Tumoren gefunden werden, die eine verminderte Expression von Plakophilin aufweisen. Diese auf den ersten Blick widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse lassen sich mit den je nach Lokalisation in der Zelle unterschiedlichen Funktionen des Plakophilins erklären: so wirkt Plakophilin in den Desmosomen eher tumorprotektiv während Plakophilin im

Einleitung

Zytoplasma über eine Aktivierung der Translation kanzerogen wirken kann (Wolf und Hatzfeld, 2010).

Plakophilin 2 ist in allen bisher untersuchten Zellen nachweisbar, in denen Desmosomen als Zellverbindungen auftreten (Mertens et al., 1996), z.B. ein- und mehrschichtige Epithelien, Lymphknoten und Herz. Es findet sich aber auch in Geweben, in denen keine Desmosomen gebildet werden (Mertens et al., 1996). Im Herzgewebe ist es das einzige Plakophilin (Grossmann et al., 2004; Syrris et al., 2006). Wie Plakophilin 1 ist Plakophilin 2 auch in Zellkernen nachzuweisen und kommt in einigen Zellen sogar ausschließlich dort vor (Mertens et al., 1996). Es ist die häufigste der drei Plakophilin-Varianten.

Plakophilin 2 interagiert, im Gegensatz zu Plakophilin 1, direkt mit Plakoglobin, Desmoplakin, Desmoglein 1 und 2 (Chen et al., 2002). Für die Bindungen mit Plakoglobin sind wohl die Armadillo-Wiederholungen des Plakoglobins verantwortlich (Chen et al., 2002).

Folgen veränderter Expression und Mutation von Plakophilin 2

Ein Fehlen von Plakophilin 2 führt zu schweren Erkrankungen des betroffenen Organismus. Bei verschiedenen Tierarten wurden Knockout-Studien durchgeführt. Beim Zebrafisch führt das Fehlen von Plakophilin 2 während der Embryogenese zu einer verminderten Herzfrequenz, kardialen Ödemen sowie einer abnormen Ventrikelanatomie (Moriarty et al., 2012).

Homozygote Knockout-Mäuse sterben bereits während der Embryogenese (Grossmann et al., 2004). Es bilden sich Blutgerinnsel in den Herzhöhlen und im Perikard. Herzrupturen wie bei Plakoglobin-Knockout-Mäusen kommen nicht vor. Es ist also anzunehmen, daß das Blut über kleine Leckagen aus den Kammern ins Perikard übertritt. Außerdem haben Knockout-Mäuse weniger Trabekel in den Ventrikeln und dünnere Wände in den Herzvorhöfen als Wildtyp-Mäuse (Grossmann et al., 2004). Desmoplakin, das bei Wildtyp-Mäusen, wie bei Menschen, in den Desmosomen mit Plakophilin, Plakoglobin und anderen desmosomalen Proteinen ko-lokalisiert ist, lässt sich bei homozygoten Knockout-Mäusen nicht im Desmosomen, sondern im Zytoplasma nachweisen. Desmoglein 2 kann dagegen gar nicht nachgewiesen werden (Grossmann et al., 2004). Während bei Wildtyp-Mäusen schon in der Embryogenese die Glanzstreifen im Herzgewebe mit ihren unterschiedlichen Formen von Zellverbindungen gut ausgebildet sind, lassen sich bei Plakophilin-2-Knockout-Mäusen die verschiedenen Formen der Zellverbindungen kaum voneinander unterscheiden.

Einleitung

Diese Veränderungen beziehen sich aber ausschließlich auf das Herz. In Epithelien und auch im Endothel der Gefäße lassen sich trotz Plakophilin-Abwesenheit keine Veränderungen nachweisen (Grossmann et al., 2004).

Beim Menschen ist ein Zusammenhang zwischen Mutationen im Plakophilin-2-Gen und der ARVC bekannt. Es sind verschiedene Mutationen (z.B. Deletionen, Insertionen, Insertions-Deletions-, Splice-site-, Nonsense- oder Missense-Mutationen) des Plakophilin-2-Gens identifiziert worden, die bei arrhythmogener rechtsventrikulärer Kardiomyopathie an verschiedenen Genloci vorkommen (Syrris et al., 2006; van Tintelen et al., 2006). Die Symptome dieser Erkrankung sind Synkopen und Kammertachykardien. Sie ist auch eine Ursache des plötzlichen Herztodes. Pathophysiologisch kommt es zu einer fibrolipomatösen Degeneration der rechten Kammer, die mit einer Dilatation der Kammer einhergeht. In einer holländischen Studie ließ sich bei ca. 50% der Patienten mit ARVC eine Plakophilin-2-Mutation nachweisen und sogar bei fast 70% der Patienten mit familiärer ARVC (van Tintelen et al., 2006). Zahlreiche weitere Studien dokumentieren einen Zusammenhang zwischen ARVC und Plakophilin-2-Mutationen (Awad et al., 2006; Dalal et al., 2006; Nagaoka et al., 2006; Syrris et al., 2006). Die Penetranz der ARVC kann dabei auch innerhalb von einzelnen Familien variabel sein (Syrris et al., 2006). Sowohl autosomal-dominante als auch rezessive Vererbungen sind bekannt (Syrris et al., 2006). Ob es klinische Unterschiede zwischen ARVC Patienten mit und ohne Plakophilin-2-Mutation gibt ist umstritten. Es gibt Studien in denen keine Unterschiede festgestellt wurden (van Tintelen et al., 2006). Es gibt aber auch Hinweise darauf, daß Patienten mit Plakophilin-2-Mutation früher symptomatisch werden und eine kürzere Überlebenszeit haben als Patienten mit einem intakten Plakophilin-2-Gen (Dalal et al., 2006).

1.3 Z-Scheibe

Die Z-Scheibe (auch Z-Linie) ist die Begrenzung des Sarkomers in der Herz- und Skelettmuskulatur. Ein Sarkomer ist die kontraktile Einheit des Muskels und wird jeweils von zwei Z-Scheiben begrenzt (s. Abb. 1). Die Z-Scheibe vereint sowohl kontraktile als auch elastische Elemente der Zelle und dient so der Stabilisation und der Fähigkeit des Muskels zur Kontraktion (Übersicht bei Luther, 2009). Damit ist sie von enormer Wichtigkeit für die Aufrechterhaltung der Herz-Kreislauffunktionen des Organismus. Viele Herzerkrankungen haben ihren Ursprung in Fehlfunktionen von Proteinen der Z-Scheibe (s. u.).

Einleitung

In der Z-Scheibe werden die Aktinfilamente zweier benachbarter Sarkomere miteinander verbunden und quervernetzt. Dies geschieht v. a. durch α -Aktinin. Außerdem stellt die Z-Scheibe die Verbindung zwischen den Sarkomeren und dem Zytoskelett der Zelle dar. Diese Verbindung erfolgt durch Intermediärfilamente wie Desmin. Noch sind nicht alle Strukturen und Prozesse dieses komplexen Gebildes identifiziert. Ein Protein der Z-Scheibe dessen Rolle noch nicht endgültig geklärt ist, ist Cypher. Es bindet α -Aktinin und Calsarcin (Übersicht bei Goldstein et al., 1991; Zhou et al., 1999) und hat vermutlich noch andere Bindungspartner.

1.3.1 ZASP/Cypher

ZASP (Z band alternatively spliced PDZ-containing protein) ist das humane Homolog zu Cypher, einem in Säugetieren und Fischen nachgewiesenem PDZ-LIM-Protein. Es kommt ausschließlich in den Z-Scheiben von Herz- und Skelettmuskel vor (Zhou et al., 1999). Dort ist es für die Organisation und Stabilität der Z-Scheibe während der Muskelkontraktionen verantwortlich (Zhou et al., 2001, Katzemich et al., 2013). Insgesamt sind bisher sechs verschiedene Spleiß-Varianten von ZASP/Cypher bekannt: Cypher 1c und 1s, Cypher 2c und 2s und Cypher 3c und 3s. „C“ weist dabei auf die herzspezifische (cardial) und „s“ auf die skelettmuskelspezifische (skeletal) Form hin. Die Einteilung erfolgt anhand von herz- (Exon 4) bzw. skelettmuskelspezifischer (Exon 5, 6, 7) Exones. Die kardialen Formen finden sich nicht im Skelettmuskel während die skeletalen Formen auch im Herzmuskel vorkommen (Huang et al., 2003; Arimura et al., 2004). Im Herz überwiegt Cypher 1c während im Skelettmuskel im Laufe des Lebens erst Cypher 1s und später 3s überwiegt (Huang et al., 2003). Die beiden Formen von Cypher 2 sind deutlich kürzer als Cypher 1 und 3. Im Gegensatz zu ihnen weisen sie keine LIM-Domänen auf. Cypher 1 und 3 haben davon jeweils drei (Huang et al., 2003). Allen Cypher Varianten gemeinsam ist die PDZ-Domäne, über die die Bindung an α -Aktinin geschieht (Zhou et al., 1999). Über die LIM-Domäne kann Proteinkinase C gebunden und Cypher phosphoryliert werden (Zhou et al., 1999). Da Cypher 2 keine LIM Domäne aufweist, kann es nicht an Proteinkinase C binden.

Folgen veränderter Expression und Mutation von ZASP/Cypher

Verschiedene Mutationen von ZASP/Cypher sind bekannt. Je nachdem welche Isoformen sie betreffen, kann es zu Kardiomyopathien oder Skelettmuskel-Myopathien kommen. Diese werden unter dem Begriff Zaspopathien zusammengefasst (Selcen

Einleitung

und Engel, 2005; Griggs et al., 2007). Im Herzen sind sowohl Assoziationen mit dilatativer (DCM) und hypertropher (HCM) Kardiomyopathie als auch mit INLVM (isolated non-compaction of the left ventricular myocardium) beschrieben. In einer Studie mit DCM und INLVM Patienten wurden bei 6% der Patienten verschiedene ZASP-Mutationen nachgewiesen (Vatta et al., 2003). In einer japanischen Studie wurden fünf verschiedene Mutationen bei DCM Patienten nachgewiesen. Bei einer dieser Mutationen wurde bei dem mutierten Protein eine erhöhte Affinität zur Proteinkinase C (PKC) festgestellt (Arimura et al., 2004). Auch Herzinsuffizienz und Druckhypertrophie sind mit einer erhöhten PKC-Aktivität assoziiert (Bowling et al., 1999; Simpson, 1999).

Auch die Bindung mit Phosphoglutamase 1 (PGM1) kann durch ZASP/Cypher-Mutationen beeinflusst werden. So wurden in einer Studie DCM-assoziierte Mutationen in den Exons 4 und 10 beschrieben, die die Affinität zu PGM1 signifikant senken (Arimura et al., 2009). Es wurde beschrieben, daß sich PGM1 unter Standardbedingungen im Zytoplasma lokalisieren lässt. Unter Stress (keine Glucose im Nährmedium) kommt es aber zu einer Rekrutierung in die Z-Scheibe und dort zu einer Ko-Lokalisation mit Cypher (Arimura et al., 2009). Ob die geringere Bindung von PGM1 an ZASP/Cypher aber (Mit-) Auslöser für die DCM ist bleibt bisher offen.

In Maus-Knockout-Modellen zeigt sich, daß das gänzliche Fehlen von Cypher letal ist. Cypher wird zur Erhaltung der Z-Linien während der Muskelkontraktionen benötigt. Das zeigt sich an embryonal korrekt angelegten Sarkomeren und Z-Scheiben, deren Ordnung erst nach mechanischer Belastung (Herzschlag) verloren geht. Die Knockout-Mäuse sterben perinatal an desorganisierten und zerrissenen Z-Scheiben (Zhou et al., 2001).

2 Zielstellung

Plakoglobin und Plakophilin sind wichtige Strukturproteine in den Desmosomen. Sie sind so mitverantwortlich für die Verbindung von Nachbarzellen und die Verankerung des Zytoskeletts in der Zellmembran.

ZASP/Cypher ist in der Z-Scheibe der Kardiomyozyten lokalisiert und verantwortlich für die Aufrechterhaltung und Organisation der Z-Scheibe während der Muskelkontraktion.

Die Wichtigkeit dieser Proteine für die störungsfreie Herzfunktion ist belegt. Diverse Mutationsanalysen zeigen einen Zusammenhang dieser Proteine mit verschiedenen Herzerkrankungen wie ARVC, DCM und HCM. Knockout-Modelle an Tieren zeigen, daß ein Fehlen von jedem einzelnen der drei Proteine letale Folgen hat.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Umbauvorgänge am alternden Herzen besser zu verstehen. Dazu soll die Frage beantwortet werden, ob die Expression der Proteine Plakoglobin, Plakophilin und ZASP/Cypher im menschlichen Herzvorhof einer Altersabhängigkeit unterliegt. Diese könnte Erklärungsansätze für das gehäufte Auftreten von Herzerkrankungen und –rhythmusstörungen im Alter liefern. Ferner wird darauf eingegangen, ob bestimmte Medikamente einen Einfluss auf die Expression der oben genannten Proteine haben. Dieses Wissen könnte künftige Therapieansätze verbessern. Zu diesem Zweck wurden Western Blots mit Proben des rechten Herzvorhofs von 53 männlichen Patienten durchgeführt.

3 Material und Methoden

3.1 Humane Proben

Die verwendeten Vorhof-Proben stammen alle aus der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Halle-Wittenberg (Leitung: Prof. R.-E. Silber). Sie wurden in den Jahren 1997 bis 2008 während medizinisch indizierten Herzoperationen jeweils dem rechten Vorhof entnommen. Die Ventrikel-Proben stammen aus der Klinik und Poliklinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Münster (Leitung: Prof. Dr. med. Scheld).

Alle Patienten wurden vor der Operation über die Operation selbst sowie Entnahme und die Verwendung der Gewebeproben für wissenschaftliche Zwecke aufgeklärt und unterschrieben eine Einwilligungserklärung. Die Erlaubnis der zuständigen Ethikkommission für diese Studie wurde eingeholt (Aktenzeichen: hm-bü 04.08.2005). Nach Entnahme wurden die Proben mit flüssigem Stickstoff (-196 °C) gefroren transportiert. Im Institut für Pharmakologie und Toxikologie erfolgte die Lagerung bei -80 °C. Während des Verarbeitungsprozesses wurden die Proben möglichst auf Eis gekühlt oder in flüssigem Stickstoff aufbewahrt um ein Antauen und Denaturieren zu verhindern.

3.2 Auswahl der Patienten

Um ein möglichst homogenes Patientenkollektiv zu gewährleisten, wurden nur Proben männlicher Patienten ohne bekannte Schilddrüsenerkrankung oder -medikation in die Arbeit eingeschlossen. Eine Beeinflussung von kardialen Strukturproteinen durch Schilddrüsenhormone ist bekannt und sollte hier als Störfaktor ausgeschlossen werden. Ausschlusskriterien waren ein NYHA Stadium >3 und eine Ejektionsfraktion (EF) von <30 (gemessen im Linksherzkatheter). Ein Einschlusskriterium war die Therapie mit einem der β -Adrenozeptor-Antagonisten Metoprolol, Carvedilol oder Bisoprolol. Wenn für eine Altersgruppe mehr als 10 Patienten den genannten Kriterien entsprachen, wurden diejenigen eingeschlossen, die objektiv anhand der Patientenakte zum Zeitpunkt der Operation über die besseren Einstufungsergebnisse bezüglich CCS- und NYHA-Stadium, EF und Anzahl der Medikamente verfügten. Zur Überprüfung dieser Kriterien lagen die vollständigen Patientenakten und der Operations-Begleitzettel im Institut vor. Nach Berücksichtigung aller Ein- und Ausschlusskriterien entstand ein Patientenkollektiv von 53 Patienten.

Material und Methoden

Die meisten Patienten wurden mit ASS (72%), Statinen (74%) und ACE-Hemmern bzw. AT-II-Rezeptorantagonisten (77%) behandelt. Jeder Patient wurde mit einem β -Adrenozeptor-Antagonisten behandelt (Einschlusskriterium). In ca. 70% der Fälle handelte es sich dabei um Metoprolol. Durchschnittlich nahm jeder Patient 5,3 verschiedene Medikamente ein (zwischen 3 und 12). Die mittlere EF lag bei 62% ($\pm 11,28\%$), die Mittelwerte von NYHA- und CCS-Klassifikation lagen jeweils bei 2 ($\pm 0,41$ bzw. 0,58). Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Operation zwischen 48 und 85 Jahre alt (Mittelwert: 67). Siehe dazu Tabelle Nr. 4 im Anhang.

3.3 Homogenisation

Das tiefgekühlte Herzgewebe wurde im Mikro-Dismembrator S bei 2100 rpm pulverisiert. Eine Spatelspitze Gewebepulver wurde mit 100 μ l Homogenisationspuffer (Zusammensetzung s. Anhang) vermischt. Anschließend wurde die Lösung auf Eis für 3 \times 15 Sekunden im Ultraschall-Homogenisator behandelt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde 20 Minuten bei 17000rpm zentrifugiert. Die Lagerung des Überstandes erfolgte bei -80 Grad. Alle verwendeten Gefäße und Kleingeräte (Spatel, Pinzette) wurden vor und nach der Verwendung mit Ethanol gereinigt und in flüssigem Stickstoff gekühlt.

3.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry et al. (1951). Als Proteinstandard wurde Rinderserumalbumin verwendet.

3.5 Proteinabhängigkeit

Um die optimale Menge an geladenem Protein für die Western Blots zu ermitteln, wurden für jedes Protein einzeln Proteinabhängigkeiten erstellt. Hierzu wurden ansteigende Mengen Protein (10-120 μ g) geladen und Elektrophorese und Western Blot durchgeführt (s. u.). Für jedes Protein wurden drei Kurven erstellt und Mittelwert und SEM berechnet. Für die folgenden Western Blots wurden dann jeweils 55 μ g Protein pro Spur verwendet.

Material und Methoden

3.6 SDS-Gelelektrophorese

Für die Elektrophorese wurden die Proben mit Homogenisationspuffer auf eine einheitliche Proteinkonzentration gebracht und mit Probenpuffer nach Lämmli aufgefüllt und 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Es wurden jeweils 55 µg Protein pro Spur geladen. Auf jedem Gel wurden ein Standard mit den Molekulargewichten von 116, 66, 45, 35 und 25 kDa und eine Referenzprobe mitgeführt. Alle Gele bestanden aus einem Sammelgel (4%) und einem Trenngel (10%). Die Elektrophorese erfolgte mit ca. 75 mA bei 4°C in einer Hoefer SE600 Elektrophorese-Einheit bis die Lauffront sich dem unteren Rand genähert hatte. Als Stromquelle wurde ein Netzgerät von Biometra (Standard Power Pack P25) benutzt. (Für Puffer- und Gesamtzusammensetzung siehe Anhang)

3.7 Western Blot

Mittels Western Blot wurden die Proteine im elektrischen Feld auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Transfer wurde in einer Hoefer TE62 Tank-Transfer-Einheit für 16h bei 0,28 A und 4°C durchgeführt. Die Transferkammer war wie folgt aufgebaut (Anode→Kathode): Plastik-Schwamm, Filterpapier, Nitrocellulosemembran, Gel, Filterpapier, Plastik-Schwamm. Im Anschluss wurde der Transfer mit einer Ponceau-Färbung kontrolliert. Die Banden des Proteinstandards wurden markiert und die Membranen getrocknet und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.8 Immunologische Identifizierung der Proteine

Für die weiteren Arbeitsschritte wurden die Membranen entsprechen der erwarteten Proteingrößen zerschnitten:

Material und Methoden

Tabelle 1: Proteingrößen in kDa

Protein	Größe (kDa)
Plakophilin	100
Plakoglobin	85
Cypher	80
Calsequestrin	55

Calsequestrin diente auf jedem Gel als Ladekontrolle. Die Membranabschnitte wurden 3x10 min in TBST gewaschen und anschließend wurden unspezifische freie Bindungsstellen mit Milchpulver in TBST (5%ig) geblockt. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Alle Antikörper wurden mit 5% Milchpulver in TBST verdünnt (s. u.). Am nächsten Tag wurden die Membranen wieder in TBST gewaschen und mit dem entsprechenden 2. Antikörper (CSQ: anti rabbit, alle anderen anti mouse) für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. (für Zusammensetzung der Puffer und Quellen der Antikörper siehe Anhang)

Tabelle 2: Verdünnung erster und zweiter Antikörper jeweils in 5% Milchpulver in TBST

Protein	Verdünnung 1. Antikörper	Verdünnung 2. Antikörper
Plakophilin	1:150	1:1000 mouse
Plakoglobin	1:1000	1:1000 mouse
Cypher	1:1000	1:1000 mouse
Calsequestrin	1:10000	1:1000 rabbit

3.9 Quantifizierung der Proteinexpression

Die Blots wurden 2x10 min mit TBST und 2x2 min mit AP-Puffer gewaschen, bevor sie 5 min mit ECF (1:10 in AP-Puffer verdünnt) inkubiert und dann noch einmal 2 min mit reinem AP-Puffer gewaschen wurden. Die so erzeugte Fluoreszenz wurde mit einem

Material und Methoden

PhosphorImager (STORM 860) detektiert und mit der ImageQuant-Software quantifiziert.

Die Blots für die Linearitätsdarstellungen (Proteinabhängigkeit) wurden statt mit ECF mit einer Farbreaktion (NBT/BCIP) entwickelt. Dafür wurde 66µl NBT und 33µl BCIP mit 10ml AP-Puffer gemischt und die Blots für einige Minuten inkubiert und anschließend mit einem Flachbettscanner gescannt. Die Auswertung erfolgte mit ImageQuant-Software.

Um Signalunterschiede zwischen verschiedenen Membranen (Blots) auszugleichen wurden alle Signale auf die mitgeführte Referenzprobe abgeglichen.

3.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit dem Softwareprogramm SPSS, Version 14.01 (SPSS Inc, USA) durchgeführt. Es wurde der T-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Als statistisch signifikant wurden p-Werte < 0,05 angesehen. In alle Graphiken und Berechnungen wurden alle untersuchten Proben eingeschlossen (inklusive Ausreißer). In der Arbeit angegebene Werte sind, wenn nicht anders benannt, Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik in Halle.

3.11 Immunhistologische Darstellung der Proteine

Die immunhistologische Aufarbeitung jeweils einer Probe zur Darstellung der einzelnen Proteine erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der MLU Halle-Wittenberg (Leitung: Prof. Dr. med. Steffen Hauptmann). Dabei wurden die Proben mit Tris/EDTA Puffer (pH 9,0) für 25 min behandelt. Anschließend wurden sie für 30 min mit den Primärantikörpern für Plakoglobin und Cypher (Verdünnung 1:400) bei 37°C inkubiert. Danach wurde mit PBS gespült. Nach einer 15-minütigen Inkubation mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur (Zytochem Plus HRP Kit) wurden die Abschnitte mit PBS gespült und bei Raumtemperatur für 15 min mit HRP inkubiert. Danach wurde wieder mit PBS gespült und die Proben mit AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) entwickelt. Abschließend wurden die Abschnitte mit Aqua dest. gespült und mit Hämalaun gegengefärbt.

3.12 Bezugsquellen

Siehe Anhang ab Seite 62.

4 Ergebnisse

4.1 Immunhistologie

4.1.1 Cypher

Mittels Immunhistologie wurde Cypher im Vorhof-Myokard nachgewiesen. Die durch Antikörper-Bindung entstandene Färbung zeigt eine Verteilung innerhalb der Zellen. Im Zellkern oder der Zellmembran lässt sich kein Cypher nachweisen (s. Abbildung 3). Dies deckt sich mit der aktuellen Literatur, wonach Cypher in den Z-Banden der Muskulatur zu finden ist. Eine genaue Zuordnung zu den Z-Banden gelingt anhand der vorliegenden Darstellung nicht.

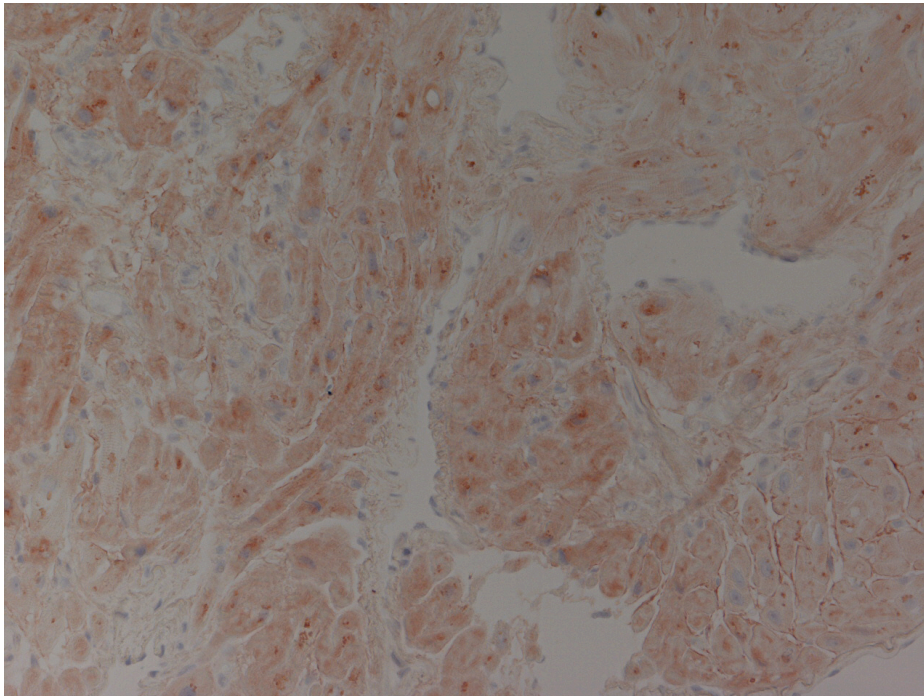


Abbildung 3:

Die Abbildung zeigt einen immunhistologischen Schnitt von menschlichem Myokard (rechter Vorhof). Die dunklen, bräunlichen Areale sind die, in denen die Anwesenheit von Cypher durch Bindung von Antikörpern sichtbar gemacht wurde.

4.1.2 Plakoglobin

Die Anwesenheit von Plakoglobin im Myokard des rechten Vorhofs konnte ebenfalls eindeutig nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, daß Plakoglobin in den

Ergebnisse

Glanzstreifen, den End-zu-End-Verbindungen der Kardiomyozyten, lokalisiert ist. Dies stimmt mit der physiologischen Funktion als desmosomales Protein überein (Mertens et al.,1996). Im Zytosol, in den Zellkernen und den Zellmembranen wurde kein Plakoglobin nachgewiesen (s. Abbildung 4).

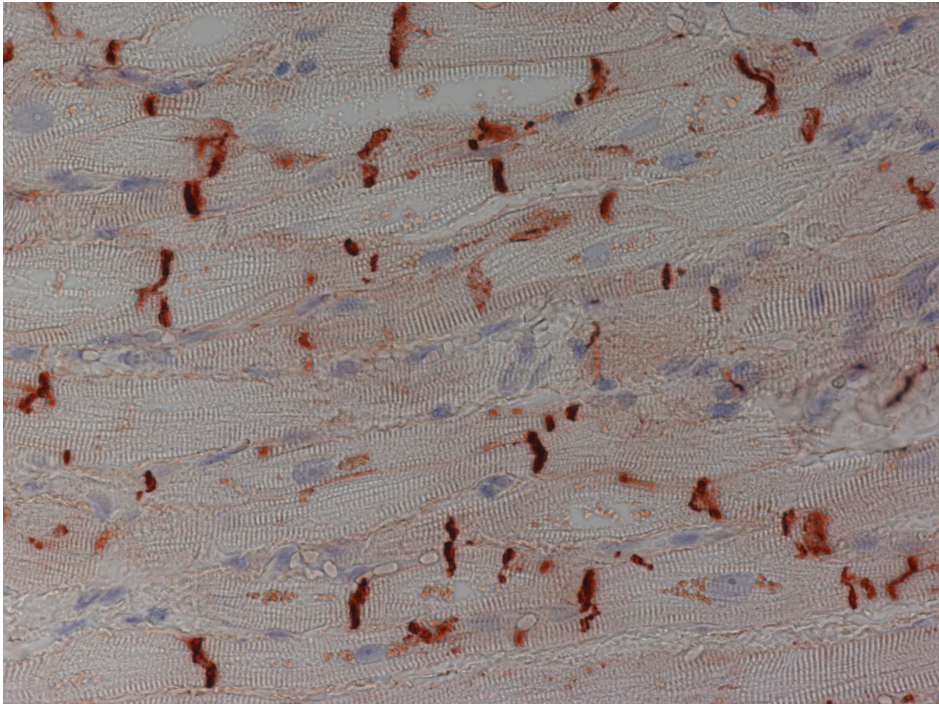


Abbildung 4:

Die Abbildung zeigt einen immunhistologischen Längsschnitt von menschlichem Myokard (rechter Vorhof). Die dunkel gefärbten Areale stellen das durch Bindung des zweiten Antikörpers sichtbar gemachte Plakoglobin dar. Gut zu erkennen ist außerdem die Streifung der Muskelzellen.

4.1.3 Plakophilin

Plakophilin ließ sich immunhistologisch mit dem verwendeten Antikörper nicht darstellen. Die Anwesenheit im Vorhof-Myokard konnte nur im Western Blot nachgewiesen werden (s. u.).

Ergebnisse

4.2 Proteinabhängigkeit

Um eine deutlich detektierbare Menge an Protein laden zu können, bei der trotzdem noch kleine Mengenunterschiede gut sichtbar sind, wurden zu jedem Protein drei Western Blots mit einer Proteinabhängigkeit durchgeführt (s. Abbildung 5). Als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt zeigt sich die erwartete lineare Abhängigkeit. Daß sich bei Plakoglobin und Cypher ab ca. 80 μg ein Abflachen der Kurve zeigt, liegt am ehesten daran, daß die Blots mit einer so hohen Proteinmenge überladen und die Unterschiede in der Signalstärke mit der gewählten Methode in diesem Bereich schwer zu erfassen sind. D.h. man war außerhalb des linearen Bereiches.

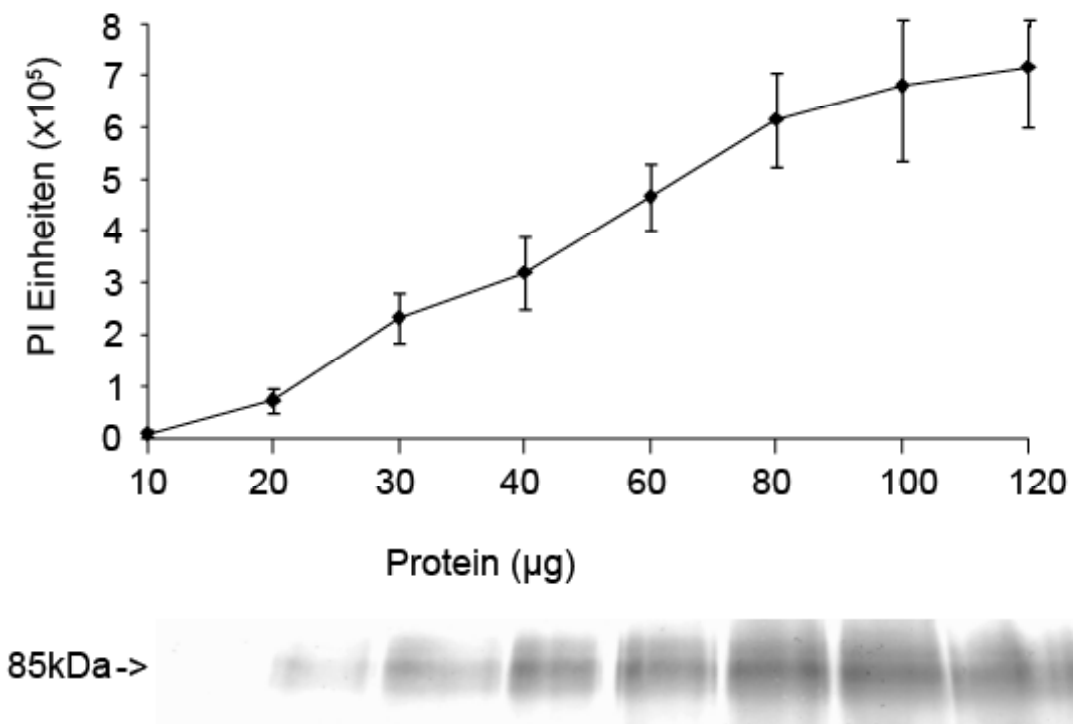


Abbildung 5: Plakoglobin

Proteinabhängigkeit von Plakoglobin mit einer steigenden Proteinkonzentration von 10 bis 120 μg . Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM, $n=3$ und ein exemplarischer Western Blot.

Ergebnisse

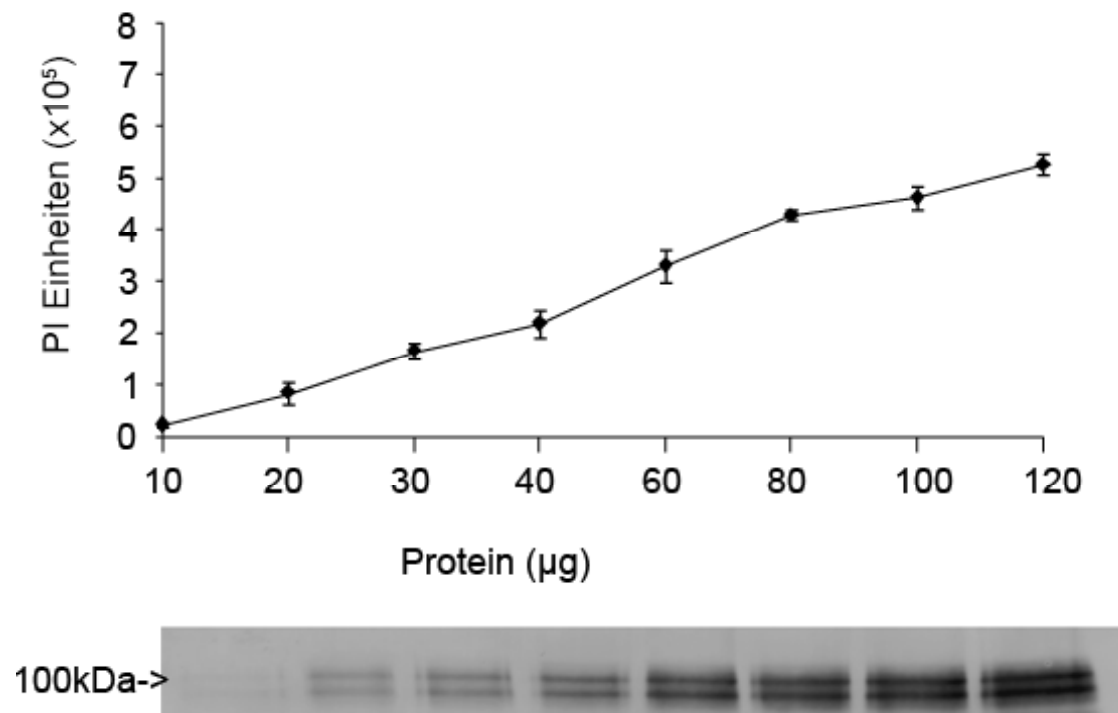


Abbildung 6: Plakophilin

Proteinabhängigkeit von Plakophilin mit einer steigenden Proteinkonzentration von 10 bis 120 µg. Dargestellt sind Mittelwert ± SEM, n=3 und ein exemplarischer Western Blot.

Ergebnisse

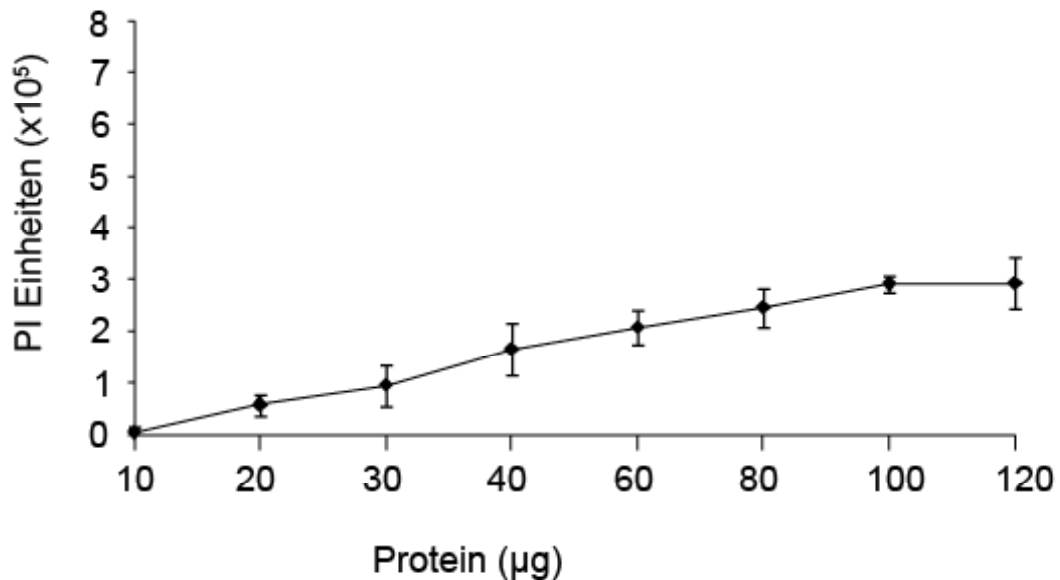


Abbildung 7: Cypher

Proteinabhängigkeit von Cypher mit einer steigenden Proteinkonzentration von 10 bis 120 µg. Dargestellt sind Mittelwert ± SEM, n=3 und ein exemplarischer Western Blot.

4.3 Western Blot

Die Größe der im Western Blot dargestellten Banden entspricht den Werten aus der Literatur. Plakophilin wurde bei ca. 100kDa als Doppelbande nachgewiesen (Abb. 8) . Dies entspricht den bekannten Splice-Varianten Plakophilin 2a und 2b (Mertens et al.,1996). Plakoglobin wurde auf einer Höhe von ca. 85 kDa nachgewiesen (Abb. 9). Bei Cypher zeigten sich auf einer Höhe von ca. 80 kDa mehrere dünne Banden (Abb. 10), die den verschiedenen Splice-Varianten entsprechen (Huang et al., 2003). Auffällig sind sehr große Unterschiede in der Signalstärke zwischen den einzelnen Proben.

Ergebnisse

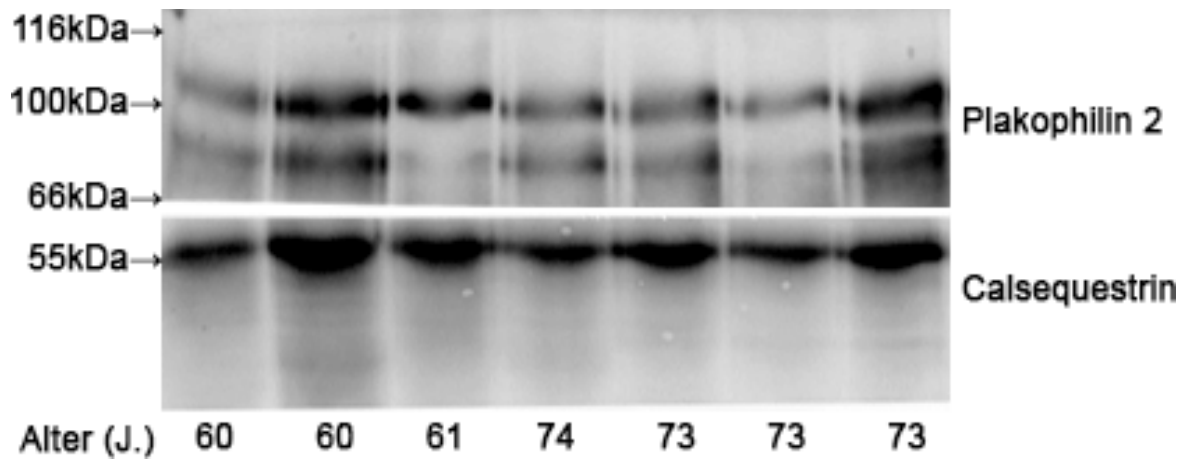


Abbildung 8: Plakophilin

Dargestellt ist ein exemplarischer Western Blot mit Patienten unterschiedlichen Alters. Die Signalstärke von Plakophilin ist individuell sehr unterschiedlich. Die Ladekontrolle durch Calsequestrin ist mit abgebildet.

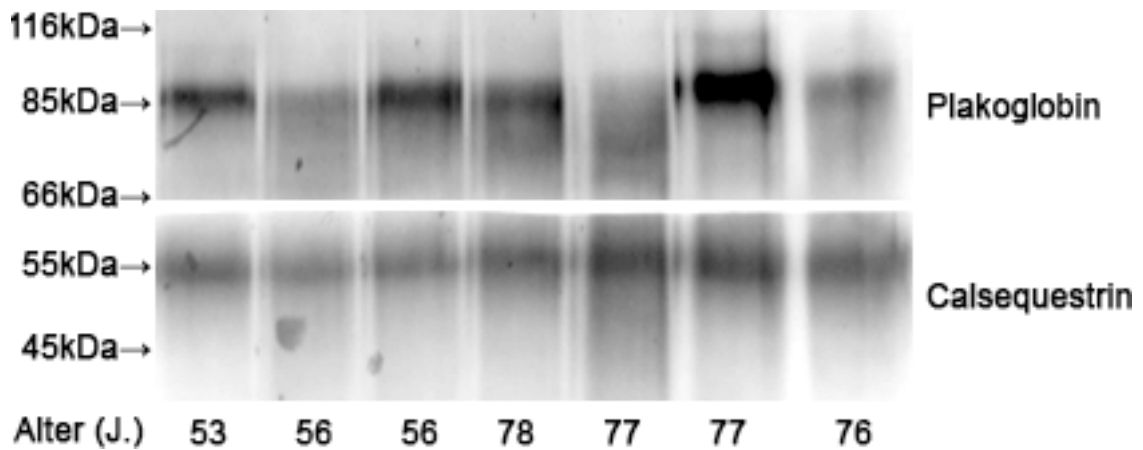


Abbildung 9: Plakoglobin

Dargestellt ist ein exemplarischer Western Blot mit Patienten unterschiedlichen Alters. Die Signalstärke von Plakoglobin ist individuell sehr unterschiedlich. Die Ladekontrolle durch Calsequestrin ist mit abgebildet.

Ergebnisse

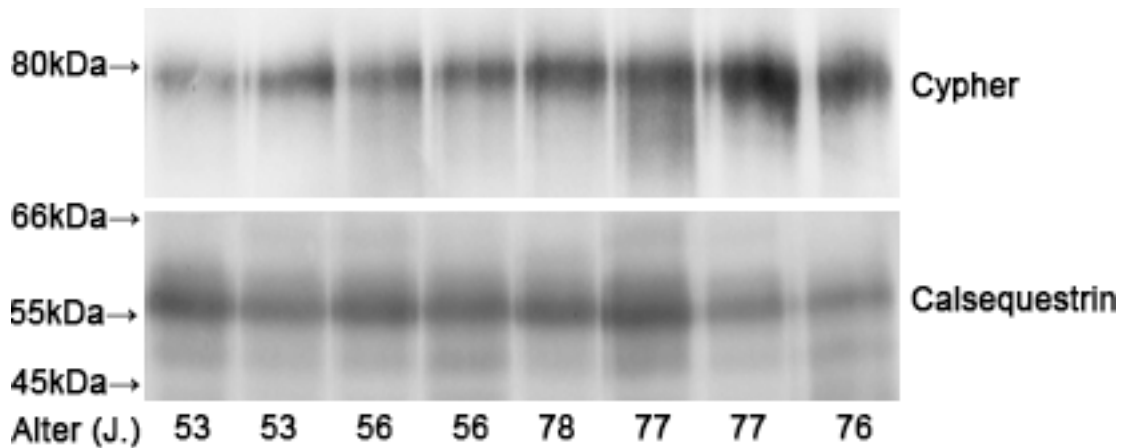


Abbildung 10: Cypher

Dargestellt ist ein exemplarischer Western Blot mit Patienten unterschiedlichen Alters. Die Signalstärke von Cypher ist individuell sehr unterschiedlich. Die Ladekontrolle durch Calsequestrin ist mit abgebildet.

4.4 Altersabhängigkeit

Um der Frage nachzugehen, ob ein Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten und der Proteinexpression besteht, wurden die Ergebnisse als Punktwolken und als Fehlerbalkendiagramm dargestellt. Hierfür wurden die Patienten in 10-Jahres-Intervallen zusammengefasst, sodaß sich 4 Gruppen mit je 5 bis 19 Patienten pro Gruppe ergaben (12 Patienten < 60 Jahre; 17 Patienten zwischen 60 und 69 Jahren; 19 Patienten zwischen 70 und 79 Jahren; 5 Patienten >80 Jahre).

Ein linearer Zusammenhang zwischen Alter und Protein ließ sich für keines der drei untersuchten Proteine finden. Am ehesten lassen die Diagramme einen zwei-gipfligen-Kurvenverlauf erahnen.

Es stellte sich heraus, daß sowohl Plakoglobin als auch Cypher in der Altersgruppe 70-79 signifikant höher exprimiert wird als in der Gruppe der 60- bis 69-Jährigen. Für Plakophilin konnte keine signifikante Veränderung gezeigt werden.

Bei allen Proteinen, insbesondere jedoch bei Cypher, zeigte sich eine große Streuung der Daten. Siehe hierzu die Abbildungen 11 bis 13.

Ergebnisse

a)

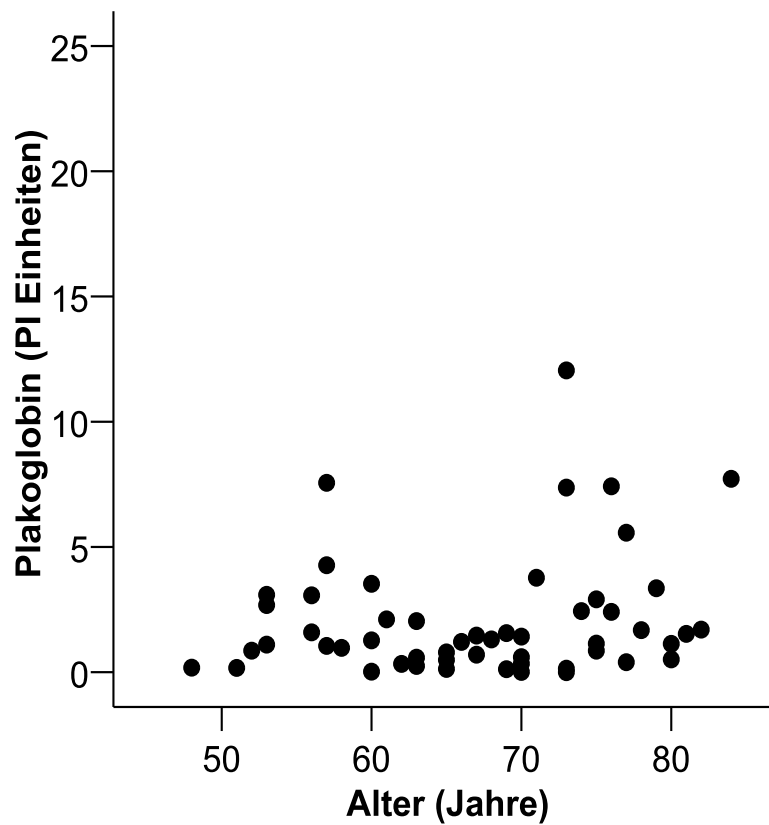


Abbildung 11a: Plakoglobin

Die Abbildung zeigt die Expression von Plakoglobin in Abhängigkeit vom Alter als Punktwolke dargestellt.

Ergebnisse

b)

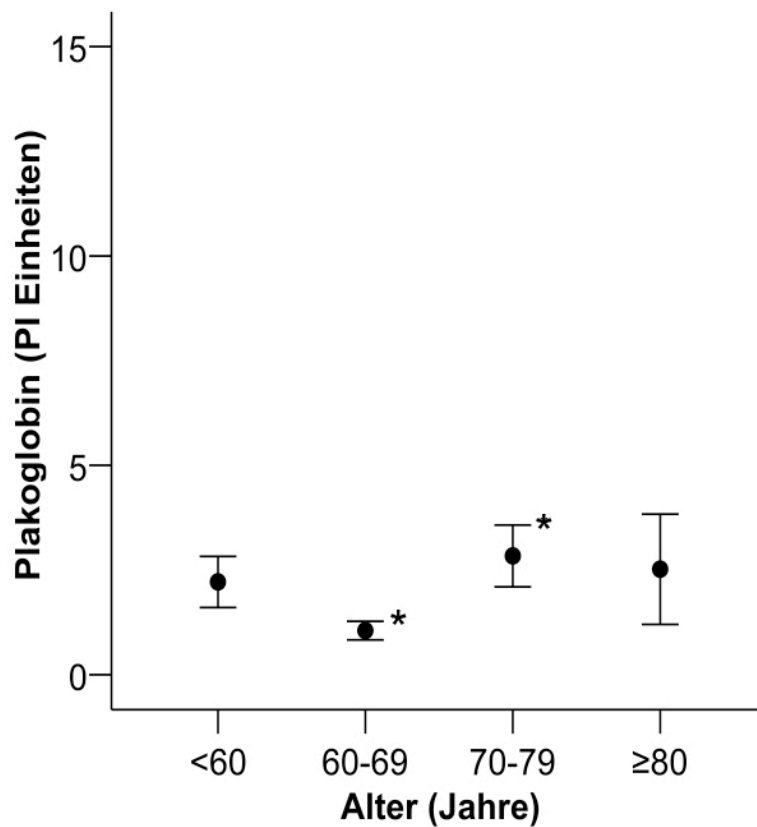


Abbildung 11b: Plakoglobin

Die Abbildung zeigt die Expression von Plakoglobin in Abhängigkeit vom Alter. Sie ist als Fehlerbalkendiagramm mit Mittelwert und Standardfehler dargestellt.

* $p < 0,05$ 60-69 Jahre vs 70-79 Jahre

Gruppengrößen: <60: n=12; 60-69: n=17; 70-79: n=19; ≥80: n=5

Ergebnisse

a)

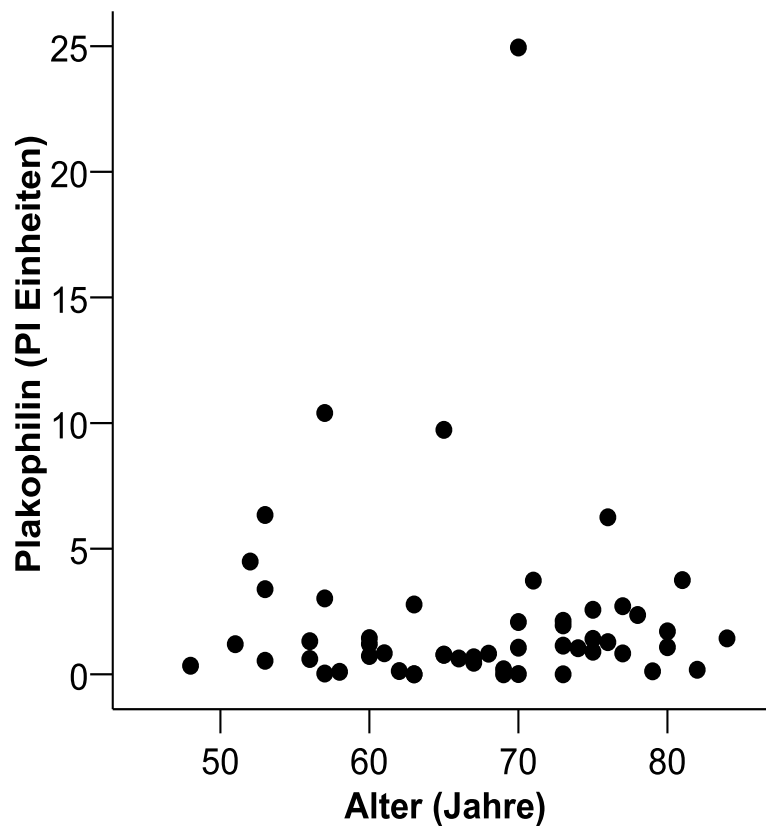


Abbildung 12a: Plakophilin

Die Abbildung zeigt die Expression von Plakophilin in Abhängigkeit vom Alter als Punktwolke dargestellt.

Ergebnisse

b)

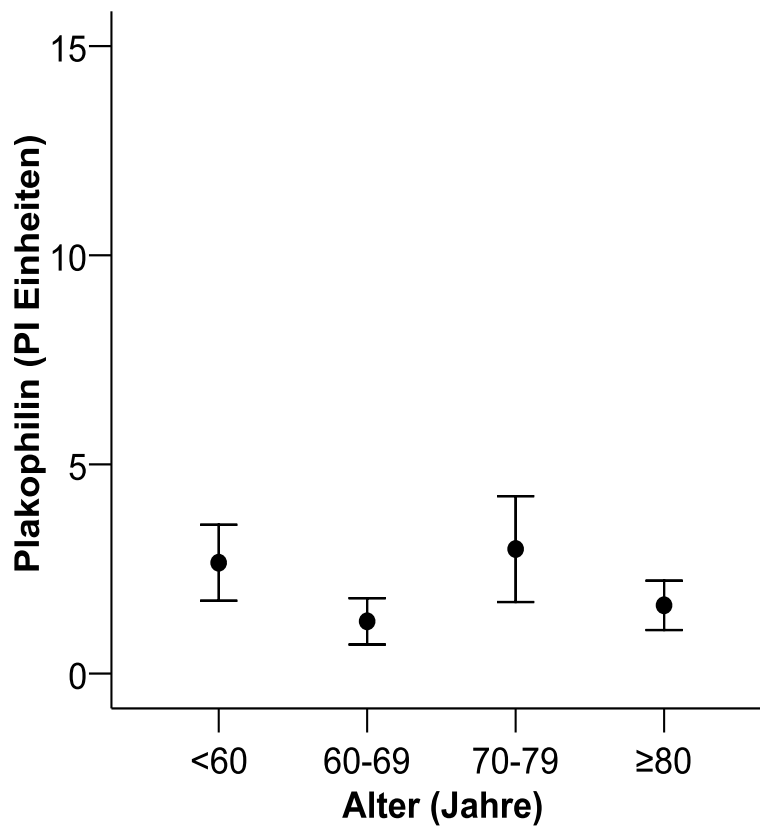


Abbildung 12b: Plakophilin

Die Abbildung zeigt die Expression von Plakophilin in Abhängigkeit vom Alter. Sie ist als Fehlerbalkendiagramm mit Mittelwert und Standardfehler dargestellt.

Gruppengrößen: <60: n=12; 60-69: n=17; 70-79: n=19; ≥80: n=5

Ergebnisse

a)

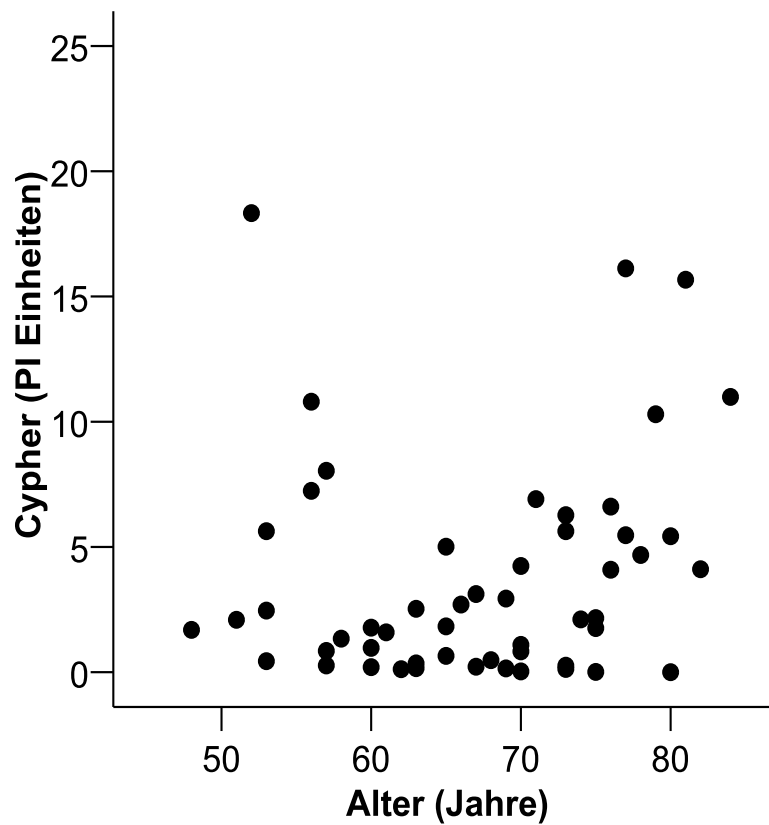


Abbildung 13a: Cypher

Die Abbildung zeigt die Expression von Cypher in Abhängigkeit vom Alter als Punktwolke dargestellt.

Ergebnisse

b)

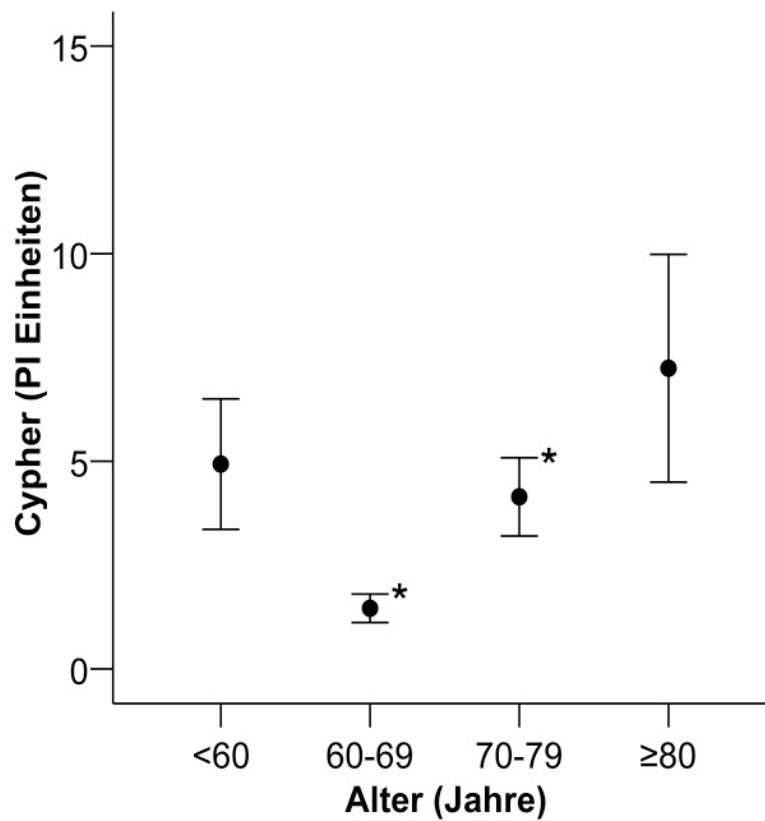


Abbildung 13b: Cypher

Die Abbildung zeigt die Expression von Cypher in Abhängigkeit vom Alter. Sie ist als Fehlerbalkendiagramm mit Mittelwert und Standardfehler dargestellt.

* $p < 0,05$ 60-69 Jahre vs 70-79 Jahre

Gruppengrößen: <60: $n=12$; 60-69: $n=17$; 70-79: $n=19$; ≥80: $n=5$

Ergebnisse

4.5 Abhängigkeit von der EF

Die Werte der EF (Ejektionsfraktion) wurden den Patientenakten entnommen. Hierbei wurde der zum Operationszeitpunkt jeweils aktuellste im Linksherzkatheter gemessene Wert berücksichtigt. Anzumerken ist, daß Patienten mit hoher EF bevorzugt in die Studie eingeschlossen wurden.

Eine lineare Korrelation konnte für keines der drei Proteine nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich für Cypher eine signifikant höhere Expression bei Patienten mit einer EF von 56-62% im Gegensatz zu Patienten mit einer EF ab 72% (Abb. 14).

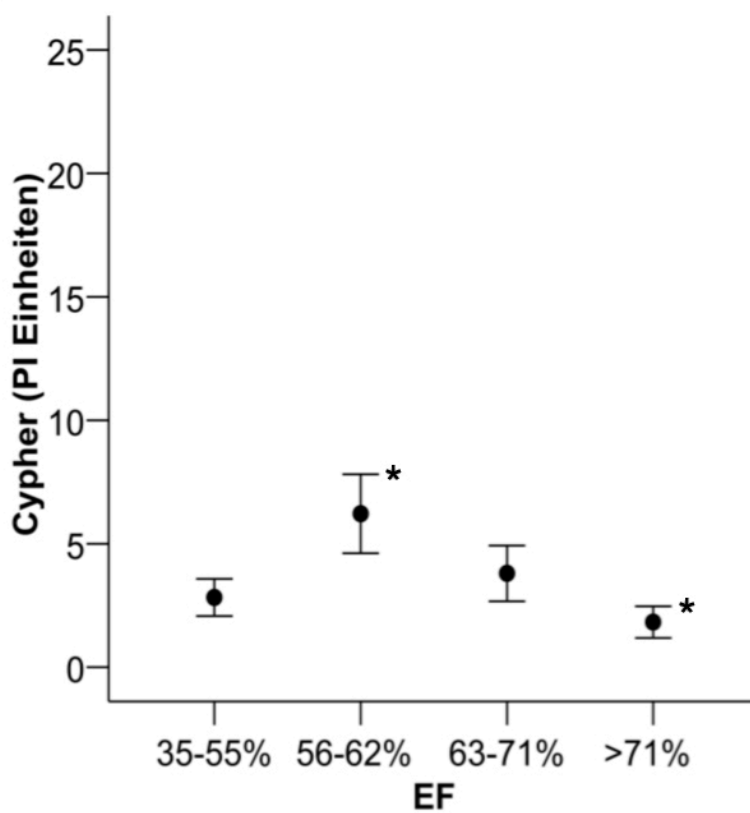


Abbildung 14:

Dargestellt ist ein Fehlerbalkendiagramm mit Mittelwert und Standardfehler.

* $p < 0,05$ 56-62% vs >71%

Gruppengrößen: 35-55%: n=13; 56-62%: n=14; 63-71%: n=14; >71%: n=12

4.6 Korrelation der Proteine untereinander

Es wurde eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von Cypher und der Expression von Plakoglobin nachgewiesen ($p < 0,05$). Der Korrelationskoeffizient nach Pearson liegt bei 0,434. So geht eine hohe Konzentration von Cypher mit einer hohen Konzentration von Plakoglobin einher (Abb. 15). Ein signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden desmosomalen Proteinen Plakoglobin und Plakophilin oder Plakophilin und Cypher besteht aber nicht.

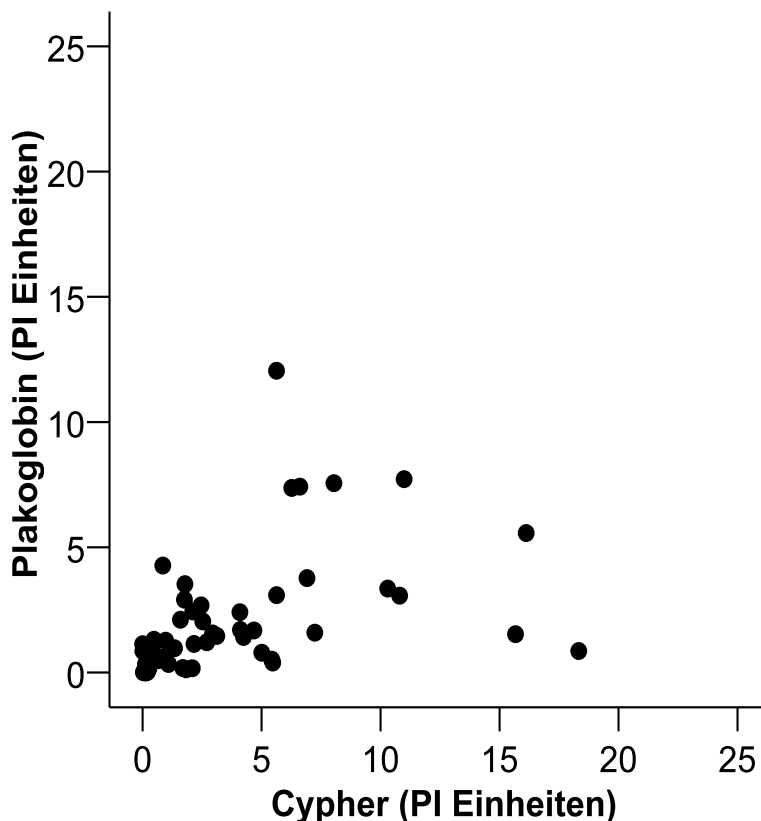


Abbildung 15:

Dargestellt ist die positive Korrelation zwischen den Proteinen Plakoglobin und Cypher als Punktwolke. $P < 0,05$; Korrelationskoeffizient 0,434

4.7 Lineares Regressions Modell

Parameter, die eventuell die Expression beeinflussen können, wurden abschließend in einem linearen Regressions Modell zusammengefasst (Tab. 3). Hierbei wurde jeweils die Protein-Expression mit den anderen Parametern korreliert. Wie bereits oben erwähnt konnte kein Zusammenhang zwischen einem der untersuchten Proteine und

Ergebnisse

dem Alter oder der Ejektionsfraktion festgestellt werden. Auch für die Canadian Cardiovascular Society Klassifikation der Angina Pectoris (CCS) konnte kein Zusammenhang gefunden werden. Allerdings gibt es bei Cypher einen leichten Trend hin zu einer positiven Korrelation mit der CCS ($p < 0,052$).

Auffällig sind jedoch ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Plakoglobinexpression und der Einnahme von Acetylsalicylsäure ($p < 0,05$; Korrelationskoeffizient $-0,323$) und ACE-Inhibitoren oder AT_1 -Rezeptorantagonisten ($p < 0,05$; Korrelationskoeffizient $0,256$).

Außerdem die bereits oben erwähnte Korrelation zwischen der Plakoglobin- und der Cypher-Expression ($p < 0,05$).

Tabelle 3: Lineares Regressions Modell

Angegeben sind p-Werte, signifikante Werte sind fett gedruckt. Als signifikant gilt ein p-Wert $< 0,05$.

LHK EF= Ejektionsfraktion im Linksherzkatheter; CCS= Canadian Cardiovascular Society Klassifikation der Angina Pectoris; ASS= Therapie mit Acetylsalicylsäure; ACE od. AT_1 = Therapie mit ACE-Inhibitor oder AT_1 -Rezeptorantagonist

	Plakophilin	Plakoglobin	Cypher
Alter (Jahre)	0,745	0,388	0,585
LHK EF	0,861	0,603	0,568
Statin	0,795	0,660	0,153
CCS	0,340	0,327	0,052
ASS	0,752	0,015	0,877
ACE oder AT_1	0,867	0,048	0,334
Plakophilin-Expression	-	0,798	0,239
Plakoglobin-Expression	0,798	-	0,018
Cypher-Expression	0,239	0,018	-

4.8 Vergleich von Vorhof und Ventrikel

Es wurden Western Blots durchgeführt, bei denen abwechselnd 55 µg Atrium- und Ventrikelproben aufgetragen wurden. Die Ventrikelproben stammen aus dem Universitätsklinikum Münster und wurden bei Herztransplantationen von Patienten gewonnen, die unter dilatativer Kardiomyopathie litten.

Jedes der Proteine ließ sich auch im Ventrikel nachweisen. In der Bandenstärke oder Anordnung zeigte sich dabei kein Unterschied zwischen Herzvorhof und -kammer (siehe Abb. 16). Es ist aber auffällig, daß bei den vorhandenen Ventrikelproben (n=6) alle untersuchten Proteine stärker exprimiert waren als im Vorhof (siehe Abb. 17-19). Ob dies Zufall oder Regel ist bleibt wegen der geringen Anzahl von Ventrikelproben zum jetzigen Zeitpunkt offen.

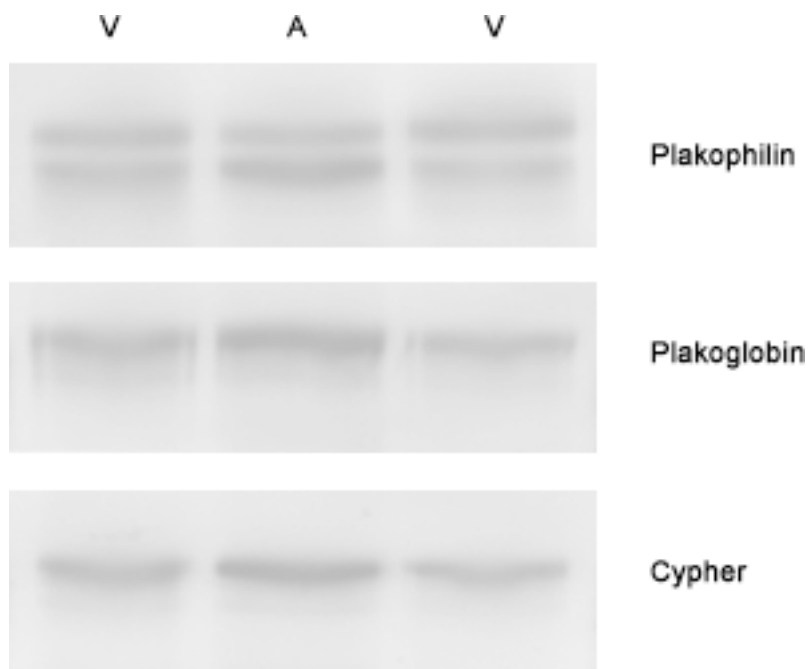


Abbildung 16:

Dargestellt sind ausgewählte Western Blots zum Vergleich von Vorhof und Ventrikel. Die Banden liegen für Plakophilin bei ca. 100 kDa, für Plakoglobin bei ca. 85 kDa und für Cypher bei ca. 80 kDa.

Ergebnisse

V=Ventrikel, A=Atrium

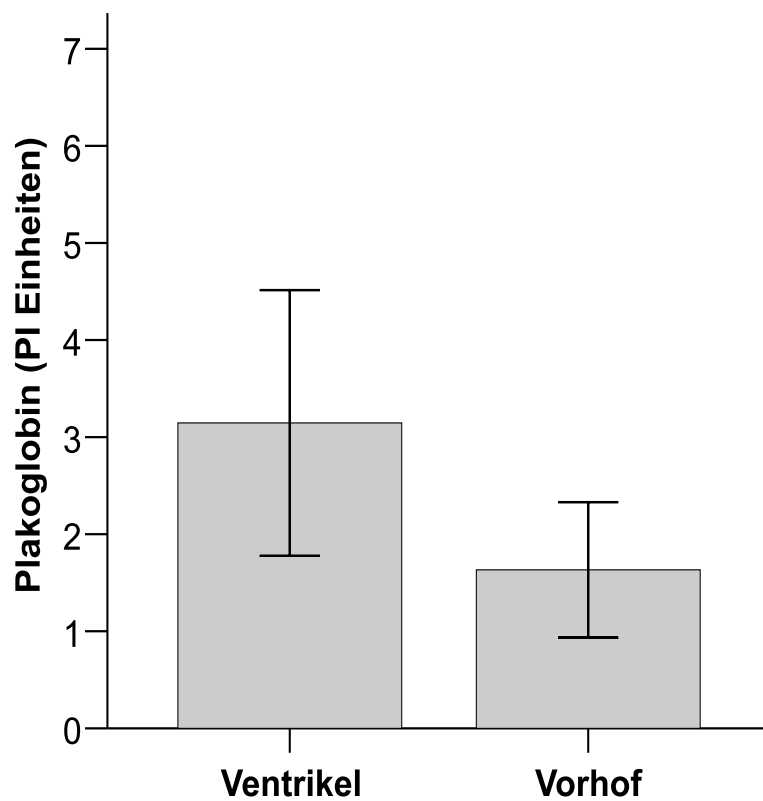


Abbildung 17:

Die Abbildung zeigt die Plakoglobinexpression im Vorhof (n=53) und im Ventrikel (n=6) von menschlichem Myokardgewebe. Dargestellt als Mittelwert +/- SEM.

Ergebnisse

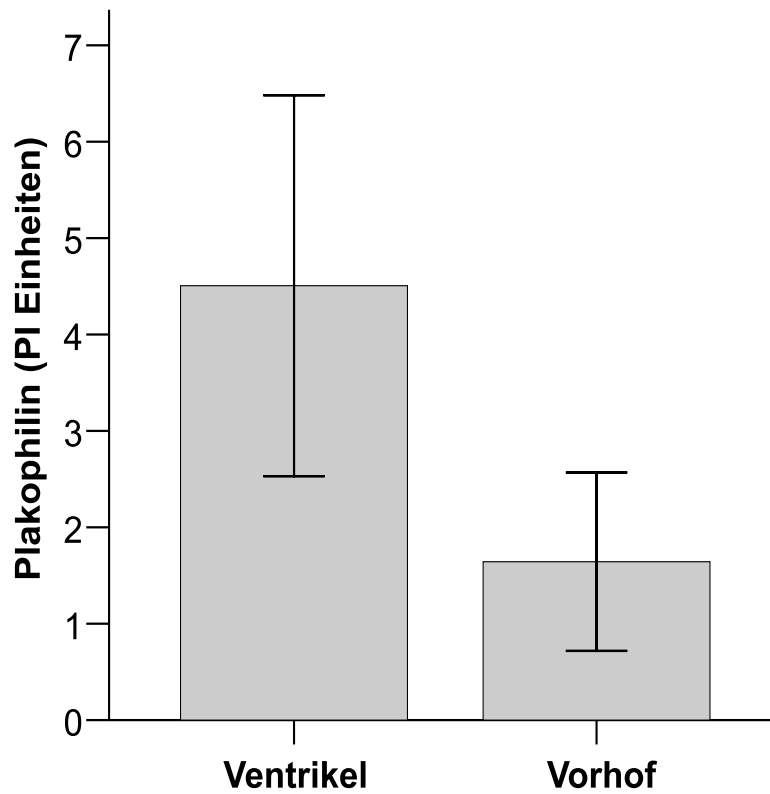


Abbildung 18:

Die Abbildung zeigt die Plakophilinexpression im Vorhof (n=53) und im Ventrikel (n=6) von menschlichem Myokardgewebe. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

Ergebnisse

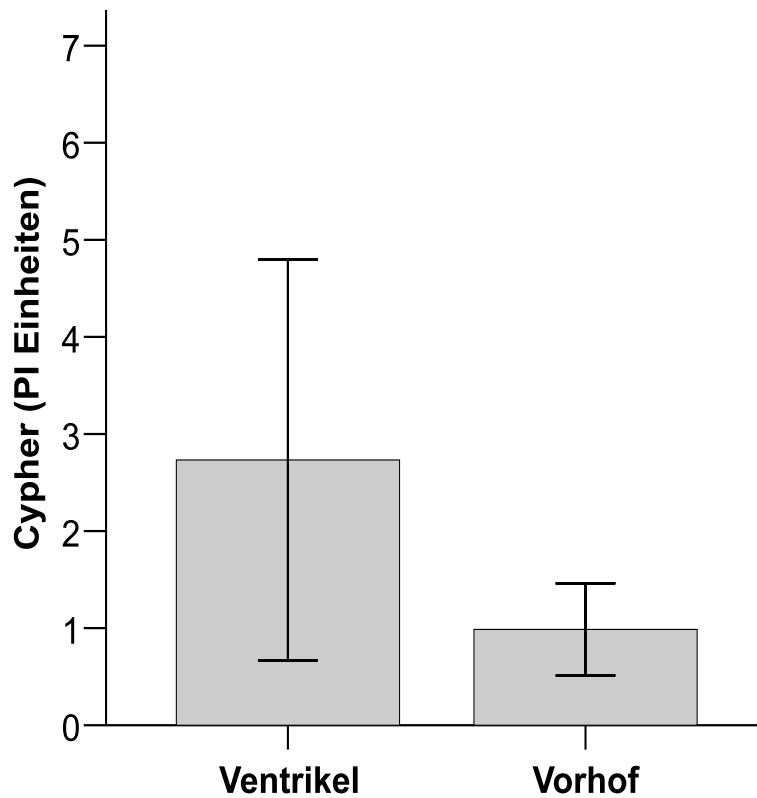


Abbildung 19:

Die Abbildung zeigt die Cypherexpression im Vorhof (n=53) und im Ventrikel (n=6) von menschlichem Myokardgewebe. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

5 Diskussion

Der Nachweis der drei Proteine in den untersuchten Patientenproben gelang durch das Western Blot Verfahren. Cypher und Plakoglobin ließen sich außerdem immunhistologisch nachweisen und im Zytosol (Cypher) bzw. den Glanzstreifen (Plakoglobin) lokalisieren. Dies entspricht Aussagen der aktuellen Literatur (Reynolds et al., 1994; Arimura et al., 2009). Es ist jedoch anzumerken, daß sich Cypher zwar eindeutig innerhalb der Zelle lokalisieren ließ, es ließ sich aber nicht wie in der Literatur beschrieben den Z-Scheiben zuordnen. Dies mag an einem nicht optimalen Anschnitt des Muskelgewebes liegen. Es kann auch sein, daß der verwendete Antikörper nicht sehr gut für eine genaue Zuordnung geeignet ist.

Die meisten der aktuellen Studien zu altersbedingten Veränderungen am menschlichen Herzen beruhen auf „gene-array“-Analysen von Ventrikel-Myokard. Damit wird die mRNA-Expression im Gewebe bestimmt. Die mRNA ist das Endprodukt der Transkription und wird während der Translation in die entsprechende Aminosäuresequenz bzw. das Protein übersetzt. Die mRNA ist damit ein Zwischenprodukt der Proteinbiosynthese. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, daß die exprimierte mRNA-Menge nicht mit der Proteinmenge übereinstimmen muss. Für die Funktion im Organismus sind jedoch die Proteine von Bedeutung.

Im Gegensatz dazu wurde in dieser Studie die Menge des Proteins und somit das Endprodukt der Proteinbiosynthese gemessen. Allerdings wurden keine Ventrikel- sondern Vorhof-Gewebeproben verwendet. Inwieweit dies die Ergebnisse beeinflusst, konnte nicht ausführlich untersucht werden. Ergebnisse der Western Blots aus 6 menschlichen Ventrikelproben zeigen beim Vergleich der Mittelwerte Unterschiede zwischen Ventrikel- und Vorhof-Expression von Plakophilin, Plakoglobin und Cypher (siehe dazu Abb. 17-19). Dies deckt sich mit Ergebnissen zur mRNA-Expression von Cardin, der bei Hunden 6284 Gene fand, deren Expression sich im Vorhof nach Induktion einer Herzinsuffizienz veränderte. Im Vergleich dazu waren es im linken Ventrikel nur 130 Gene (Cardin et al., 2008).

Bei der nur kleinen Probenzahl sollte jedoch in nachfolgenden Versuchen mit höherer Fallzahl untersucht werden, ob sich der Trend einer unterschiedlichen Proteinexpression in den verschiedenen Herzhöhlen verifizieren lässt.

Außer den im Folgenden diskutierten Ergebnissen ließ sich für Cypher in der Patientengruppe mit einer EF zwischen 56-62% eine signifikant höhere Expression als in der Patientengruppe mit einer EF von über 71 % ($p < 0,05$) feststellen. Da beide EF-Gruppen (wenn auch grenzwertig) im Normbereich ($EF > 60\%$) liegen und sich bei den

Diskussion

anderen Patientengruppen keine signifikanten Ergebnisse zeigten, ist dieses Ergebnis schwer zu interpretieren. In der Literatur finden sich keine Hinweise auf einen Einfluss der EF auf Cypher.

Anzumerken ist die große Streuung der Daten, die z. B. aus Tierversuchen nicht in diesem Ausmaß bekannt ist. Ob sie Ausdruck der diversen medikamentösen Beeinflussungen ist oder darauf hindeutet, daß es noch viele bisher unbekannt Variable gibt, die den Alterungsprozess des Herzens beeinflussen bleibt noch unklar.

5. 1 Altersabhängigkeit

Alterungsprozesse am Herzen sind nicht zuletzt wegen der demographischen Entwicklung in der westlichen Welt Gegenstand vieler wissenschaftlicher Untersuchungen. Die Frage nach altersabhängiger Genexpression in Tiermodellen (Übersicht in Park und Prolla, 2005) oder in menschlichem Gewebe (Boheler et al., 2003, Übersicht in Volkova et al., 2005) ist somit Gegenstand vieler Studien. Insgesamt ist das Altersherz gekennzeichnet durch eine Hypertrophie des linken Ventrikels, eine prozentuale Abnahme der Kardiomyozyten im Vergleich zur Gesamtzellzahl, eine Verdickung der Herzklappen, einen Verlust der Schrittmacherzellen im Sinusknoten sowie eine Zunahme der extrazellulären Matrix-Proteine (Hawcroft et al., 2002). Es ist in verschiedenen Studien gelungen, diverse Gene aufzuspüren, deren Expression einer Altersabhängigkeit unterliegt. Bei genaueren Untersuchungen zeigte sich jedoch, daß die Expression oft von mehreren verschiedenen Faktoren, wie z. B. Alter und Geschlecht oder Herzinsuffizienz und Alter beeinflusst wird (Boheler et al., 2003; Fermin et al., 2008). Bei Boheler et al. ließ sich selbst mit den Faktoren Herzinsuffizienz, Alter und Geschlecht nur 71% der Streuung der Ergebnisse erklären (Boheler et al., 2003). Welche nicht berücksichtigten oder bisher unbekannt Faktoren hier zusätzlich einen Einfluss haben, muss zum aktuellen Zeitpunkt offen bleiben.

Trotzdem ist es gelungen, am Herzen auch Gene zu identifizieren, deren Expression offenbar allein vom Alter abhängig ist (Boheler et al., 2003; Fermin et al., 2008). Offenbar gibt es aber auch bei diesen Genen geschlechtsspezifische Unterschiede, so daß viele Gene im Alter bei Frauen vermehrt exprimiert werden, bei Männern jedoch nicht (Fermin et al., 2008). Dies sind v. a. Gene des " DNA damage response pathways" (Fermin et al., 2008).

Warum es diese geschlechtsspezifischen Unterschiede gibt, ist bisher unklar. Sicher ist aber, daß auch verschiedene Herzerkrankungen eine unterschiedliche Prävalenz für

Diskussion

Männer und Frauen aufweisen. So liegt die Lebenszeitprävalenz der koronaren Herzerkrankung für Männer bei 30%, für Frauen nur bei 15%. Auch die Prävalenz der Herzinsuffizienz weist ein Geschlechterverhältnis von ungefähr 1,5 : 1 zu Ungunsten der Männer auf (Übersicht McMurray and Stewart, 2000; Roger et al., 2004).

In der dargestellten Untersuchung ging es primär darum, Veränderungen des alternden Herzens zu erfassen und eventuell mögliche Erklärungsansätze für das gehäufte Auftreten von Herzinsuffizienz und Rhythmusstörungen im Alter anhand von veränderter Proteinexpression zu erhalten.

Eine Altersabhängigkeit im Sinne eines linearen Zusammenhanges ließ sich dabei für keines der untersuchten Proteine nachweisen. Plakoglobin und Cypher waren bei den 70- bis 79-jährigen Patienten aber signifikant höher exprimiert als bei den 60- bis 69-jährigen. Im Vergleich mit der Gruppe der mindestens 80-jährigen Patienten ergeben sich keine signifikanten Ergebnisse mehr. Dies ist jedoch auch die Gruppe mit den wenigsten Patienten und bei Plakoglobin und Cypher die Gruppe mit der größten Streuung der Ergebnisse. Insgesamt lassen die Daten für diese beiden Proteine eher einen leichten Anstieg der Expression mit dem Alter vermuten als einen Abfall. Dies bleibt in größeren Studien mit einer möglichst größeren Altersspanne weiter zu untersuchen.

Wenn man davon ausgeht, daß höheres Alter aufgrund einer höheren Krankheitsrate die Einnahme von Medikamenten wahrscheinlicher macht, könnte diese Tendenz zu höheren Plakoglobinwerten im Alter mit der positiven Korrelation zwischen der Einnahme von ACE-Inhibitoren sowie der Einnahme von ASS und der Proteinexpression begründet werden. Dies könnte indirekt über die positive Korrelation von Plakoglobin und Cypher auch dessen Expression beeinflussen.

Die hier gezeigte Tendenz zu einer höheren Proteinexpression im Alter steht den vorherigen Erwartungen entgegen: So wäre eine Verringerung der den Zellverband stabilisierenden und die Aufrechterhaltung der Ordnung während der Kontraktion des Herzmuskels fördernden Proteine als eine Ursachen von Herzrhythmusstörungen und Herzschwäche leichter verständlich. Eine Erhöhung dieser für die geordnete Funktion des Herzens wichtigen Proteine ist eher überraschend.

In diesem Zusammenhang stellt sich dann die Frage nach Ursache und Wirkung: Handelt es sich bei einer veränderten Expression im Alter um eine Reaktion auf Faktoren wie erhöhte Volumen-/Druckbelastung, Medikamenteneinnahme und bisher nicht bekannte Einflussfaktoren, die im Alter gehäuft auftreten? Oder handelt es sich um davon unabhängige Veränderungen, die spontan oder z. B. wegen gestörter

Diskussion

Reparaturmechanismen auftreten und dann das Auftreten von Herzerkrankungen und somit auch die Einnahme verschiedener Medikamente wahrscheinlicher machen? Oder sehen wir den Versuch des Organismus, eine geordnete Funktion durch eine erhöhte Expression von stabilisierenden Proteinen auch gegen im Alter vermehrt auftretende Störfaktoren aufrecht zu erhalten?

Um der Beantwortung dieser Fragen einen Schritt näher zu kommen sind auch Untersuchungen an kranken (bzw. kränkeren) Herzen notwendig. An dieser Stelle muss erneut auf den Ursprung der verwendeten Proben hingewiesen werden: Sie stammen alle von Patienten bei denen aufgrund der Schwere der Erkrankung eine konservative Therapie nicht mehr möglich und somit eine Herzoperation indiziert war.

Des Weiteren wäre auch die Untersuchung von Kindern und jüngeren Erwachsenen wünschenswert. Sie würde möglicherweise größere Unterschiede zwischen den verschiedenen Lebensabschnitten aufdecken. Solche Proben stehen jedoch aus verständlichen Gründen nur in sehr begrenztem Umfang zur Verfügung.

5. 2 Veränderte Expression bei Erkrankungen

Diverse Studien zeigen, daß es nicht nur während des physiologischen Alterungsprozesses am Herzen, sondern auch bei chronischer Herzinsuffizienz zu einer Veränderung der Gen- und Proteinexpression kommt (Bowling et al., 1999; Wang et al., 2010; Li et al., 2011). So kommt es z. B. zu einem Anstieg des protektiven Hitzeschockproteins 60 (Wang et al., 2010). Hitzeschockproteine sind für die korrekte Faltung und Entfaltung von Proteinen sowie die Stabilisierung der Protein-Tertiär-Struktur verantwortlich. Sie wirken somit einer Denaturierung entgegen. Auch eine erhöhte Expression von bestimmten Isoformen der Proteinkinase C die für die Signaltransduktion eine entscheidende Rolle spielt, konnte am menschlichen Ventrikel nachgewiesen werden (Bowling et al., 1999). Hier scheint jedoch ein für den Organismus essentielles und eigentlich nicht pathogenes Enzym die Entwicklung einer Herzinsuffizienz zu fördern.

Beispiele dafür, daß die Bestimmung einer veränderten Genexpression schon heute in der alltäglichen Medizin zu diagnostischen Zwecken herangezogen wird, sind das atrial natriuretic peptide (ANP) und das brain natriuretic peptide (BNP). In beiden Fällen triggert die erhöhte Volumen- und Druckbelastung des insuffizienten Herzens die Ausschüttung der Peptide ins Blut. Sie können somit als Diagnosekriterium bei Herzinsuffizienz eingesetzt werden (Falcao et al., 2004).

Diskussion

Insgesamt wurden in verschiedenen Studien schon über 1000 verschiedene Gene gefunden, die bei terminaler Herzinsuffizienz einer veränderten Expression unterliegen. Weit überwiegend wird die Expression reduziert (Tan et al., 2002; Gao et al., 2006). Auch für Plakoglobin wurde in Gao et al. eine solche Veränderung im linken Ventrikel bei terminaler Herzinsuffizienz gezeigt.

Eine Korrelation mit der NYHA-Klasse unserer Patienten wurde bei uns nicht berechnet. Wir schlossen jedoch die CCS Klasse als Variable in das lineare Regressionsmodell ein. Die CCS ist eine klinische Einteilung der Angina pectoris, also eines Symptoms der koronaren Herzkrankheit. Ihre Einteilung beginnt mit 0 (stumme Ischämie, keine Beschwerden) und geht bis zum Stadium IV (Beschwerden in Ruhe). Die Stadien der CCS-Einteilung lagen bei den Patienten der hier untersuchten Proben zwischen I und IV (s. Tabelle 1). Es konnte jedoch keine signifikante Veränderung für Plakoglobin oder eines der anderen Proteine gefunden werden. Lediglich bei Cypher zeigte sich mit einem p-Wert von 0,052 ein Trend zu einem Zusammenhang. Daß dieses Ergebnis dem von Gao et al. zu widersprechen scheint, mag auch daran liegen, daß in der vorliegenden Patientenauswahl die mittlere NYHA-Klasse bei 2 lag. Dies bedeutet Beschwerden wie Dyspnoe und Angina pectoris bei stärkerer körperlicher Belastung und ist von den Symptomen einer terminalen Herzinsuffizienz weit entfernt. Zum anderen kann es an einer unterschiedlichen Expression in Vorhof und Ventrikel liegen. Außerdem ist interessant, daß eine andere Studie bei Ratten zu dem Ergebnis kommt, daß es unter mechanischem Stress zu einer vermehrten Expression unter anderem von Plakoglobin kommt (Yamada et al., 2005).

In diversen Studien sind Zusammenhänge zwischen Mutationen in Plakophilin bzw. Plakoglobin und ARVC nachgewiesen. Es scheint sogar so zu sein, daß in 46% aller Patienten mit einer ARVC eine Mutation in einem der desmosomalen Proteine Plakophilin 2, Plakoglobin, Desmoplakin, Desmoglein-2 oder Desmocollin-2 vorliegt (Jacob et al., 2012). Hierbei haben Plakophilin-Mutationen den größten Anteil. Dieser ist jedoch in verschiedenen Populationen Schwankungen unterworfen. So ist in Griechenland, Zypern und Dänemark der Anteil der Plakoglobin-Mutationen deutlich höher als in anderen Populationen (Jacob et al., 2012). Dies sind die Regionen in denen die sogenannte Naxos-Krankheit beschrieben wird: eine Form der ARVC, die mit Hautveränderungen wie Keratom an den Handinnenflächen und Fußsohlen, sowie wolligem Haar einhergeht. Die ARVC selbst manifestiert sich mit ventrikulären Extrasystolen und schlimmstenfalls ventrikulären Tachykardien, Kammerflimmern, Herzinsuffizienz oder dem plötzlichen Herztod. Histopathologisch kommt es zu einer Fibrolipomatose mit dem Untergang von Herzmuskelgewebe.

Diskussion

In vielen Studien zeigte sich bei einem vollständigen Knockout von Plakoglobin oder Plakophilin ein letaler Ausgang (Ruiz et al., 1996; Grossmann et al., 2004). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, daß ein homozygoter Knockout von Plakoglobin nur in Kardiomyozyten nicht letal ist, da er über eine vermehrte Expression des Plakoglobin-Homologs β -Catenin kompensiert wird (Swope et al., 2012). Außerdem wird die Naxos-Krankheit autosomal rezessiv vererbt, ist aber auch für Erkrankte (Homozygote) nicht zwangsläufig letal.

Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob nicht Mutationen der betroffenen Gene oder ihrer Bindungspartner oder eine niedrigere Expression oder Expressivität der Genprodukte auch einzelne Symptome der oben genannten Syndrome hervorrufen können. Ob Mutation dieser Gene im Alter gehäuft auftreten bzw. Mutationen erst im Alter manifest werden und somit ein Zusammenhang mit im Alter gehäuft auftretenden Rhythmusstörungen bestehen kann, ist zum aktuellen Zeitpunkt noch Spekulation.

Für Cypher/ZASP sind Zusammenhänge zwischen dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und Mutationen nachgewiesen. Diese ist gekennzeichnet durch eine Herzinsuffizienz und v. a. ventrikuläre Rhythmusstörungen. Insgesamt sind schon über 200 Gene identifiziert worden deren Expression bei DCM-Patienten im Vergleich zu Gesunden verändert sind (Hwang et al., 2002).

Genanalysen zeigen, daß bei ca. 6% aller Patienten mit einer DCM eine Mutation im ZASP-Gen vorliegt (Vatta et al., 2003).

Unsere Ergebnisse deuten einen Zusammenhang zwischen der CCS-Klassifikation und der ZASP-Konzentration an. Dies könnte auf einen Zusammenhang zwischen der Entwicklung einer Herzinsuffizienz und der ZASP-Expression hindeuten. Gestützt wird diese Theorie durch unser Ergebnis, daß eine niedrigere EF eine signifikant höhere ZASP-Expression mit sich bringt. Trotzdem sind auf diesem Gebiet noch weitere Studien nötig um eine sichere Aussage treffen zu können.

Ein möglicher Kritikpunkt an der vorliegenden Studie ist die bereits mehrfach erwähnte Tatsache, daß sie mit Myokard von Patienten durchgeführt wurde, die an einer Herzerkrankung litten, die eine Operation nötig machte. Leider steht aus verständlichen Gründen Probenmaterial aus gesundem menschlichen Myokardgewebe nur in sehr begrenzten Umfang zur Verfügung. Hervorzuheben ist, daß es sich bei der OP-indizierenden Grunderkrankung weit überwiegend um eine koronare Herzerkrankung und somit um eine Erkrankung der Herzkranzgefäße, nicht aber des Herzmuskelgewebes handelt. Zu einem geringeren Teil waren Erkrankungen (Insuffizienz oder Stenose) der Herzklappen Grund für die Operation. Auch in diesem

Diskussion

Fall liegt keine Erkrankung der Myozyten vor. Es kann also davon ausgegangen werden, daß es sich bei dem untersuchten Gewebe, also Muskelzellen des rechten Herzvorhofes, um gesundes Gewebe handelt. Dieses ist nur indirekt über Veränderungen der Druck- bzw. Volumenbelastung des gesamten Herzens von der Grunderkrankung betroffen. Um größere Einflüsse der Vorerkrankung auf die Ergebnisse einzudämmen, wurden aber Patienten mit einer EF unter 30% oder einer terminalen Herzinsuffizienz (NYHA Stadium über III) ausgeschlossen, da verschiedene Genveränderungen an insuffizienten Herzen bekannt sind. Eine durchschnittliche EF von 62% und damit im Normbereich spricht gegen die Anwesenheit von schwerem Herzversagen im Patientenkollektiv.

5.3 Abhängigkeit von Medikamenten

Ungefähr 77% der Patienten dieser Studie haben das NYHA-Stadium II. Patienten, die ein höheres Stadium aufweisen, wurden v. a. dann eingeschlossen, wenn sie einer Altersgruppe angehören in der es wenig Patienten gibt (unter 70 Jahre bzw. über 80 Jahre). Ab NYHA-Stadium II gehören β -Adrenozeptoren-Antagonisten und ein ACE-Inhibitor bzw. AT_1 -Rezeptorantagonisten zur Standardtherapie der Herzinsuffizienz da sie prognoseverbessernd wirken (Hoppe et al., 2005). Ab NYHA-Stadium III gehören auch Aldosteronantagonisten und Digitalis zur Standardtherapie. Bei älteren Patienten mit Herzerkrankungen besteht oft eine koronare Herzkrankheit (KHK). Zur medikamentösen Behandlung der KHK zählt neben Acetylsalicylsäure bei entsprechenden Blutfettwerten ein Statin. Symptomatisch kann mit Nitraten behandelt werden. Schon diese zwei Diagnosen erklären den größten Teil und die hohe Anzahl der eingenommenen Medikamente der eingeschlossenen Studienteilnehmer.

Da von Schilddrüsenhormonen ein Einfluss auf die (kardiale) Proteinexpression sowie Hypertrophie bekannt ist (Übersicht bei Maillet et al., 2013), wurden Patienten, die (unter anderem) wegen einer Schilddrüsenerkrankung therapiert wurden aus dieser Studie ausgeschlossen. Auch ist bekannt, daß einige β -Adrenozeptoren-Antagonisten einen Einfluss auf die Plakoglobin-Expression haben können (Zhao et al., 2006). Sie können außerdem z. B. den Phosphorylierungsstatus kardialer Proteine oder den kardialen Calciumhaushalt beeinflussen (Zhang et al., 2012). Aus dem oben genannten Grund gibt es aber kaum Patienten, die sich einer Herzoperation unterziehen müssen und nicht mit einem β -Adrenozeptoren-Antagonisten behandelt werden. Um trotzdem eine Verzerrung der Ergebnisse gering zu halten, wurden nur mit einem β -Adrenozeptoren-Antagonisten behandelte Patienten in die Studie eingeschlossen.

Diskussion

Studien über einen Einfluss von Medikamenten auf die Plakophilin- und Cypher-Expression gibt es noch nicht. Auch in dieser Studie konnte kein solcher Zusammenhang nachgewiesen werden.

5.3.1 Plakoglobin und Medikamenteneinnahme

77% der eingeschlossenen Patienten wurden mit einem ACE-Inhibitor (37 Patienten) oder AT₁-Rezeptorantagonisten (4 Patienten) behandelt. Zwischen der Plakoglobin-Expression und dieser Einnahme besteht ein signifikanter positiver Zusammenhang ($p < 0,05$; Korrelationskoeffizient 0,256). Über andere Studien, die einen Zusammenhang zwischen ACE-Inhibitoren mit Plakoglobin untersucht oder beschrieben haben, ist aktuell nichts bekannt. Ein ACE-Inhibitor gehört mindestens bei niedriger EF oder Anzeichen für eine Herzinsuffizienz schon in der Frühphase nach einem Herzinfarkt zur Standardtherapie (Steg et al., 2012). Dies liegt unter anderem an der bei Yu et al. beschriebenen Hemmung der kardialen Fibroblasten (Yu et al., 2012), die einen Umbau des Muskelgewebes verhindert.

Ein signifikanter negativer Zusammenhang ($p < 0,05$; Korrelationskoeffizient $-0,323$) wurde zwischen der Einnahme von Acetylsalicylsäure (38 Patienten) und der Plakoglobin-Expression gefunden. Dies ist insofern interessant, als es Hinweise auf eine Hemmung von β -Catenin durch diverse NSAID (non steroidal anti inflammatory drugs, zu denen auch ASS gehört) gibt (Lu et al., 2005). Die Studien beziehen sich alle auf das Plakoglobin-Level in kolorektalen Tumoren. Hier ist nach einer Behandlung mit verschiedenen NSAID ein signifikanter Rückgang von β -Catenin im Zellkern, sowie von indirekt durch β -Catenin aktivierten Proteinen (z. B. Cyclin D1) beschrieben worden (Hawcroft et al., 2002; Dihlmann et al., 2003; Boon et al., 2004; Gardner et al., 2004; Lu et al., 2005;). Dieser Effekt wird wahrscheinlich durch Phosphorylierung von β -Catenin bewirkt (Dihlmann et al., 2003). β -Catenin gehört auch zur Armadillo-Familie und ist homolog zu Plakoglobin (s. o.). Trotzdem konnten die oben beschriebenen Effekte für Plakoglobin bisher nicht nachgewiesen werden (Hawcroft et al., 2002).

Daß auch andere Medikamente einen Einfluss auf das Plakoglobinlevel im Myokard haben können, zeigen verschiedene Studien. Neben dem oben erwähnten Einfluss von β -Blockern, kann auch eine Aprotinin-Gabe Veränderungen bewirken. Sie erhöht zwar nicht die totale Plakoglobinkonzentration im Herzgewebe, wohl aber das Level der mit Cadherinen assoziierten Form (Khan et al., 2005).

Die Ergebnisse zeigen, daß Medikamente einen Einfluss auf die Proteinexpression am menschliche Myokard haben können (hier ASS und ACE-Hemmer), aus

Diskussion

therapeutischen und ethischen Gründen ist es aber nicht vertretbar, die Medikation der Patienten zu Forschungszwecken abzusetzen oder zu verändern. Dies macht die Durchführung von Studien schwierig.

Trotzdem ist hervorzuheben, daß es bisher wenig Daten über eine Altersabhängigkeit der hier untersuchten Proteine in *menschlichem* Myokard gibt und diese Studie somit zum besseren Verständnis der Alterungsprozesse am menschlichen Herzen beitragen kann. Ob die beschriebenen Proteine in Zukunft eventuell als Angriffspunkte für Therapien oder als Prognosemarker dienen können, muss in weiteren Studien untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Für die Funktion des Herzmuskels sind die Gliederung des Muskels in Myofibrillen und Sarkomere sowie deren Stabilität während den Kontraktionen von großer Bedeutung. Auch die Verbindung von Zellen mit ihren Nachbarzellen zur Kommunikation, Stabilisierung des Gewebes und Anheftung des Zytoskeletts an die Zellmembran ist essentiell. Für viele Strukturproteine, die im kontraktilem Apparat der Zelle oder den Desmosomen lokalisiert sind, sind Assoziationen mit Erkrankungen wie Arrhythmien oder Herzinsuffizienz nachgewiesen.

Zu diesen Proteinen gehören die desmosomalen Proteine Plakoglobin und Plakophilin, deren Mutation u. a. mit der Entwicklung von ARVC einhergehen kann. Auch für das Z-Scheiben-Protein ZASP/Cypher sind verschiedene Mutationen bekannt, die z.B. mit DCM assoziiert sind. Allen drei genannten Proteinen ist gemeinsam, daß ihr Fehlen in Maus-Knockout-Modellen letal verläuft.

In dieser Studie sollte untersucht werden, ob Plakoglobin, Plakophilin 2 und Cypher einer altersabhängigen Proteinexpression unterliegen. Dafür wurden bei chirurgisch gewonnenen Gewebeproben des rechten Vorhofs von männlichen Patienten (n=53) Immunhistologien und Western Blots durchgeführt. Alle Patienten wurden zum Zeitpunkt der Operation mit β -Blockern therapiert, hatten ein NYHA-Stadium \leq III und eine EF über 30%.

Ein signifikanter linearer Zusammenhang mit dem Alter ließ sich für keines der Proteine nachweisen. Trotzdem deuten die Ergebnisse auf einen leichten Anstieg der Proteine mit dem Alter hin. Bei Plakoglobin und ZASP/Cypher zeigte sich eine niedrigere Proteinexpressionen in der Altersgruppe 60-69 im Vergleich zur Altersgruppe 70-79 Jahre. Außerdem konnte ein positiver Zusammenhang zwischen den Proteinen ZASP/Cypher und Plakoglobin nachgewiesen werden. Daß Medikamente einen Einfluss auf Proteinexpressionen haben können, ist bekannt. Hier stellte sich heraus, daß sowohl die Einnahme von ASS als auch die Einnahme von ACE-Inhibitoren oder AT1-Antagonisten mit einer veränderten Proteinexpression von Plakoglobin einhergehen.

Anzumerken bleibt, daß die Streuungen der Ergebnisse groß sind. Ob dies an den unterschiedlichen Medikationen der Patienten liegt, oder Ausdruck anderer noch unbekannter Einflüsse ist, bleibt unklar. Um diese Frage zu klären und eindeutige Ergebnisse bezüglich der Altersabhängigkeit zu erzielen sind weitere Studien mit einer größeren Patientenzahl und Kontrollversuche an gesunden sowie transplantationspflichtigen Herzen wünschenswert.

7 Literaturverzeichnis

- **Arimura T, Inagaki N, Hayashi T, Shichi D, Sato A, Hinohara K, Vatta M, Towbin J, Chikamori T, Yamashina A, Kimura A:** Impaired binding of ZASP/cypher with phosphoglutamase 1 is associated with dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*; 83; (2009); 80-88

- **Arimura T, Hayashi T, Terada H, Lee S-Y, Zhou Q, Takahashi M, Ueda K, Nouchi T, Hohda S, Shibutani M, Hirose M, Chen J, Park J-E, Yasunami M, Hayashi H, Kimura A:** A cypher/ZASP mutation associated with dilated cardiomyopathy alters the binding affinity to protein kinase C. *J Biol Chem*; 279; (2004); 6746-6752

- **Asimaki A, Syrris P, Wichter T, Matthias P, Saffitz J, McKenna W:** A novel dominant mutation in Plakoglobin causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet*; 81; (2007); 964.973

- **Awad M, Dalal D, Tichnell C, James C, Tucker A, Abraham T, Spevak P, Calkins H, Judge D:** Recessive arrhythmogenic right ventricular dysplasia due to novel cryptic splice mutation in PKP2. *Hum Mutat*; 27(11); (2006)

- **Bierkamp C, Schwarz H, Huber O, Kemler R:** Desmosomal localization of β -catenin in the skin of plakoglobin null-mutant mice. *Development*; 126; (1999); 371-381

- **Boheler K, Volkova M, Morrell Ch, Garg R, Zhu Y, Margulies K, Seymour A-M, Lakatta E:** Sex- and age-dependent human transcriptome variability: Implications for chronic heart failure. *PNAS*; 100(5); (2003); 2754-2759

- **Bonné S, van Hengel J, Nollet F, Kools P, van Roy F:** Plakophilin-3, a novel armadillo-like protein present in nuclei and desmosomes of epithelial cells. *J Cell Sci*; 112; (1999); 2265-2276

Literaturverzeichnis

- **Boon EMJ, Keller JJ, Wormhoudt TAM, Giardiello FM, Offerhaus GJA, van der Neut R, Pals ST:** Sulindac targets nuclear β -catenin accumulation and Wnt signalling in adenomas of patients with familial adenomatous polyposis and in human colorectal cancer cell lines; *BJC*; 90; (2004); 224-229

- **Bowling N, Walsh R, Song G, Estridge T, Sandusky G, Fouts R, Mintze K, Pickard T, Roden R, Bristow G, Sabbah H, Mizrahi J, Gromo G, King G, Vlahos C:** Increased protein kinase C activity and expression of Ca²⁺-sensitive isoforms in the failing human heart. *Circulation*; 99; (1999); 384-391

- **Butz S, Stappert J, Weissig H, Kemler R:** Plakoglobin and beta-catenin: distinct but closely related. *Science*; 257; (1992); 1142-1144

- **Cardin S, Pelletier P, Libby E, Le Bouter S, Xiao L, Kääb S, Demolombe S, Glass L, Nattel S:** Marked differences between atrial and ventricular gene-expression remodeling in dogs with experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol*; 45 ;(2008); 821-831

- **Chen X, Bonné S, Hatzfeld M, van Roy F, Green K:** Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. *J Biol Chem*; 277; (2002); 10512-10522

- **Chitaev N, Averbakh A, Troyanovsky R, Troyanovsky S:** Molecular organization of the desmoglein-plakoglobin complex. *J Cell Sci*;111; (1998); 1941-1949

- **Choi H, Weis W:** Structure of the armadillo repeat domain of plakophilin 1. *J Mol Biol*; 346(1); (2004); 367-376

- **Clark K, McElhinny A, Beckerle M, Gregorio C:** Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 18; (2002); 637-706

Literaturverzeichnis

- **Dalal D, Molin L, Piccini J, Tichnell C, James C, Bomma C, Prakasa K, Towbin J, Marcus F, Spevak P, Bluemke D, Abraham T, Russell S, Calkins H, Judge D:** Clinical features of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy associated with mutations in plakophilin-2. *Circulation*; 113; (2006); 1641-1649

- **Deqiang L, Wenjun Z, Ying L, Haneline L, Shou W:** Lack of Plakoglobin in epidermis leads to keratoderma. *J Biol Chem*; 287; (2012); 10435-10443

- **Dihlmann S, Klein S, von Knebel Doeberitz M:** Reduction of β -Catenin/T-Cell transcription factor signaling by Aspirin and Indomethacin is caused by an increased stabilization of phosphorylated β -Catenin. *Mol Cancer Ther*; 2; (2003); 509-516

- **Falcao L, Pinto F, Ravara L, van Zwieten A:** BNP and ANP as diagnostic and predictive markers in heart failure with left ventricular systolic dysfunction. *JRA*; 5; (2004); 121-129

- **Fermin D R, Barac A, Lee S, Polster S P, Hannenhalli S, Bergmann T L, Grindle S, Dyke D B, Pagani F, Miller L W, Tan S, Remedios C, Cappola Th P, Margulies K B, Hall J L:** Sex and age dimorphism of myocardial geneexpression in nonischemic human heart failure. *Circulation*; 1; (2008); 117-125

- **Franke W, Goldschmidt M, Zimbelmann R, Mueller H, Schiller D, Cowin P:** Molecular cloning and amino acid sequence of human plakoglobin, the common junctional plaque protein. *PNAS*; 86; (1989); 4027-4031

- **Franz W, Müller O, Katus H:** Cardiomyopathies: from genetics to the prospect of treatment. *Lancet*; 358(9293); (2001); 1627-1637

- **Gao Z, Xu H, DiSilvestre D, Halperin V, Tunin R, Tian Y, Yu W, Winslow R, Tomaselli G:** Transcriptomic profiling of the canine tachycardia-induced heart failure model: global comparison to human and murine heart failure. *J Mol Cell Cardiol*; 40(1); (2006); 76-86

Literaturverzeichnis

- **Gardner SH, Hawcroft G, Hull MA:** Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on β -catenin protein levels and catenin-related transcription in human colorectal cancer cells. *BJC*; 91; (2004); 153-163
- **Goldstein M, Schroeter J, Michael L:** Role of the z-band in the mechanical properties of the heart. *FASEB J*; 5; (1991); 2167-2174
- **Goossens S und van Roy F:** Cadherin-mediated cell-cell adhesion in the testis. *Frontiers in Bioscience*; 10; (2005); 398-419
- **Griggs R, Vihola A, Hackmann P, Talvinen K, Haravuori H, Faulkner G, Eymard B, Richard I, Selcen D, Engel A, Carpen O, Udd B:** Zaspopathy in a large classic late-onset distal myopathy family. *Brain*; 130; (2007); 1477-1484
- **Grossmann K, Grund C, Huelsken J, Behrend M, Erdmann B, Franke W, Birchmeier W:** Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junction formation. *J Cell Biol*; 167; (2004); 149-160
- **Hamaguchi M, Matsuyoshi N, Ohnishi Y, Gotoh B, Takeichi M, Nagai Y:** p60^{V-src} causes tyrosine phosphorylation and inactivation of the N-cadherin-catenin cell adhesion system. *EMBO J*; 12; (1993); 307-314
- **Hamm C, Arntz H, Bode C, Giannitsis E, Katus H, Levenson B, Nordt Th, Neumann F, Tebbe U, Zahn R:** Leitlinien: Akutes Koronarsyndrom (ACS). *Kardiol*; 93; (2004); 324-341
- **Hatzfeld M:** Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion?. *Mol Cell Res*; 1773; (2006); 69-77

Literaturverzeichnis

- **Hatzfeld M, Haffner C, Schulze K, Vinzens U:** The function of plakophilin 1 in desmosome assembly and actin filament organization. *J Cell Biol*; 149; (2000); 209-222

- **Hawcroft G, D'Amico M, Albanese Ch, Markham A, Pestell R, Hull M:** Indomethacin induces differential expression of β -catenin, γ -catenin and T-cell factor target genes in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*; 23; (2002); 107-114

- **Hoppe U, Böhm M, Dietz R, Hanrath, Kroemer H, Osterspey A, Schmaltz A, Erdmann E:** Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. *Kardiol.*; 94; (2005); 488-509

- **Huang C, Zhou Q, Liang P, Hollander M, Sheikh F, Li X, Greaser M, Shelton G, Evans S, Chen J:** Characterization and in vivo functional analysis of splice variants of cypher. *J Biol Chem*; 278; (2003); 7360-7365

- **Hwang JJ, Allen PD, Tseng GC, Lam CW, Fananapazir L, Dzau VJ, Liew CC:** Microarray gene expression profiles in dilated and hypertrophic cardiomyopathic end-stage heart failure; *Physiol Genomics*; (2002); 10(1); 31-44

- **Jacob K, Noorman M, Cox M, Groeneweg J, Hauer R, van der Heyden M:** Geographical distribution of plakophilin-2 mutation prevalence in patients with arrhythmogenic cardiomyopathy. *Neth Heart J*; 20; (2012); 234-239

- **Katzemich A, Liao KA, Czerniecki S, Schöck F:** Alp/Enigma family proteins cooperate in Z-disc formation and myofibril assembly. *PLOS Genet*; (2013); 9(3)

- **Khan T, Bianchi C, Araujo E, Voisine P, Xu S-H, Feng J, Li J, Sellke F:** Aprotinin preserves cellular junctions and reduces myocardial edema after regional ischemia and cardioplegic arrest. *Circulation*; 112; (2005); 196-201

Literaturverzeichnis

- **Kirchhof P, Fabritz L, Zwiener M, Witt H, Schäfers M, Zellerhof S, Paul M, Athai T, Hiller K-H, Baba H, Breithardt G, Ruiz P, Wichter T, Levkau B:** Age- and training-dependent development of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in heterozygous plakoglobin-deficient mice. *Circulation*; 114; (2006); 1799-1806

- **Kodama S, Ikeda S, Asahara T, Kishida M, Kikuchi A:** Axin directly interacts with plakoglobin and regulates its stability. *J Biol Chem*; 39; (1999); 27682-27688

- **Kowalczyk A, Hatzfeld M, Bornslaeger E, Kopp D, Borgwardt J, Corcoran C, Settler A, Green K:** The head domain of plakophilin-1 binds to desmoplakin and enhances its recruitment to desmosomes. *J Biol Chem*; 274; (1999); 18145-18148

- **Kowalczyk A, Bornslaeger E, Borgwardt J, Palka H, Dhaliwal A, Corcoran C, Denning M, Green K:** The amino-terminal domain of desmoplakin binds to plakoglobin and clusters desmosomal cadherin-plakoglobin complexes. *J Cell Biol*; 139; (1997); 773-784

- **Li Y, Wu G, Tang Q, Huang C, Jiang H, Shi L, Tu X, Zhu X, Wang H:** Slow cardiac myosin regulatory light chain 2 (MYL2) was down-expressed in chronic heart failure patients. *Clin Cardiol*; 34; (2011); 30-34

- **Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R:** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*; 193; (1951); 265-275

- **Lu D, Cottam H, Corr M, Carson D:** Repression of β -catenin function in malignant cells by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *PNAS*; 102; (2005); 18567-18571

- **Luther P:** The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling. *J Muscle Res Cell Motil*; 30; (2009); 171-185

Literaturverzeichnis

- **Maillet M, van Berlo, Molkentin J**: Molecular basis of physiological heart growth: functional concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 14; (2013); 38-48

- **McKoy G, Protonotarios N, Crosby A, Tsatsopoulou A, Anastasakis A, Coonar A, Norman M, Baboonian C, Jeffry S, McKenna W**: Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). *Lancet*; 355; (2000); 2119-2124

- **McMillan J, Haftek M, Akiyama M, South A, Perrot H, McGrath J, Eady R, Shimizu H**: Alterations in desmosome size and number coincide with the loss of keratinocyte cohesion in skin with homozygous and heterozygous defects in the desmosomal protein plakophilin 1. *J Invest Dermatol*; 121; (2003); 96-103

- **McMurray J, Stewart S**: **Epidemiology, aetiology and prognosis of heart failure.** *Heart*; 83; (2000); 596-602

- **Mertens C, Kuhn C, Franke W**: Plakophilins 2a and 2b: Constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque. *J Cell Biol*; 135; (1996); 1009-1025

- **Moriarty M, Ryan R, Lalor P, Dockery P, Byrnes L, Grealy M**: Loss of plakophilin 3 disrupts heart development in zebrafish. *Int J Dev Biol*; 56; (2012); 711-718

- **Nagaoka I, Matsui K, Ueyama T, Kanemoto M, Wu J, Shimizu A, Matsuzaki M, Horie M**: Novel mutation of plakophilin-2 associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy; *Circulation*. 70; (2006); 933-935

- **Park S-K, Prolla T**: Gene expression profiling studies of aging in cardiac and skeletal muscles. *Cardiovasc Res*; 66; (2005); 205-212

Literaturverzeichnis

- **Peifer M, Wieschaus E:** The segment polarity gene *armadillo* encodes a functionally modular protein that is the *Drosophila* homolog of human plakoglobin. *Cell*; 63; (1990); 1167-1178

- **Peifer M, Berg S, Reynolds A:** A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell*; 76; (1994); 789-791

- **Rampazzo A, Nava A, Malacrida S, Boffagna G, Bauce B, Rossi V, Zimbello R, Simionati B, Basso C, Thiene G, Towbin J, Danieli G:** Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet*; 71; (2002); 1200-1206

- **Reynolds A, Daniel J, McCrea P, Wheelock M, Wu J, Zhang Z:** Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120^{cas} associates with e-cadherin complexes. *Mol Cell Biol*; 14; (1994); 8333-8342

- **Reynolds A, Herbert L, Cleveland J, Berg S, Gaut J:** p120, a novel substrate of protein tyrosine kinase receptors and of p60v-src, is related to cadherin-binding factors beta-catenin, plakoglobin and armadillo. *Oncogene*; 12; (1992); 2439-2445

- **Roger V, Weston S, Redfield M, Hellermann-Horman J, Killian J, Yawn B, Jacobsen S:** Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. *JAMA*; 292; (2004); 344-350

- **Ruiz P, Brinkmann V, Ledermann B, Behrend M, Grund C, Thalhammer C, Vogel F, Birchmeier C, Günthert U, Franke W:** Targeted mutation of plakoglobin in mice reveals essential functions of desmosomes in the embryonic heart. *J Cell Biol*; 135; (1996); 215-225

Literaturverzeichnis

- **Sacco P, McGranahan T, Wheelock M, Johnson K:** Identification of plakoglobin domains required for association with n-cadherin and α -catenin. *J Biol Chem*; 270; (1995); 20201-20206

- **Schmidt A, Langbein L, Rode M, Prätzel S, Zimbelmann R, Franke W:** Plakophilins 1a and 1b: widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components. *Cell Tissue Res*; 290(3); (1997); 481-499

- **Selcen D, Engel A:** Mutations in ZASP define a novel form of muscular dystrophy in humans. *Ann Neurol*; 57(2); (2005); 269-276

- **Simpson P:** β -protein kinase C and hypertrophic signaling in human heart failure. *Circulation*; 99; (1999); 334-337

- **Steg G, James S, Atar D, Badano L, Blömstrom-Lundqvist C, Borger M, Di Mario C, Dickstein K, Ducrocq G, Fernandez-Aviles F, Gershlick A, Giannuzzi P, Halvorsen S, Huber K, Juni P, Kastrati A, Knuuti J, Lenzen M, Mahaffey K, Valgimigli M, van't Hof A, Widimsky P, Zahger D:** ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *EUR Heart J*; 33; (2012); 2569-2619

- **Stokes D:** Desmosomes from a structural perspective. *Curr Opin Cell Biol*; 19; (2007); 565-571

- **Swope D, Cheng L, Gao E, Li J, Radice L:** Loss of Cadherin-Binding Proteins β -Catenin and Plakoglobin in the heart leads to gap junction remodeling and arrhythmogenesis. *mol cell biol*; 32; (2012); 1056-1067

- **Syrris P, Ward D, Asimaki A, Sen-Chowdhry S, Ebrahim H, Evans A, Hitomi N, Norman M, Pantazis A, Shaw A, Elliott P, McKenna W:** Clinical expression of

Literaturverzeichnis

- plakophilin-2 mutations in familial arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation*; 113; (2006); 356-364
- **Tan F-L, Moravec Ch S, Li J, Apperson-Hansen C, McCarthy P M, Young J B, Bond M:** The gene expression fingerprint of human heart failure. *PNAS*; 99(17); (2002); 11387-11392

 - **van Tintelen J, Entius M, Bhuiyan Z, Jongbloed R, Wiesfeld A, Wilde A, van der Smagt J, Boven L, Mannens M, van Langen I, Hofstra R, Otterspoor L, Doevendans P, Rodriguez L, van Gelder I, Hauer R:** Plakophilin-2 mutations are the major determinant of familial arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circulation*; 113; (2006); 1650-1658

 - **Vatta M, Mohapatra B, Jimenez S, Sanchez X, Faulkner G, Perles Z, Sinagra G, Lin J-H, Vu T, Zhou Q, Bowles K, Di Lenarda A, Schimmenti L, Fox M, Chrisco M, Murphy R, McKenna W, Elliott P, Bowles N, Chen J, Valle G, Towbin J:** Mutations in cypher/ZASP in patients with dilated cardiomyopathy and left ventricular non-compaction. *J Am Coll Cardiol*; 42; (2003); 2014-2027

 - **Villaret D, Wang T, Dillon D, Xu J, Sivam D, Cheever M, Reed St:** Identification of genes overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma using a combination of complementary DNA subtraction and microarray analysis. *Laryngoscope*; 110; (2000); 374-381

 - **Volkova M, Garg R, Dick S, Boheler K:** Aging-associated changes in cardiac gene expression. *Cardiovasc Res*; 66; (2005); 194-204

 - **Wang Y, Chen L, Hagiwara N, Knowlton A:** Regulation of heat shock protein 60 and 72 expression in the failing heart. *J Mol Cell Cardiol*; 48; (2010), Author manuscript

 - **Wolf A, Hatzfeld M:** A role of plakophilins in the regulation of translation. *Cell Cycle*; 9; (2010); 2973-2978

Literaturverzeichnis

- **Yamada K, Green K, Samarel A, Saffitz J:** Distinct pathways regulate expression of cardiac electrical and mechanical junction proteins in response to stretch. *Circ Res*; 97; (2005); 346-353

- **Yin T, Green K:** Regulation of desmosome assembly and adhesion. *Semin Cell Dev Biol*; 6; (2004); 665-677

- **Yu M, Zheng Y, Sun HX, Yu DJ:** Inhibitory effects of enalaprilat on rat cardiac fibroblast proliferation via ROS/P38MAPK/TGF- β 1 signaling pathway. *Molecules*; 17; (2012); 2738-2751

- **Zhang Sh, Liu Z, Zou C, Wang L:** Effect of metoprolol on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in a rabbit model of heart failure. *CMJ*; 125; (2012); 815-822

- **Zhao J, Yang Y, You S, Cui C, Gao R:** Carvedilol preserves endothelial junctions and reduces myocardial no-reflow after acute myocardial infarction and reperfusion. *Int J Cardiol*; 115; (2006); 334-341

- **Zhou Q, Ruiz-Lozano P, Martone M, Chen J:** Cypher, a striated muscle-restricted PDZ and LIM domain-containing protein, binds to α -Actinin-2 and protein kinase C. *J Biol Chem*; 274; (1999); 19807-19813

- **Zhou Q, Chu P-H, Huang C, Cheng C-F, Martone M, Knoll G, Shelton G, Evans S, Chen J:** Ablation of cypher, a PDZ-LIM domain z-line protein causes a severe form of congenital myopathy. *J Cell Biol*; 155; (2001); 605-612

8 Anhang**8.1 Tabelle 4:****Übersicht der eingeschlossenen Patienten**

NYHA: New York Heart Association Klassifikation der Herzinsuffizienz; **LHK EF:** Ejektionsfraktion im Linksherzkatheter gemessen; **CCS:** Canadian Cardiovascular Society Klassifikation der Angina pectoris

Nummer	Alter bei OP	NYHA	LHK EF	CCS
5	52	2	60%	2
10	65	2,5	55%	2,5
13	53	2	57%	2
25	73	2	62%	2
31	77	3	50%	2
39	76	1	74%	2
40	65	2	55%	2
45	58	3	63%	2
52	60	2	60%	2
71	75	2	49%	2
78	65	2	71%	3
84	56	2	65%	1,5
88	67	2	58%	2
90	70	2	75%	2
91	78	2	55%	2
92	69	2	71%	2
95	57	2	76%	3
107	75	2	44%	2
112	69	2	72%	2
121	48	2,5	55%	2
125	75	2	75%	2,5
128	66	2	61%	4
132	63	2	60%	2
133	51	2,5	65%	2
139	63	2	70%	2

Anhang

140	77	2	65%	4
150	53	2	52%	2
165	73	2	60%	2
167	74	2,5	35%	2,5
170	70	3	58%	2
174	73	2	46%	2
179	79	2	62%	3
190	76	2	70%	2
239	81	2	60%	2
243	80	1	71%	1
246	70	2	65%	3
255	80	2	70%	3
269	73	2	73%	2
280	53	2	72%	2
287	57	2	50%	3
290	61	2	63%	2
292	70	2	74%	2
293	60	2	80%	2
298	57	2	67%	2
304	56	2	58%	3
305	63	2	89%	2
307	71	2	66%	2,5
314	62	3	40%	2
318	68	2	35%	2
323	67	2	78%	2
326	60	1	78%	2,5
338	85	1	60%	4
339	82	2	56%	2
	Mittelwert	2,04	62%	2,26
	Median	2,00	62%	2,00
	Standardabweichung	0,41	11,28%	0,58

8.2 Zusammensetzung der Lösungen und Puffer

AP-Puffer	100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O 1,49% (w/v) Triethanolamin pH 9,4
APS 10%	1g APS/10 ml H ₂ O dest
BCIP	5 mg BCIP in 1 ml DMF
Elektrophoresepuffer	51,6 mM Tris-Base 150 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
Homogenisationspuffer	10mM NaHCO ₃ 20 % (w/v) SDS H ₂ O dest
Lämmli	0,25 M Tris-Base 40 % (w/v) Glycerol 8 % (w/v) SDS pH 6,8 Spur Bromophenolblau
NBT	50 mg NBT 300 µl H ₂ O dest 700 µl DMF
Ponceaut-Färbelösung	0,2 % (w/v) Ponceaut S 3% (w/v) TCA
Porziopuffer 2x	0,4% (w/v) Polyacrylamid 0,2 M Tris Base

Anhang

	<p>0,6 M Glycin</p> <p>0,12 mM EDTA</p> <p>0,2% (w/v) SDS</p> <p>10% (w/v) Glycerin</p> <p>pH 8,8</p>
Porzio-Trenngel (10%)	<p>37,5 ml Porziopuffer 2x</p> <p>25 ml Rotiphorese® Gel 30</p> <p>6,25 ml Glycerin</p> <p>10ml H₂O dest</p> <p>65 µl TEMED</p> <p>300 µl 10% (w/v) APS</p>
Proteinstandard	<p>0,6 mg/ml Lipoxidase</p> <p>0,1 mg/ml BSA</p> <p>0,175 mg/ml Albumin aus Hühnereiweiß</p> <p>0,4 mg/ml Carboanhydrase</p> <p>0,5 mg/ml Chymotrypsinogen A</p> <p>0,25 mg/ml Ribonuclease A</p> <p>0,25 mg/ml Cytochrom C</p> <p>in 1x Lämmli mit SDS und 3 mg/ml DTT Aliquots vpn 100 µl bei -20 °C gelagert vor Auftragen 30 Min bei 95 °C gekocht</p>
Sammelgel (4%)	<p>4,7 ml Sammelgelpuffer</p> <p>2,5 ml Rotiphorese® Gel 30</p> <p>11,6 ml H₂O dest</p> <p>12 µl TEMED</p> <p>190 µl 10% (w/v) APS</p>
Sammelgelpuffer	<p>0,5 M Tris.Base</p> <p>0,4 % (w/v) SDS</p>

Anhang

	pH 6,8
TBST	10 mM Tris-Base 154 mM NaCl 0,1 % (w/v) Tween 20 pH 7,4 Lagerung bei 4 °C
TCA-Lösung	50% (w/v) TCA Lagerung bei 4 °C
Transferpuffer	210 mM di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat 40 mM Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat

8.3 Bezugsquellen

8.3.1 Bezugsquellen der verwendeten Substanzen

Albumin	Sigma-Aldrich; St. Louis; MO; USA
<u>Antikörper</u>	
Plakoglobin, Clone 15F11	Sigma-Aldrich; Saint Louis, Missouri; USA
Cypher 1	Transduction Laboratories; Lexington; USA
PKP2(2a+2b) Multiepitope Cocktail	Progen Biotechnik GmbH; Heidelberg; Deutschland
Calsequestrin	Prof. L. Jones; University of Indianapolis, IN; USA
APS	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
BCIP	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot; Deutschland
Bromophenolblau	Sigma-Aldrich; St. Louis; MO; USA
BSA	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Carboanhydrase	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg; Deutschland

Anhang

Chymotrypsinogen A	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg; Deutschland
Cytochrom C	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg; Deutschland
DMF	Sigma-Aldrich; St. Louis; MO; USA
DTT	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot; Deutschland
ECF	Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg; Deutschland
EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Glycine	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
HCl	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Lipoxidase	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg; Deutschland
MgCl ₂ x6H ₂ O	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Magermilchpulver	TSI GmbH & Co. KG; Zeven; Deutschland
NaCl	AppliChem GmbH; Darmstadt; Deutschland
Na ₂ CO ₃	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
NaHCO ₃	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
NaH ₂ PO ₄	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
NBT	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot; Deutschland
Nitrocellulosemembran	Whatman GmbH; Dassel; Deutschland
Polyacrylamid	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Ponceau S	Sigma-Aldrich; St. Louis; MO; USA
Ribonuclease A	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg; Deutschland
Rotiphorese- Gel 30	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
SDS	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
TCA	Sigma-Aldrich; St. Louis; MO; USA
TEMED	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg; Deutschland

Anhang

Tris-Base	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Triethanolamin	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Tween 20	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland

8.3.2 Bezugsquellen der verwendeten Geräte

Biometra Standard Power Pack P25	Biometra GmbH; Göttingen; Deutschland
Elektrophorese-Einheit Hoefer SE 600	Hoefer; San Francisco, CA; USA
Eppendorf Tischzentrifuge	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
ImageQuant®-Software	Molecular Dynamics; Sunnyvale; USA
Kreis-Schüttler 3015	GFL; Burgwedel; Deutschland
Mikro-Dismembrator S	Sartorius AG; Göttingen; Deutschland
PhosphorImager (STORM 860)	Molecular Dynamics; Sunnyvale, CA; USA
Pipetten	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Stromquelle Biorad Modell 200/2.0	Biorad; München; Deutschland
Tank-Transfer-Einheit Hoefer TE62	Hoefer; San Francisco, CA; USA
Ultraschall-Homogenisator Sonopuls HD2070	Bandelin; Berlin; Deutschland
Zytochem Plus HRP Kit	Zytomed Systems GmbH; Berlin; Deutschland

9 Thesen

1 Plakophilin, Plakoglobin und Cypher sind drei Proteine, die unter anderem im Herzen vorkommen und eine Bedeutung für den Ablauf der Kontraktion und die Zell-Zell-Kommunikation haben.

2 Plakophilin und Plakoglobin sind desmosomale Proteine. Tierversuche zeigen, daß ein Knockout dieser Proteine Auswirkungen auf den gesamten Organismus haben kann. Beim Menschen sind Mutationen mit Erkrankungen wie arrhythmogener rechtsventrikulärer Kardiomyopathie (ARVC) assoziiert.

3 Cypher ist ein Z-Scheiben-assoziiertes Protein und mitverantwortlich für die Organisation der Z-Scheibe. Mutationen gehen mit einer erhöhten Inzidenz von Erkrankungen wie dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und hypertropher Kardiomyopathie (HCM) einher.

4 Plakophilin, Plakoglobin und Cypher sind als desmosomale Proteine bzw. als Z-Scheiben-assoziiertes Protein im menschlichen Vorhof nachweisbar.

5 Die Expression von Plakoglobin und Cypher scheint mit dem Alter zuzunehmen. Eine lineare Korrelation bestand in den untersuchten Proben jedoch nicht.

6 Die Expression von Plakoglobin korreliert mit der von Cypher.

7 Die Einnahme von Medikamenten wie Acetylsalicylsäure und ACE-Hemmern korreliert mit der Expression von Plakoglobin.

8 Die interindividuellen Unterschiede der Proteinexpression von Plakoglobin, Plakophilin und Cypher sind groß. Verschiedene zusätzliche und bislang nicht bekannte Einflussfaktoren sind vorstellbar.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Vor- und Zuname	Winnie Mangold
Geburtsdatum	23.04.1982
Geburtsort	Vorwerk

Schulbildung

1989 - 1993	Grundschule an der Stader Straße, Bremen
1993-1999	Gesamtschule Bremen Mitte, Bremen
1999 - 2002	Gymnasiale Oberstufe des Schulzentrums am Rübekamp, Bremen
	Leistungskurse: Englisch, Soziologie
Juni 2002	Abitur

Studium

Oktober 2003	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg
März 2006	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Febr. 2009 - Jan. 2010	<u>Praktisches Jahr</u> Psychiatrie: Universitätsklinik, Halle Innere Medizin: Berufsgenossenschaftliche Kliniken Bergmannstrost, Halle Chirurgie: Krankenhaus St. Elisabeth und St. Barbara, Halle
April 2010	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Mai 2010	Erteilung der Approbation
Okt. 2010 – Jan. 2011	Promotionsstudium (s. u.)

Doktorarbeit

August 2007

Beginn der Doktorarbeit am Institut für
Pharmakologie und Toxikologie bei Prof. Dr.
med. Joachim Neumann, Halle

Thema: Untersuchung zur
altersabhängigen Expression der
Proteine Plakoglobin, Plakophilin und
ZASP/Cypher im menschlichen
Herzmuskel

März 2009

Posterpräsentation bei der 50. Jahrestagung
der DGPT, Mainz

WS 2010/11

Promotionsstudium am Institut für
Pharmakologie und Toxikologie der MLU Halle

Beruf

Seit Februar 2011

Arbeit als Ärztin in Weiterbildung zur FÄ für
Allgemeinmedizin bei

Oberhavel Kliniken GmbH

Klinikum Henningsdorf

Geriatric, CÄ: Fr. Dr. S. Schadow

Robert-Koch-Str. 2-12

16515 Oranienburg

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation

**Untersuchung zur altersabhängigen Expression der Proteine Plakoglobin,
Plakophilin und ZASP/Cypher im menschlichen Myokard**

zur Erlangung des akademischen Grades: Doktor der Medizin (Dr. med.) selbständig
und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Ich habe mich zuvor noch nicht um den Doktorgrad beworben.

Berlin, 31. Januar 2014

Ich danke

Herrn Prof. Dr. med. J. Neumann für die Überlassung des Themas und die Betreuung,

Herrn Dr. U. Gergs für die praktische Betreuung und die kritische Korrektur,

meinem Mit-Doktoranden Herrn Frank Langguth für die gute Zusammenarbeit und die freundschaftliche Atmosphäre,

Frau Simmrodt für die immer freundliche und schnelle Antwort auf alle Emails und Hilfe bei allen organisatorischen Dingen,

allen nicht namentlich genannten MitarbeiterInnen des Instituts für das gute Arbeitsklima und die praktische Hilfe,

Florian von Frieling für die moralische Unterstützung sowie die Geduld bei allen computertechnischen Fragen,

meinen Eltern für die Unterstützung und Ermutigungen während meines gesamten Studiums.