

Aus der Medizinischen Klinik II
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. H. Schunkert

**Veränderungen der myokardialen Phospholipase D- und
Phosphatidatphosphohydrolase-Signaltransduktion bei Patienten
mit dilatativer Kardiomyopathie**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von

Antje Prey

aus Eschwege

Lübeck 2006

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Thomas Peter Kurz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jörg Braun

Tag der mündlichen Prüfung: 09.05.2007

Zum Druck genehmigt.

Lübeck, den 09.05.2007

**gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung	1
1.1. Dilatative Kardiomyopathie	1
1.2. Phospholipase D	4
1.3. Myokardiale Phospholipase D.....	7
1.4. Funktion der Phosphatidatphosphohydrolase.....	9
1.5. Fragestellung	10
2. Material und Methoden	11
2.1. Bestimmung der Phospholipase D-Aktivität im rechtsventrikulären humanen Myokard	11
2.2. Bestimmung der Phosphatidatphosphohydrolase-Aktivität	17
2.2.1. Bestimmung der Gesamt-Aktivität der Phosphatidatphosphohydrolase sowie der Aktivität der Isoformen PAP1 und PAP2 in Rattenherzmembranen.....	17
2.2.2. Bestimmung der Gesamt-Aktivität der Phosphatidatphosphohydrolase sowie der Aktivität der Isoformen PAP1 und PAP2 in Rattenherzhomogenat.....	18
2.2.3. Bestimmung der Gesamt-Aktivität der Phosphatidatphosphohydrolase sowie der Aktivität der Isoformen PAP1 und PAP2 in humanem Vorhofgewebe	19
2.2.4. Bestimmung der Gesamt-Aktivität der Phosphatidatphosphohydrolase sowie der Aktivität der Isoformen PAP1 und PAP2 in Homogenaten aus humanem rechten Ventrikelgewebe (Biopsien).....	20
2.2.5. Bestimmung der Gesamt-Aktivität der Phosphatidatphosphohydrolase sowie der Aktivität der Isoformen PAP1 und PAP2 in Homogenaten aus humanem rechten Ventrikelgewebe der DCM- und Kontrollpatienten (Biopsien).....	20
2.3. Statistische Methoden.....	21
2.4. Liste der verwendeten Chemikalien	22

3. Ergebnisse	24
3.1. Entwicklung und Anwendung des Phosphatidatphosphohydrolase-Assays	24
3.1.1. Peak-Identifizierung	25
3.1.2. Validierung	32
3.1.2.1. Bildung von BODIPY-Diazylglycerol in Rattenherzmembranen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.....	32
3.1.2.2. Bildung von BODIPY-Diazylglycerol in Rattenherzmembranen in Abhängigkeit von der Menge des eingesetzten Membranproteins.....	34
3.1.2.3. Optimierung des Assays unter Berücksichtigung der Versuchser- gebnisse	35
3.1.3. Aktivität der Phosphatidatphosphohydrolase in Rattenherzmembranen.....	36
3.1.4. Aktivität der Phosphatidatphosphohydrolase in Rattenherzhomogenat.....	38
3.1.5. Aktivität der Phosphatidatphosphohydrolase in humanem Vorhofgewebe	39
3.1.6. Aktivität der Phosphatidatphosphohydrolase in humanem rechten Ventrikel- gewebe	40
3.2. Phospholipase D-Assay	41
3.2.1. Aktivität der Phospholipase D in humanem rechten Ventrikelgewebe von herzgesunden und DCM-Patienten	41
3.2.2. Maximale Stimulation der Phospholipase D-Aktivität mittels Phosphatidyl- inositol-4,5-bisphosphat in humanem rechten Ventrikelgewebe von herz- gesunden und DCM-Patienten	43
3.2.3. Aktivität der Phosphatidatphosphohydrolase in humanem rechten Ventrikel- gewebe von herzgesunden und DCM-Patienten	45
4. Diskussion.....	47
5. Zusammenfassung	51
6. Abkürzungsverzeichnis.....	53
7. Literaturverzeichnis.....	56
8. Lebenslauf	64
9. Danksagung.....	65

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Dilatative Kardiomyopathie

Der Begriff der Herzinsuffizienz beschreibt die Unfähigkeit des Herzens, trotz eines adäquaten Blutvolumens und ausreichender Füllungsdrücke ein für den Bedarf des Organismus ausreichendes Herzzeitvolumen zu fördern und einen venösen Rückfluss zu gewährleisten. Die Ursachen der Herzinsuffizienz sind vielfältig. Sie können kardialer, aber auch extrakardialer Genese sein. Systolische und diastolische Ventrikelfunktionsstörungen sowie Herzrhythmusstörungen können zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz mit sog. Vorwärtsversagen, d. h. mit Verminderung des Herzzeitvolumens, führen. Zu den Ursachen einer systolischen Ventrikelfunktionsstörung gehören Krankheiten, die mit einer erhöhten Volumen- oder/und Druckbelastung des Herzens einhergehen sowie die koronare Herzkrankheit, die Myokarditis und die dilatative Kardiomyopathie.

Bei Kardiomyopathien handelt es sich definitionsgemäß um Krankheiten des Myokards, welche mit einer kardialen Dysfunktion assoziiert sind. Nach der WHO-Klassifikation von 1995 werden fünf verschiedene Arten der Kardiomyopathie unterschieden: 1. die dilatative (DCM), 2. die hypertrophische (HCM), 3. die restriktive (RCM) und 4. die arrhythmogene, hauptsächlich den rechten Ventrikel betreffende Kardiomyopathie (ARVCM) sowie 5. die nichtklassifizierbaren Kardiomyopathien (NKCM). Anatomische und pathophysiologische bzw. hämodynamische Gesichtspunkte liegen dieser Klassifikation zugrunde. Die unklassifizierten Formen lassen sich keiner der ersten vier Kardiomyopathiearten zuordnen. Nach ätiologisch-pathogenetischen Gesichtspunkten lassen sich die Kardiomyopathien in ätiologisch nicht erklärbare bzw. idiopathische und spezifische Formen einteilen. Bei den idiopathischen Kardiomyopathien wird die Ursache im Myokard selbst vermutet, während der Begriff der spezifischen Kardiomyopathie Herzmuskelerkrankungen beschreibt, welche durch bereits vorliegende Herz- oder Systemerkrankungen verursacht werden. Dazu gehören Kardiomyopathien, welche aufgrund von genetischen, entzündlichen, toxischen oder metabolischen Störungen sowie durch Ischämien oder Herzklappenfehler entstanden sind. Weitere Ursachen können ein Hypertonus, ein systemischer Lupus erythematodes, eine rheumatoide Arthritis, eine Sklerodermie oder eine muskuläre Dystrophie sein [39, 29].

Bei 50 % der Patienten mit einer primären bzw. idiopathischen Kardiomyopathie liegt eine dilatative Kardiomyopathie vor. 20-30 % dieser Patienten weisen eine positive Familienanamnese auf.

Die dilatative Kardiomyopathie gehört nach der koronaren Herzkrankheit und dem Hypertonus zu den häufigsten Ursachen einer Herzinsuffizienz [35]. Männer sind häufiger betroffen als Frauen. Das mittlere Alter der Patienten beträgt bei Diagnosestellung 40 Jahre. Charakteristisch für die DCM ist eine Dilatation sowie eine beeinträchtigte Kontraktion des linken und/oder rechten Ventrikels mit erhöhten enddiastolischen und endsystolischen Volumina bzw. Drücken. Das Herzzeitvolumen und die Ejektionsfraktion nehmen ab. Die klinischen Symptome sind Ausdruck eines Vorwärts- und Rückwärtsversagen des linken Ventrikels. Sie äußern sich in Dyspnoe, einer körperlichen Schwäche und pektanginösen Beschwerden infolge einer erhöhten kardialen Wandspannung und der damit verbundenen relativen koronaren Minderperfusion. Klinische Zeichen einer eventuell vorhandenen Rechtsherzinsuffizienz, wie beispielsweise Ödeme, gehen als Spätsymptome mit einer schlechteren Prognose einher [41]. Im Verlauf einer DCM kommt es zu einer Hypertrophie des Myokards. Histologische Veränderungen, wie die Diskrepanz zwischen Form und Größe der Myozytenkerne und des Myozytendurchmessers, das Vorhandensein einer feinfleckigen interstitiellen Fibrose oder lymphozytäre Entzündungszellinfiltrate, sind nicht spezifisch und können nur bei einem Teil der Patienten mit dem klinischem Verdacht einer DCM nachgewiesen werden. Die an einer DCM erkrankten Patienten sind prädisponiert für die Ausbildung von Arrhythmien sowie Thrombembolien und versterben überdurchschnittlich häufig am plötzlichen Herztod.

Untersuchungen von Familien mit idiopathischer DCM haben gezeigt, dass es Fälle von autosomal-dominanter, autosomal-rezessiver, x-chromosomaler und mitochondrialer Vererbung gibt. Man spricht in diesen Fällen von der sog. familiären dilatativen Kardiomyopathie (FDCM). Diese Form der DCM ist mit den unterschiedlichsten Mutationen in mehr als 10 bekannten Genen assoziiert. Die Gen-Mutationen bewirken Veränderungen von Proteinen, die wichtig für den Erhalt der strukturellen Integrität von Kardiomyozyten sind. Zu diesen Proteinen gehören β - und δ -Sarkoglykane sowie Dystrophin, Desmin [25] und Lamin A/C [45]. Die DCM wurde daher von einigen Autoren als Zytoskeletopathie definiert. Weitere Proteine, die aufgrund von Gen-Mutationen verändert sein können, sind Actin [34], β -Myosin, α -Tropomyosin, Troponin I und Troponin T. Diese Proteine sind essenziell für den Aufbau myokardialer Sarkomere. Veränderungen dieser Proteine können zu einer Beeinträchtigung der myokardialen Kontraktionskraft führen.

Bei einer Untersuchung von Patienten mit FDCM wurden sieben Mutationen im Gen der schweren Kette des β -Myosins (MYH7) sowie eine Mutation im kardialen Troponin T-Gen (TNNT2) identifiziert [47]. Weiterhin wurden mit dem Auftreten einer DCM assoziierte Mutationen in den Genen von Troponin I [31], Tropomyosin [33] und Dystrophin [46] entdeckt. Neben diesen idiopathischen, familiären Formen der DCM gibt es dilatative Kardiomyopathien viraler, bakterieller, parasitärer, autoimmuner, medikamentöser oder alkoholtoxischer Genese. Im Rahmen von Speicherkrankheiten, rheumatologischen und endokrinologischen Erkrankungen wurde das Auftreten der DCM ebenfalls beschrieben.

Während einer Herzinsuffizienz kommt es zu einer gesteigerten Aktivierung des Sympathikus mit nachfolgender Freisetzung von Adrenalin und Noradrenalin. Die endogenen Katecholamine aktivieren über myokardiale α - und β -Adrenozeptoren diverse Signaltransduktionswege mit jeweils unterschiedlicher Wirkung am Erfolgsorgan [7]. Während das β -adenenerge Rezeptorsystem über heterotrimere G-Proteine mit dem Adenylatcyclase-Proteinkinase A-Signaltransduktionsweg gekoppelt ist, führt eine Aktivierung von α -Adrenozeptoren zu einer G-Protein-vermittelten Aktivierung des Phospholipase C/ Proteinkinase C-Signaltransduktionsweges. Es wurde beschrieben, dass die Aktivität der Isoenzyme Phospholipase D2 (PLD2) und Phosphatidatphosphohydrolase 2 (PAP2) in sarkomalem linksventrikulären Membranen von Ratten mit Herzinsuffizienz gesteigert ist. Die Entwicklung einer Herzinsuffizienz geht also mit Veränderungen der intrazellulären Signaltransduktion einher [50]. Bisläng wurde jedoch noch nicht untersucht, ob es im Rahmen einer dilatativen Kardiomyopathie zu Veränderungen des PLD-Signaltransduktionsweges in humanem Myokard kommt.

1.2. Phospholipase D

Die Phospholipase D gehört zu einer Gruppe von Phospholipasen, welche den Abbau von Phosphoglyzeriden katalysieren. Phosphoglyzeride stellen einen wesentlichen Bestandteil aller biologischen Membranen dar. Phospholipasen kommen in allen Geweben, allerdings mit unterschiedlichen Angriffspunkten am Phosphoglyzerol-Molekül, vor (Abbildung 1) und zeigen eine hohe Spezifität bezüglich des zu spaltenden Phosphoglyzerids.

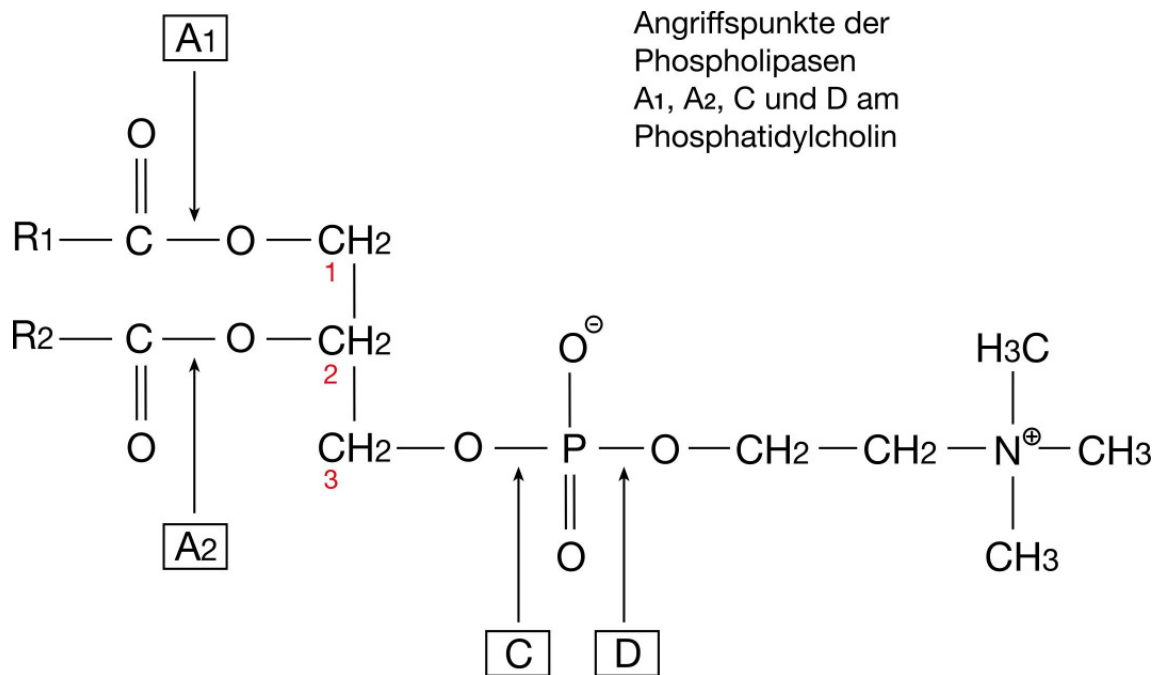


Abbildung 1: umgestaltet nach G. Löffler und P.E. Petrides: Biochemie und Pathobiochemie; Springer-Verlag, 6. Auflage, S. 460, Abbildung 16.37

Die Phospholipase D (PLD), welche in Zellen von Säugetieren, Insekten, Pflanzen, einigen Bakterien und Hefen [12, 13] exprimiert wird, spielt eine zentrale Rolle in Rezeptor-regulierten Signaltransduktionswegen [26] und katalysiert bevorzugt die hydrolytische Spaltung von membrangebundenem Phosphatidylcholin (PC), wodurch Phosphatidische Säure (PA) und Cholin entstehen (Abbildung 2).

Bei Säugetieren sind zwei PLD-Isoformen, PLD1 und PLD2, bekannt, welche überwiegend an der Zellmembran lokalisiert sind. PLD1 (120 kDa) wird durch kleine G-Proteine, wie ARF und Rho, sowie durch Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) und Proteinkinase C (PKC) aktiviert, während PLD2 (105 kDa) durch PIP₂ stimuliert wird, aber über-

wiegend unabhängig von kleinen G-Proteinen ist [18]. Beim Menschen wurden zwei PC-spezifische Formen der PLD, hPLD1 und hPLD2, identifiziert [16, 27]. Die Aminosäure-Sequenz der humanen PLD2 stimmt zu 90 % mit der Sequenz der PLD2 von Mäusen und Ratten überein, ist aber nur zu 53 % identisch mit der humanen PLD1. Es wurde bereits eine zweite Spleißvariante der humanen PLD1 entdeckt, die im Gegensatz zur ursprünglich identifizierten Form (hPLD1a) um 38 Aminosäuren, bzw. 114 Nukleotide, verkürzt ist (hPLD1b) [17]. hPLD1a und 1b können durch ARF-1, PKC- α , PIP₂, PIP₃ sowie durch Mitglieder der Rho-Familie wie RhoA, Rac-1 und CDC42 aktiviert werden, während die humane PLD2 nur durch ARF-1 und PIP₂ reguliert wird. Dabei wirken ARF, PKC- α und die Rho-Proteine bei der Aktivierung der hPLD1a und b synergistisch, während die Mitglieder der Rho-Familie untereinander ohne Anwesenheit von ARF oder PKC- α keine Verstärkung der PLD-Aktivierung hervorrufen können [17]. Es wird daher angenommen, dass die einzelnen Gruppen von PLD-Aktivatoren mit jeweils unterschiedlichen Seiten des Enzyms interagieren.

Phosphatidische Säure, welche bei der durch die PLD katalysierten Spaltung von PC entsteht, wird zu einem großen Teil durch das Enzym Phosphatidatphosphohydrolase (PAP) in 1,2-Diacylglycerol (1,2-DAG) umgewandelt [4]. Eine andere Phospholipase, die sog. Phospholipase C (PLC), bewirkt die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂), wodurch Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerol (1,2-DAG) entstehen. 1,2-DAG kann also mittels des PLD- und des PLC-Signaltransduktionsweges gebildet werden [9]. 1,2-DAG aktiviert die sog. Proteinkinase C (PKC), welche spezielle myokardiale Proteine phosphoryliert, die in Zusammenhang mit der Entwicklung der myokardialen Hypertrophie stehen [6]. Andererseits kann 1,2-DAG mittels des Enzyms DAG-Kinase in PA umgewandelt werden (Abbildung 2). Diese möglichen Metabolisierungswege erschweren die indirekte Messung der PLD-Aktivität mittels quantitativer Bestimmung des Reaktionsproduktes PA.

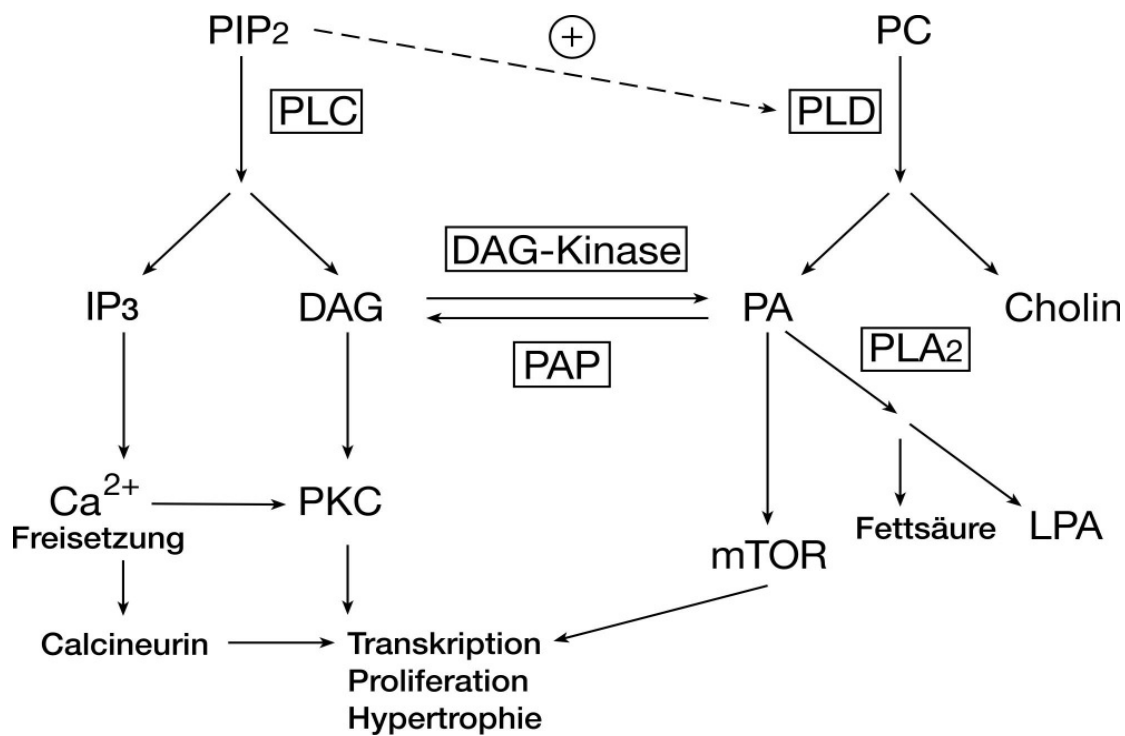


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen Phospholipase D (PLD) und Phospholipase C (PLC). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃), Diacylglycerol (DAG), Proteinkinase C (PKC), Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidische Säure (PA), Phospholipase A₂ (PLA₂), Lyso-phosphatidische Säure (LPA), Phosphatidatphosphohydrolase (PAP), mammalian target of rapamycin (mTOR)

Neben der Hydrolyse von Phospholipiden/-glyzeriden besitzt die PLD die einzigartige Fähigkeit der sog. Transphosphatidierungsreaktion: in Anwesenheit von primären Alkoholen, wie Ethanol, Propanolol oder Butanol, ist das Enzym in der Lage, unphysiologische Phosphatidylalkohole zu bilden, welche nicht weiter metabolisiert werden [20]. Fügt man einem Ansatz mit PC und PLD Ethanol als zusätzliches Substrat hinzu, überträgt der primäre Alkohol seine aliphatische Kette auf die Phosphatidylgruppe des Phosphatidylcholins. Dadurch entsteht ein unphysiologischer Phosphatidylalkohol, in diesem Fall Phosphatidylethanol (PEtOH), welcher im Gegensatz zu PA nicht durch die Phosphatidatphosphohydrolase (PAP) in 1,2-DAG umgewandelt werden kann. Somit ist anhand der Messung des mittels Transphosphatidierungsreaktion entstandenen Phosphatidylethanol eine quantitative Bestimmung der PLD-Aktivität möglich. Da die Transphosphatidierungsreaktion für die PLD spezifisch ist, kann davon ausgegangen werden, dass das gemessene Reaktionsprodukt allein durch die PLD-Aktivität und nicht etwa durch die Phospholipase C (PLC) entstanden ist [26, 20].

1.3. Myokardiale Phospholipase D

Myokardiale PLD ist in den verschiedenen Membransystemen der Herzmuskelzelle enthalten. PLD-Aktivität wurde in Mitochondrienmembranen, im Sarkolemm sowie im sarkoplasmatischen Retikulum der Kardiomyozyten von Ratten nachgewiesen [36].

Von den beiden PLD-Isoformen findet sich im Myokard überwiegend die membrangebundene PLD2-Isoform [37]. Eine mögliche funktionelle Relevanz der PLD für das Myokard zeigen Experimente mit isoliert perfundierten Rattenherzen. Nach kurzen Phasen der Ischämie mit anschließender Reperfusion („ischämische Präkonditionierung“) fand sich eine Steigerung der myokardialen PLD-Aktivität sowie eine gesteigerte Bildung von DAG und PA. Das myokardiale Gewebe wies dabei eine erhöhte Aktivität der Proteinkinase C in Zusammenhang mit einer Steigerung der postischämischen Ventrikelleistung auf. Gleichzeitig wurde die Inzidenz ventrikulärer Arrhythmien reduziert [44]. Isoliert perfundierte Rattenherzen wurden mit Natrium-Oleat behandelt, um die PLD-Aktivität zu stimulieren. Nach Phasen der Ischämie mit anschließender Reperfusion fand sich eine Erhöhung der PLD-Aktivität. Dabei wurde eine Reduktion des durch Ischämie bedingten Zellschadens, gemessen anhand der Kreatinkinase- und Laktatdehydrogenase-Freisetzung während der Reperfusion, beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der Phospholipase D eine Erhöhung der myokardialen Kontraktilität und eine verbesserte koronare Durchblutung während der Reperfusion zur Folge hat [30].

PLD katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylcholin. Dadurch entsteht Phosphatidische Säure. Es konnte gezeigt werden, dass PA in die Regulation des myokardialen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austausches involviert ist. Kardiale sarkolemmale Vesikel wurden aus Ventrikelgewebe von Hunden gewonnen und mit exogener PLD behandelt. Nachfolgend wurde eine Stimulation der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher-Aktivität beobachtet [38]. Gleichzeitig wurde eine Erhöhung der PA-Konzentration in den Vesikeln gemessen. Die Befunde deuten darauf hin, dass PA für die Steigerung der sarkolemmalen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher-Aktivität verantwortlich ist.

Intrazelluläres Kalzium spielt bei der Regulation der muskulären Kontraktion und Relaxation eine zentrale Rolle. Während des kardialen Aktionspotenzials kommt es zu einem vermehrten Kalzium-Einstrom in die Herzmuskelzelle. Dabei strömen die Kalziumionen durch spannungsregulierte L-Typ-Kalzium-Kanäle (L-Typ bedeutet: länger geöffnet)

in die Zelle. Der intrazelluläre Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration löst die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum durch den Ryanodin-Rezeptor-Kalzium-Kanal aus (Kalzium-getriggerte Kalziumfreisetzung). Die nachfolgende Bindung von Kalzium-Ionen an Troponin C bewirkt eine Konformationsänderung des Tropomyosinmoleküls. Die dadurch bedingte Freigabe der Myosinbindungsstelle ermöglicht die Bindung des Myosinköpfchens an das Actin-Molekül. Über den Mechanismus des Querbrückenzyklus kommt es zur muskulären Kontraktion. Die einem Aktionspotenzial folgende Muskelkontraktion wird durch die Kalziumionen vermittelt, welche als Mittlersubstanzen zwischen dem Extra- und Intrazellulärraum fungieren. Die nachfolgende Muskelrelaxation geht mit der Aufnahme des zytosolischen Kalziums in das sarkoplasmatische Retikulum einher. Die Aufnahme der Ca^{2+} -Ionen erfolgt mittels der sarkoplasmatischen Retikulum Kalzium-ATPase (SERCA). Weiterhin werden Ca^{2+} -Ionen durch Na^+/Ca^+ -Austauschsysteme und eine Ca^{2+} -ATPase über die Plasmamembran aus dem Zytosol entfernt.

Phosphatidische Säure besitzt die Fähigkeit, den Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum in das Zellinnere sowie die Ca^{2+} -Freisetzung aus den intrazellulären Speichern des sarkoplasmatischen Retikulums zu induzieren. Der dadurch bedingte Anstieg der zytosolischen Kalzium-Konzentration erhöht die Kontraktionskraft des Herzens [49]. Die funktionelle Bedeutung dieser Befunde wird dadurch belegt, dass PLD und PA Ca^{2+} -abhängige langsame Aktionspotenziale in depolarisierten Vorhöfen von Ratten hervorrufen [22]. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine PA-induzierte Aktivierung von PKC-Isoformen und auf einen Zusammenhang zwischen der PA-Aktivität und der Entwicklung einer myokardialen Hypertrophie [5, 12].

Neuere Befunde weisen darauf hin, dass es sich bei PA um einen wichtigen intrazellulären Botenstoff („second messenger“) handelt, der in der Lage ist, die Proteinkinase mTOR (mammalian target of rapamycin) zu aktivieren, indem er an deren FRB-Domäne (rapamycin binding domain) bindet. mTOR ist in die Zellzyklusprogression, Translation, DNS-Rekombination sowie in DNS-Reparaturvorgänge involviert [14]. PA fördert die Bindung der Proteinkinase cRaf-1 an die Zellmembran, wodurch cRaf-1 mit Ras, GTP und anderen regulatorischen Komponenten des Ras/Mek/Erk-Signaltransduktionsweges interagiert [1]. PA stellt somit einen wichtigen intrazellulären Regulator der Herzfunktion dar.

1.4. Funktion der Phosphatidatphosphohydrolase

Die Phosphatidische Säure kann durch das Enzym Phosphatidatphosphohydrolase (PAP) in 1,2-Diazylglyzerol umgewandelt werden [4]. Diazylglyzerol wird daher nicht nur über eine Aktivierung der Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-spezifischen Phospholipase C (PLC), sondern auch PLD-abhängig aus Phosphatidischer Säure gebildet (Abbildung 2).

Es gibt Untersuchungen, die darauf hindeuten, dass die Aktivierung spezifischer Proteinkinase C-Isoenzyme von der molekularen Zusammensetzung des 1,2-Diazylglyzerols abhängig ist [10]. Dem Diazylglyzerol des PLD-Signaltransduktionsweges könnte daher eine andere Funktion als dem durch PLC gebildetem Diazylglyzerol zukommen. Zudem könnte dieser alternative Entstehungsweg von Diazylglyzerol funktionell für eine verlängerte Aktivierung der Proteinkinase C verantwortlich sein [10]. Dieser Signaltransduktionsweg könnte aufgrund der mehr als 100fach höheren Substratkonzentration von Phosphatidylcholin als Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in der Plasmamembran von großer physiologischer Bedeutung sein [11]. Es liegen bisher, trotz dieser möglichen Bedeutung der Phosphatidatphosphohydrolase, keine Befunde zur PAP-Signaltransduktion am menschlichen (kardiomyopathischen) Herzen vor.

Aufgrund ihrer subzellulären Verteilung und ihrer katalytischen Eigenschaften werden zwei Formen der Phosphatidatphosphohydrolase in Säugetierzellen unterschieden:

PAP1 liegt im Zytosol vor, während PAP2 membrangebunden ist [19]. PAP1 hat Beziehungen zum endoplasmatischen Retikulum sowie anderen Zellorganellen und katalysiert dort die Umwandlung von PA in 1,2-DAG, welches der Synthese von Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE) und Triazylglyzerol (TAG) dient. In der Lunge wird PAP1 für die Synthese von Membran-Phospholipiden, Phosphatidylcholin und 1,2-Dipalmitoyl-sn-3-Phosphatidylcholin benötigt. 1,2-Dipalmitoyl-sn-3-Phosphatidylcholin dient der Synthese des Surfactant durch die Typ II-Zellen [32]. PAP1 ist Mg^{2+} -abhängig und sensitiv gegenüber Sulfhydrylreagenzien, wie z. B. N-Ethylmaleimid (NEM).

PAP2 hingegen befindet sich in der Plasmamembran und ist ein wichtiger Bestandteil des DAG-Signaltransduktionsweges. Das Isoenzym sorgt für den Abbau einer Reihe von Phospholipiden, wie beispielsweise Sphingosin-1-Phosphat, Ceramid-1-Phosphat, PA und Lysophosphatidische Säure (LPA).

PAP2 ist resistent gegenüber Sulfhydrylreagenzien und unabhängig von Mg^{2+} . Um den funktionellen Unterschied zwischen PAP1 und PAP2 deutlich zu machen, wurde vorgeschlagen, PAP2 in Lipidphosphatphosphohydrolase (LPP) umzubenennen [4].

1.5. Fragestellung

Bisher liegen, trotz der zunehmenden insbesondere myokardialen Bedeutung des PLD-Signaltransduktionsweges, keine Befunde zu Veränderungen der PLD-Aktivität im humanen kardiomyopathischen Herzen vor. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war daher die Charakterisierung des Phospholipase D-Signaltransduktionsweges in gesundem und pathologisch verändertem humanen Herzmuskelgewebe. Dazu wurde die basale und stimulierte PLD-Aktivität in Myokardbiopsien von herzgesunden Patienten und von Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) bestimmt. Weiterhin liegen bisher keine Erkenntnisse über die PAP-Aktivität als alternativer DAG-Bildungsweg am menschlichen Herzen vor. Wir entwickelten und validierten daher anhand von Rattenmyokardgewebe einen nicht-radioaktiven Assay zur quantitativen Bestimmung der myokardialen PAP-Aktivität in vitro. Dieser Assay wurde zur Charakterisierung der PAP-Aktivität in humanem Herzmuskelgewebe von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie eingesetzt.

2. Material und Methoden

2.1. Bestimmung der Phospholipase D-Aktivität im rechtsventrikulären humanen Myokard

Studienpopulation:

Patienten mit eingeschränkter linksventrikulärer Pumpfunktion wurden im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung mehrere rechtsventrikuläre endomyokardiale Biopsien entnommen. Bei 14 Patienten wurde aufgrund des Vergleichs klinischer bzw. hämodynamischer und histologischer Daten das Vorliegen einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) bestätigt. Weitere 9 Patienten mit Verdacht auf eine Myokarditis, bei denen die Herzkatheteruntersuchung eine normale linksventrikuläre Pumpfunktion zeigte und eine entzündliche Erkrankung anhand einer rechtsventrikulär entnommenen Biopsie histologisch ausgeschlossen werden konnte, dienten als Kontrollgruppe. Bei allen Patienten wurde eine ischämische Genese einer Kardiomyopathie bei fehlendem Nachweis einer signifikanten koronaren Herzerkrankung angiographisch ausgeschlossen.

Untersuchungsmaterial:

Wir untersuchten die im Rahmen der diagnostischen Herzkatheteruntersuchung entnommenen Biopsien aus dem humanen rechten Ventrikel von DCM- und Kontrollpatienten. Die Biopsien wurden sofort nach Entnahme bei -80°C bis zur labortechnischen Untersuchung eingefroren.

Histologische Verfahren:

Histologisch wurden die Biopsien zunächst in einer Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung lichtmikroskopisch untersucht und die Diagnose der DCM anhand folgender Merkmale geprüft:

- Diskrepanz zwischen Form und Größe der Myozytenkerne, welche bei Vorliegen einer DCM oft groß und bizarr gestaltet sind, und dem Myozytendurchmesser, welcher normal oder aufgrund einer Gefügedilatation vermindert sein kann.
- Vorhandensein einer feinfleckigen interstitiellen Fibrose
- lymphozytäre Entzündungszellinfiltrate, vereinzelt evtl. Myozytennekrosen

Diese histologischen Merkmale sind in ihrer Gesamtheit uncharakteristisch und können auch bei einer sekundären Gefügedilatation des Herzens beobachtet werden. Zusammen mit der entsprechenden Klinik haben sie jedoch bei Stellung der Diagnose einer DCM einen stützenden Charakter, zumal anhand der Biopsien histologisch sekundäre Ursachen einer DCM, wie Speicherkrankheiten oder eine Myokarditis, ausgeschlossen werden können. Eine Myokarditis ist morphologisch gekennzeichnet durch entzündliche Infiltrate im Interstitium in Verbindung mit Myozytennekrosen. Zum Ausschluss einer Myokarditis wurden die Biopsien unserer Patienten einer ASD-Chloracetatesterase-Färbung unterzogen, welche neutrophile Granulozyten und Gewebsmastzellen markiert. Mittels immunhistochemischer Darstellung von TIA1 (T-Zell-spezifisches intrazelluläres Antigen) und OPD4/CD45RO (T-Zell-Oberflächenmarker) ließ sich das Vorhandensein von T-Lymphozyten nachweisen, die mit Hilfe von zusätzlichen Markern, wie z. B. CD5- und CD7-T-Zell-Markern, Lysozym als Makrophagenmarker sowie CD-68 als Marker für Mono- bzw. Histozyten, gegebenenfalls genauer charakterisiert wurden (CD = clusters of differentiation/ Differenzierungsantigene). Eine interstitielle Faservermehrung ließ sich in einer Elastika van Giesson- und einer Trichrom-Färbung erkennen. Glykogenspeicherkrankheiten wurden mittels der Diastase-Perjodsäure-Schiff-Reaktion ausgeschlossen bzw. nachgewiesen, Eisenspeicherkrankheiten mittels einer Berliner-Blau-Färbung. Bei Verdacht auf das Vorliegen einer Amyloidose wurde eine Kongorotfärbung durchgeführt.

Biochemische Verfahren:

Homogenisation:

Das Gewicht jeder einzelnen Biopsie wurde mittels einer Analysenwaage bestimmt. Sodann wurde die Biopsie mithilfe eines Mikromörsers (Roth 0298.1) in 300 µl Puffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,2) homogenisiert. Das entstandene Homogenat wurde 10 Minuten bei 14 000 g und 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge Sigma 202 MK, Sigma Laborzentrifugen-GmbH) und der Überstand in ein sauberes Eppendorfgefäß überführt, gemischt, zu je 100µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Protein-Assay:

Von den Biopsie-Homogenaten wurde je ein Aliquot pro Biopsie für die Proteinbestimmung benötigt. 100 µl Homogenat wurden mit 10 µl 11% Triton (5,5 g Triton X-100, 44,5 g Wasser) versetzt und für 10 Minuten im Ultraschallbad inkubiert. Außerdem wurde eine Standardreihe (Tabelle 1) mit Standard-Lösemittel (bestehend aus 4,5 ml 11% Triton und 45 ml Puffer), und BSA-Standard (Bovines Serum-Albumin, Lyophilisat mit 20 ml Standardlösemittel) wie folgt angesetzt:

Standard-Nr.	Standard-Lösemittel (µl)	BSA-Standard (µl)	Konzentration (mg/ml)
Blindwert	unverdünnt		0
1	90	10	0,137
2	40	10	0,274
3	30	20	0,548
4	20	30	0,822
5	10	40	1,096
6	0	unverdünnt	1,37

Tabelle 1: Standardreihe zur Bestimmung des Proteingehaltes; Bovines Serum-Albumin (BSA)

25 µl der Probe, des Blindwerts (hier: Standardlösemittel) und des Kontrollhomogenats (Rattenherz-Homogenat, s. u.) wurden jeweils mit 125 µl Reagenz A` (Gemisch aus Reagenz A und S der Firma Bio-Rad, entspricht einer alkalischen Kupfertartrat-Lösung) und 1 ml Reagenz B (= Folin) versetzt. Die Proben wurden gemischt, in Halbmikro-Küvetten umgefüllt und nach ca. 30 Minuten mittels eines Photometers bei 750 nm gemessen (DC-Protein-Assay von BioRad, basierend auf der Methode von Lowry et al. [28]). Mit Hilfe von Messwerten der Standardreihe wurde eine lineare Regression durchgeführt, um die Proteinwerte der Proben zu berechnen.

Bestimmung der Phospholipase D-Aktivität:

Mithilfe der gemessenen Proteinwerte wurden jeweils 100 µl Biopsie-Homogenat mit dem Homogenisationspuffer verdünnt, um in jeder Probe einen konstanten Proteinwert von 10 µg Protein/ 25 µl Homogenat zu erreichen.

Pro Homogenat, Kontrolle (Rattenherzhomogenat, s. u.) und Blindwert (Puffer, s. o.) wurden in einer Dreifachbestimmung jeweils 25 µl der Proben mit 25 µl fluoreszenzmarkiertem Phosphatidylcholin (BODIPY-PC; 0,1 mM) und 1 Vol % Ethanol versetzt, gemischt und 30 Minuten in einem Thermomixer (Thermomixer compact, Eppendorf) bei 30°C, 1000 rpm, inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 450 µl gekühlter Stoppreagenz (10 ml Methanol/ BHT und 5 ml Chloroform/ BHT) gestoppt und die Proben für 10 Minuten im Eisbad gekühlt.

Anschließend wurden 150 µl Chloroform/ BHT und 220 µl KCl hinzugegeben. Die Proben wurden 2 Minuten lang geschüttelt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur mit 16000 g zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus). Die entstandene untere Phase der Probe (Chloroformphase) wurde in ein neues Gefäß überführt und mit Hilfe von Stickstoff zur Trockene eingedampft (Lipidextraktion nach der Methode von Bligh und Dyer [3]).

Die Rückstände der Proben wurden in 100 µl Probelösemittel (50 ml n-Hexan, 50 ml 2-Propanol, 1 ml Eisessig und 80 µl Triethylamin) gelöst, gemischt und in HPLC-Vials abgefüllt. Außerdem wurde eine Standardreihe (Tabelle 2) mit fluoreszenzmarkierter Phosphatidischer Säure (BODIPY-PA) angesetzt:

Standard (STD)	Probelösemittel (µl)	BODIPY-PA	n / 50µl
1		*	40 pmol
2	50	150 µl STD 1	30 pmol
3	100	100 µl STD 1	20 pmol
4	100	100 µl STD 3	10 pmol
5	100	100 µl STD 4	5 pmol
6	100	100 µl STD 5	2,5 pmol
7	100	100 µl STD 6	1,25pmol
8	100	100 µl STD 7	0,625 pmol

Tabelle 2: Standardreihe mit fluoreszenzmarkierter Phosphatidischer Säure (BODIPY-PA)

* Standard 1 (STD1) enthält 400 pmol BODIPY-PA, welches in 500 µl Probelösemittel gelöst wurde.

Mit Hilfe von Messwerten der Standardreihe wurde eine lineare Regression durchgeführt, welche der Berechnung bzw. Quantifizierung der Versuchsergebnisse diene.

Da sich die verschiedenen BODIPY-markierten Lipidprodukte hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften sehr ähnlich sind, wurde BODIPY-PA als Standard eingesetzt [8]. Es folgte die Messung der PLD-Aktivität mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC: High Pressure/Performance Liquid Chromatography).

Rattenherzhomogenat:

Zur Überprüfung der Inter-Assay-Variabilität wurde bei jeder Messung der PLD-Aktivität von Biopsie-Homogenaten gleichzeitig die PLD-Aktivität einer definierten Menge eines Rattenherzhomogenats bestimmt. Zur Herstellung eines Rattenherzhomogenats wurde das Herz einer Wistar-Ratte in flüssigem Stickstoff pulverisiert (Vers.-Nr.: 1/A26/01). Das entstandene Pulver wurde in 45 ml Homogenisationspuffer suspendiert, auf zwei Zentrifugenröhrchen verteilt und bei 12 000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert (Zentrifuge RC-5C, Sorvall Instruments, Du Pont Company). Die Überstände wurden gepoolt und zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert. Es folgte die Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Methode von Bio-Rad sowie eine Verdünnung auf 10 µg Protein/ 25 µl.

HPLC-Separation und Quantifizierung:

Mittels einer Normal-Phase-HPLC (hydrophile stationäre Phase, weniger polare mobile Phase), sowie einer LiChrosphere-100-Diol-(5 µm) 250x4-mm-Säule (Merck) wurde die Lipidextraktion gemäß der leicht modifizierten Methode von Silversand und Haux vollendet [42]. Die Analyse wurde mit einer binären Gradientenelution durchgeführt, d.h. dass der Eluent während des Trennvorgangs variabel zusammengesetzt und die Fließmittelstärke im Verlauf erhöht wird (Abbildung 3).

Die mobile Phase besteht aus folgenden Lösungsmitteln:

(A): n-Hexan-Isopropanol-Essigsäure-Triethylamin (820:170:10:0,8 v/v/v/v)

(B): Isopropanol-Wasser-Essigsäure-Triethylamin (850:140:10:0,8 v/v/v/v)

Das Gradientenprofil startet mit 5% Lösungsmittel B und 95% Lösungsmittel A.

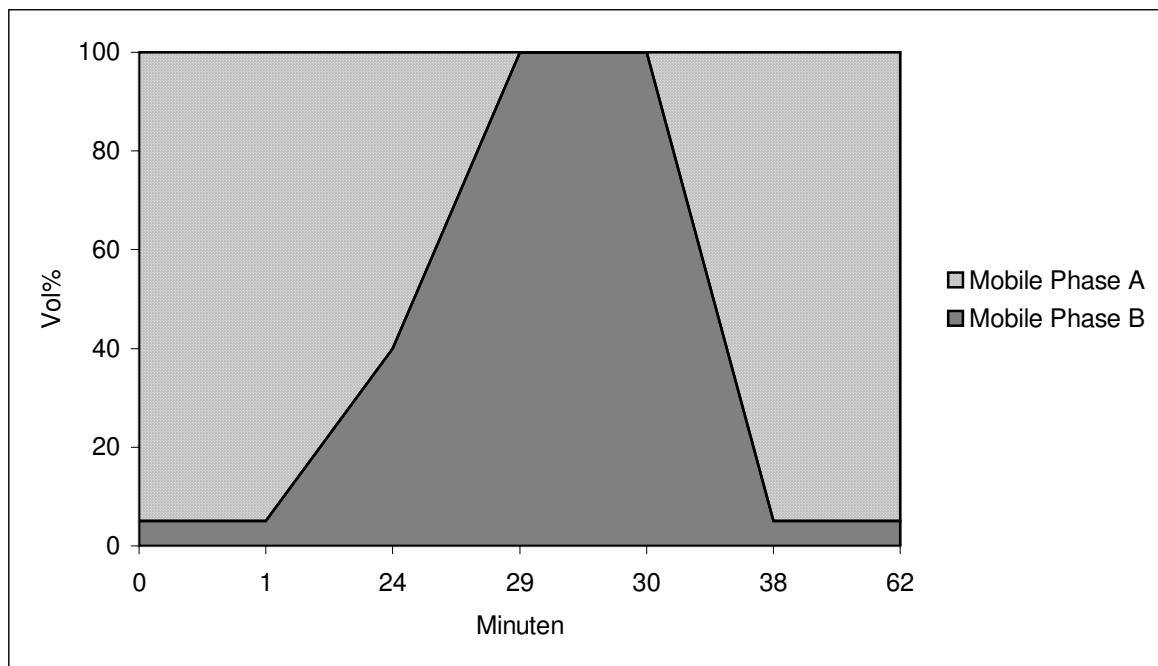


Abbildung 3: Gradientenprofil

Durch das Ansteigen des polareren Lösungsmittels B wird gewährleistet, dass polare Bestandteile, die aufgrund der Ablenkung bzw. Beeinflussung durch die hydrophile stationäre Phase langsamer durch die Trennsäule wandern, mit einer schnelleren Geschwindigkeit von der Säule gewaschen werden.

Im vorliegenden Versuch wurden jeweils 50 µl der Proben auf eine bei 45 °C temperierte Trennsäule aufgetragen. Die Flussrate der mobilen Phase betrug 1 ml/min. Ein Fluoreszenzdetektor (SFM 25, Kontron Instruments) wurde der Säule nachgeschaltet und detektierte Wellenlängen zwischen 475 und 515 nm. Die so gemessenen Signale wurden mithilfe eines Computers und einer speziellen Software für Chromatografie-Daten (Andromeda, Techlab, Deutschland) aufgezeichnet.

Es wurden zusätzliche Messungen der PLD-Aktivität aller Biopsien unter Zugabe von jeweils 100 µM PIP₂ durchgeführt.

2.2. Bestimmung der Phosphatidatphosphohydrolase-Aktivität

2.2.1. Bestimmung der Gesamtaktivität der Phosphatidatphosphohydrolase sowie der Aktivität der Isoformen PAP1 und PAP2 in Rattenherzmembranen

Untersuchungsmaterial:

Isolierte Rattenherzmembranen wurden zu je 80 µl aliquotiert und der Proteingehalt, wie bereits unter Punkt 2.1. beschrieben, ermittelt.

Biochemische Verfahren:

Die Untersuchungen stimmen mit den Prinzipien der Helsinki-Deklaration überein. Männlichen Wistar-Ratten (Körpergewicht 200-250 g, Charles River, Deutschland) wurden durch eine intraperitoneale Injektion von Natrium-Pentobarbital (150 mg/kg KG) narkotisiert. Die Herzen wurden sofort nach Eröffnung des Brustkorbes entnommen, mit eiskalter Natriumchloridlösung gespült und in flüssigem Stickstoff gefroren (Vers.-Nr.: 9/A41/02). Die Herzen von zwei männlichen Wistar-Ratten wurden jeweils in flüssigem Stickstoff pulverisiert und anschließend mit 20 ml Homogenisationspuffer (5 mM Tris-Base, 2 mM EDTA, pH 7,5) versetzt, gemischt und bei 1000g, 4°C, 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 100000g, 4°C, 30 min zentrifugiert (Zentrifuge RC-5C, Sorvall Instruments, Du Pont Company). Das nun entstandene Pellet mit den Membranen wurde mit Resuspensionspuffer (20 mM Tris, 2 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM DTT, pH 7,5) gespült, in 1 ml dieses Puffers resuspendiert und zu je 80 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Versuchsaufbau:

Eine Probe mit 10 µl Rattenherzmembranen und einem Proteingehalt von 2 µg wurde mit 5 µl MAFP (1 µM), Tris-Puffer (20 mM Tris-Base, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7,5) und 5 µl BODIPY-PA (10 µM) versetzt. Einer zweiten Probe wurden zusätzlich 5 µl MgCl₂ (5 mM) und einer dritten Probe 5 µl NEM (5 mM) ohne MgCl₂ hinzugefügt (jeweils n=3). Die Proben wurden für 15 min bei 37 °C, 1000 rpm inkubiert (Thermomixer compact, Eppendorf). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 450 µl Stoppreagenz (10 ml Methanol/ BHT und 5 ml Chloroform/BHT) gestoppt und für ca. 10 Minuten ins Eis gestellt.

Dann wurden 150 µl Chloroform/ BHT und 220 µl 150 mM KCl (Lipidextraktion nach der Methode von Bligh und Dyer) hinzugegeben. Die Proben wurden 2 Minuten lang geschüttelt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur und 16000 g zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus). Die entstandene untere Phase der Probe (Chloroformphase) wurde in ein neues Gefäß überführt und mit Hilfe von Stickstoff zur Trockene eingedampft. Die Rückstände der Proben wurden in 100 µl Probelösemittel (n-Hexan-Isopropanol- Eisessig-Triethylamin: 50:50:1:0,8 v/v/v/v) gelöst, gemischt und in HPLC-Vials abgefüllt. Außerdem wurde eine Standardreihe (Tabelle 2) mit fluoreszenzmarkierter Phosphatidischer Säure und Probelösemittel angesetzt.

Mit Hilfe von Messwerten der Standardreihe wurde eine lineare Regression durchgeführt, welche der Berechnung bzw. Quantifizierung der Versuchsergebnisse diene.

HPLC-Separation und Quantifizierung:

Mittels einer Normal-Phase-HPLC (hydrophile stationäre Phase, weniger polare mobile Phase), sowie einer LiChrosphere-100-Diol-(5 µm) 250x4-mm-Säule (Merck) wurde die Lipidextraktion gemäß der leicht modifizierten Methode von Silversand und Haux vollendet [42].

2.2.2. Bestimmung der Gesamtaktivität der Phosphatidatphosphohydrolase sowie der Aktivität der Isoformen PAP1 und PAP2 in Rattenherzhomogenat

Untersuchungsmaterial:

Ein Rattenherz wurde in flüssigem Stickstoff mittels eines Mörsers und Pistells pulverisiert und in ein Homogenisationsmedium (0,1 mM HCl, 0,1 mM Titriplex III, 150 mM NaCl) überführt (Vers.-Nr.: 1/A29/04). Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 4°C, 1000 g (Hettich-Zentrifuge, Rotana 96 RC). Das entstandene Pellet wurde verworfen und der Überstand zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Es folgte eine Proteinbestimmung nach Lowry.

Versuchsaufbau:

2,6 µl Gesamthomogenat der Ratte mit einem Proteingehalt von 3 µg wurden mit 5 µl MAFP (1 µM), Tris-Puffer (20 mM Tris, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7,5) und 5 µl BODIPY-PA (10 µM) versetzt. Einer zweiten Probe wurden zusätzlich 5 µl MgCl₂ (5mM) und einer dritten Probe 5 µl NEM (5 mM) ohne MgCl₂ hinzugefügt (jeweils n=3). Die Proben wurden für 15 min bei 37 °C, 1000 rpm inkubiert (Thermomixer compact, Eppendorf). Es folgte eine Lipidextraktion nach Bligh und Dyer. Danach wurden die Proben zur Trockene eingedampft, die Rückstände, wie bereits beschrieben, in Probelösemittel gelöst und mittels HPLC gemessen.

2.2.3. Bestimmung der Gesamtaktivität der Phosphatidatphosphohydrolase sowie der Aktivität der Isoformen PAP1 und PAP2 in humanem Vorhofgewebe

Untersuchungsmaterial:

Humanes Vorhofgewebe wurde in flüssigem Stickstoff pulverisiert, in ein Homogenisationsmedium (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7,2) überführt und bei 14000 g, 4°C für 10 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge Sigma 202 M, Sigma Laborzentrifugen-GmbH). Der Überstand wurde zu je 110 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Es wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt.

Versuchsaufbau:

Der Versuchsaufbau entspricht den obigen Versuchen mit dem einzigen Unterschied, dass diesmal 2,3 µl eines Homogenats aus humanem Vorhofgewebe (4 µg Proteingehalt) anstelle eines Rattenherzgesamthomogenats verwendet wurden.

2.2.4. Bestimmung der Gesamtaktivität der Phosphatidatphosphohydrolase sowie der Aktivität der Isoformen PAP1 und PAP2 in Homogenaten aus humanem rechten Ventrikelgewebe (Biopsien)

Untersuchungsmaterial:

Zwei Biopsien aus humanem rechten Ventrikelgewebe (Gesamtgewicht der Stücke 5,5 mg) wurden in 500 µl Tris-Puffer (s. o.) mittels eines Mikromörser (Roth 0298.1) homogenisiert und 10 Minuten bei 14 000 g, 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge Sigma 202 MK, Sigma Laborzentrifugen-GmbH). Der Überstand wurde zu je 50 µl aliquotiert und bei -80° gelagert. Es folgte eine Proteinbestimmung nach Lowry.

Versuchsaufbau:

Der Versuchsaufbau entspricht den obigen Versuchen, allerdings wurden diesmal 6,9 µl Homogenat bzw. 6 µg Protein eingesetzt.

2.2.5. Bestimmung der Gesamtaktivität der Phosphatidatphosphohydrolase sowie der Aktivität der Isoformen PAP1 und PAP2 in Homogenaten aus humanem rechten Ventrikelgewebe der DCM- und Kontrollpatienten (Biopsien)

Untersuchungsmaterial:

Die Biopsien aus humanem rechten Ventrikelgewebe der Kontroll- und DCM-Patienten wurden in 300 µl Tris-Puffer (s. o.) mittels eines Mikromörser (Roth 0298.1) homogenisiert und 10 Minuten bei 14 000 g, 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge Sigma 202 MK, Sigma Laborzentrifugen-GmbH). Der Überstand wurde zu je 50 µl aliquotiert und bei -80° gelagert.

Es folgte eine Proteinbestimmung nach Lowry.

Versuchsaufbau:

Der Versuchsaufbau entspricht den obigen Versuchen mit dem Unterschied, dass 1 µg Protein je Biopsie eingesetzt wurde. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten.

2.3. Statistische Methoden

Die Daten werden als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten zweier Gruppen wurden statistisch mithilfe des Student's t-test evaluiert. t-Werte mit $p < 0,05$ gelten dabei als statistisch signifikant.

2.4. Liste der verwendeten Chemikalien

Adenosintriphosphat (ATP)	5`-ATP-Na ₂ , Sigma A7699
4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-pentanoic acid (BODIPY FL C5)	Molecular Probes D3834
2-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-pentanoyl)-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphate, diammonium salt (β-BODIPY FL C5-HPA bzw. BODIPY-PA)	Molecular Probes D3815
2-decanoyl-1-(O-(11-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-propionyl)amino)undecyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (BODIPY-PC)	Molecular Probes D3771
Bovine Serum Albumin/ Rinderserumalbumin (BSA)	lyophilized, Protein Assay Standard II, Bio-Rad 500-0007
Butylated hydroxytoluene (BHT)	Sigma B-1378
Cardiolipin (bovine heart)	Sigma C1649
Chloroform	für die HPLC, Sigma 52,872-2
Diazylglycerolkinase (DAG-Kinase)	Calbiochem 494459
Diethylenetriamine-pentaacetic acid (DETAPAC)	Sigma D6518
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma D-4540
Dithiotreitol (DTT)	Cleland`s Reagent/ Sigma D 0632
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Tetrasodium salt: Dihydrat, Sigma ED4SS
Ethylenediaminetetraacetic acid, Titriplex III (EDTA)	Merck
Ethylene glycol-bis(beta-aminoethylether)-N, N, N',N'- tetraacetic acid Titriplex IV (EGTA)	Merck 1.08491.0010

Essigsäure	konzentriert, zur Analyse, Merck 1.00063.2500
(N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N ⁻ - (2-ethanesulfonic acid)) (HEPES)	Sigma H-4034
Imidazol-HCl	Sigma 43,615-1
Kaliumchlorid (KCl)	Merck 1.04936.0500
Methylarachnoidylfluorophosponat (MAFP)	Calbiochem 454565
Methanol	J.T. Baker 8402
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ *6H ₂ O)	Merck 1.05833.0250
Natriumchlorid (NaCl)	zur Analyse, Merck 1.06404.1000
n-Ethylmaleimid (NEM)	Sigma 12,828-7
n-Hexan	zur Chromatographie, Merck 1.04391.2500
Octyl-beta-D-glucopyranoside	Calbiochem, 494459
1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phospho-(1-D-myoinositol 4,5 bisphosphate) (L- α -Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat bzw. PIP ₂)	Sigma P-9763
2-Propanol, zur Chromatographie	Merck 1.01040.2500
Reagenz A/B/S	Bio-Rad 500-0116
Triethylamin	Fluka 90337
TRIZMA-Base	Sigma T-6066
TRIZMA-HCL	Sigma
Triton X-100	Fluka 93426
Wasser	zur Chromatographie, J.T. Baker 4218

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

3. Ergebnisse

3.1. Entwicklung und Anwendung des Phosphatidatphosphohydrolase-Assays

Messung der Phosphatidatphosphohydrolase-Aktivität:

Mit dem Ziel, die Gesamtaktivität der Phosphatidatphosphohydrolase (PAP) in Rattenherzmembranen zu bestimmen, wurden 30 μl Trispuffer (20 mM Tris-Base, 2 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM DTT, pH 7,5) mit 5 μl BODIPY-PA (10 μM), 5 μl DMSO und 10 μl Membranen (10 μg Protein) für 60 min in einem Thermoschüttler (Thermomixer compact, Eppendorf) bei 37°C und 1000 rpm inkubiert. Gleichzeitig wurden 40 μl Trispuffer mit 5 μl BODIPY-PA (10 μM) und 5 μl DMSO ohne Rattenherzmembranen als Blindwert inkubiert. Es folgte eine Lipidextraktion nach Bligh und Dyer sowie die Messung der PAP-Aktivität mittels HPLC.

Spannung [V]

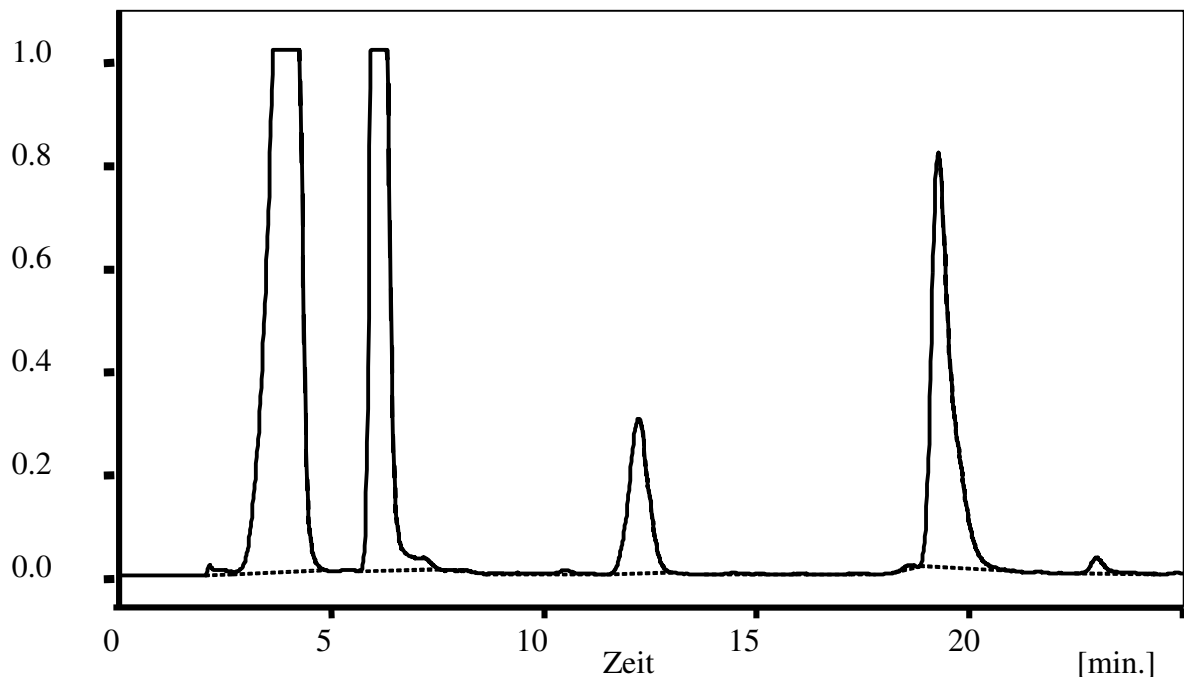


Abbildung 4: 30 μ l Trispuffer (20 mM Tris-Base, 2 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM DTT, pH 7,5) wurden mit 5 μ l BODIPY-PA (10 μ M), 5 μ l DMSO und 10 μ l Membranen (10 μ g Protein) für 60 min in einem Thermoschüttler (Thermomixer compact, Eppendorf) bei 37°C und 1000 rpm inkubiert. Es folgte eine Lipidextraktion nach Bligh und Dyer sowie die Messung der PAP-Aktivität mittels HPLC.

Die HPLC-Messung zeigte jeweils einen Peak nach 4, 6, 12 und 20 Minuten (Abbildung 4).

3.1.1. Peak-Identifizierung

Mittels der HPLC wurden Proben untersucht, die ausschließlich BODIPY-markierte Phosphatidische Säure (B-PA) in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen enthielten. In den dazugehörigen Chromatogrammen bildete sich ein je nach B-PA-Konzentration unterschiedlich hoher Peak bei 20 Minuten ab. Somit entspricht der 20-Minuten-Peak der BODIPY-markierten Phosphatidischen Säure, welche bei der Messung der PAP-Aktivität als Substrat verwendet wurde.

Peakidentifizierung mit Hilfe von BODIPY FL C5:

Neben der Phosphatidatphosphohydrolase (PAP) nutzt auch Phospholipase A2 (PLA2) die phosphatidische Säure (PA) als Substrat. Bei der enzymatischen Spaltung von BODIPY-markierter phosphatidischer Säure (B-PA) mittels PLA2 entsteht Lysophosphatidische Säure (LPA), welche nicht BODIPY-markiert und deshalb bei der Fluoreszenzmessung nicht sichtbar ist, und eine BODIPY-markierte bzw. fluoreszenzmarkierte Fettsäure, welche als BODIPY FL C5-Fettsäure-Standard erhältlich ist (Abbildung 5).

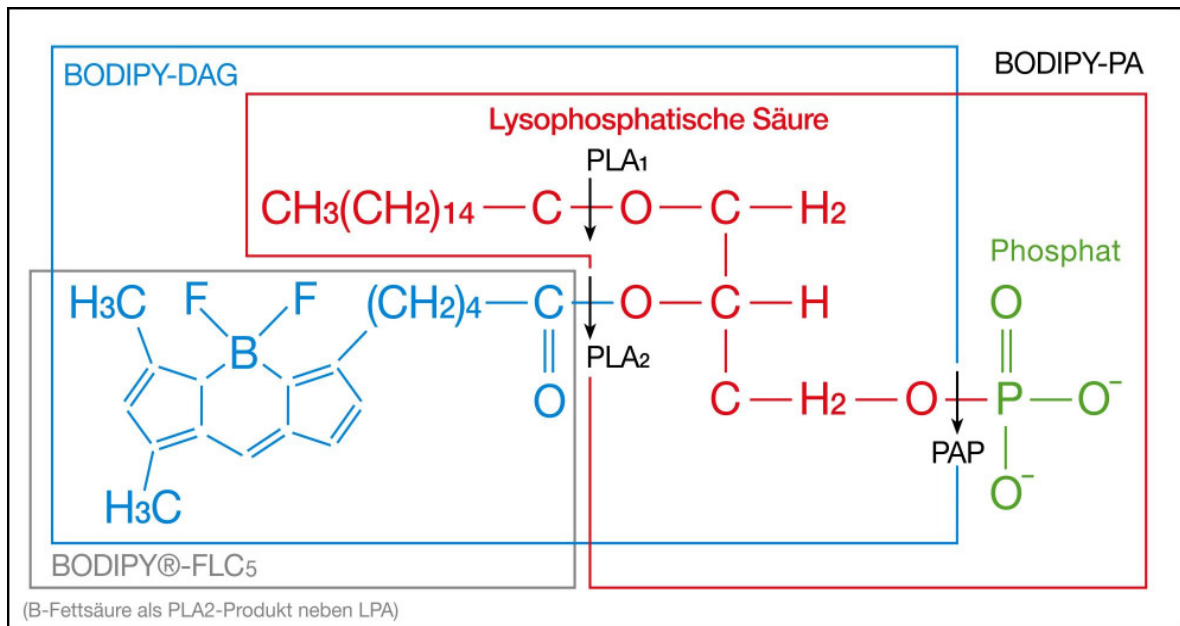


Abbildung 5: BODIPY-DAG: fluoreszenzmarkiertes Diazylglyzerol; BODIPY-PA: fluoreszenzmarkierte Phosphatidische Säure; PLA₁: Phospholipase A₁; PLA₂: Phospholipase A₂, PAP: Phosphatidatphosphohydrolase; schwarzer Pfeil: Angriffspunkt des jeweiligen Enzyms am BODIPY-PA-Molekül

Um herauszufinden, welcher der abgebildeten Peaks Ausdruck der Entstehung dieser BODIPY-markierten Fettsäure ist, lösten wir 320 mg BODIPY FL C5 in 0,5 ml Methanol, sodass wir eine 2 M Stammlösung erhielten. Mittels HPLC wurde eine Konzentrationen von 5 nmol BODIPY FL C5 in Probelösemittel gemessen und das Ergebnis aufgezeichnet (Abbildung 6).

Spannung [V]

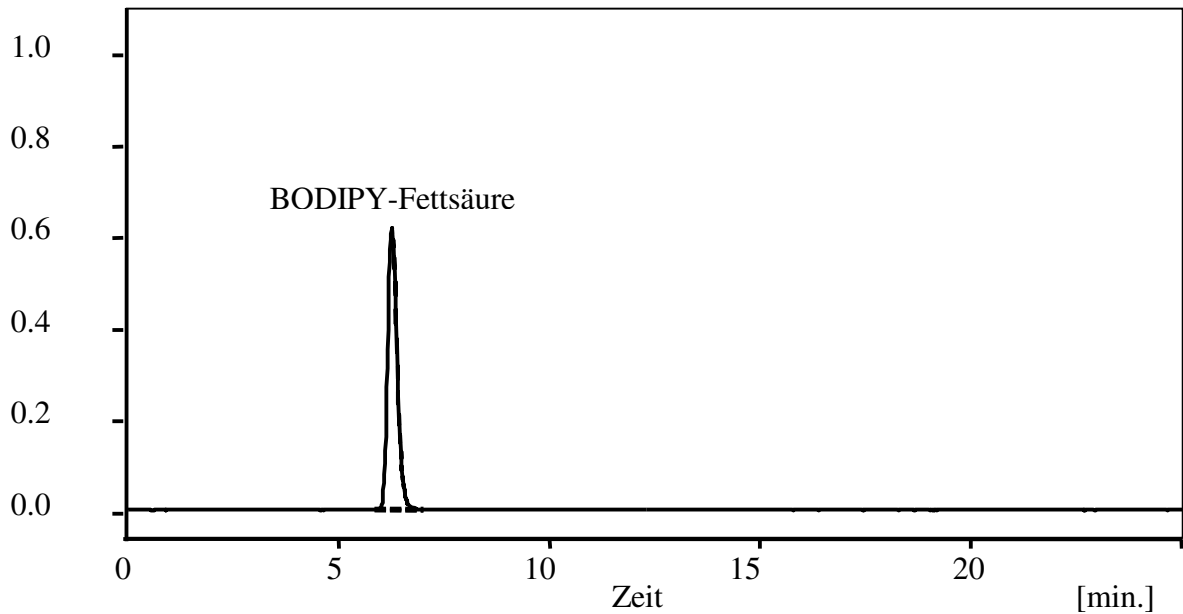


Abbildung 6: BODIPY-Fettsäure (BODIPY FL C5) wurde in Probelösemittel gelöst, mittels HPLC gemessen und in Form eines Peaks aufgezeichnet. Der entstandene Peak bei 6 Minuten entspricht einer BODIPY-Fettsäure-Konzentration von 5 nmol.

Es bildete sich ein Peak bei 6 Minuten ab.

Wir wiederholten die Messung der Gesamtaktivität der Phosphatidatphosphohydrolase (PAP) in Rattenherzmembranen in Anwesenheit von Methylarachnoidylfluorophosphonat (MAFP), einem selektiven Inhibitor der Kalzium-abhängigen und Kalzium-unabhängigen Phospholipase A2-Aktivität:

10 μg MAFP wurden in 2,7 ml DMSO gelöst, sodass wir eine 10 μM Stammlösung erhielten. Davon wurden 5 μl mit 30 μl Trispuffer (20 mM Tris-Base, 2 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM DTT, pH 7,5), 5 μl BODIPY-PA (10 μM) und 10 μl Membranen mit 10 μg Protein für 60 min in einem Thermoschüttler (Thermomixer compact, Eppendorf) bei 37°C, 1000 rpm, inkubiert.

Gleichzeitig wurden 30 μl Trispuffer mit 5 μl BODIPY-PA, 5 μl DMSO (ohne MAFP) und 10 μl Membranen, welche ebenfalls 10 μg Protein enthielten, inkubiert sowie ein Blindwert mit 40 μl Trispuffer, 5 μl BODIPY-PA und 5 μl DMSO.

Nach der Inkubation wurde mit den Proben so verfahren, wie bereits im obigen Absatz über die Messung der Phosphatidatphosphohydrolase-Aktivität beschrieben.

Spannung [V]

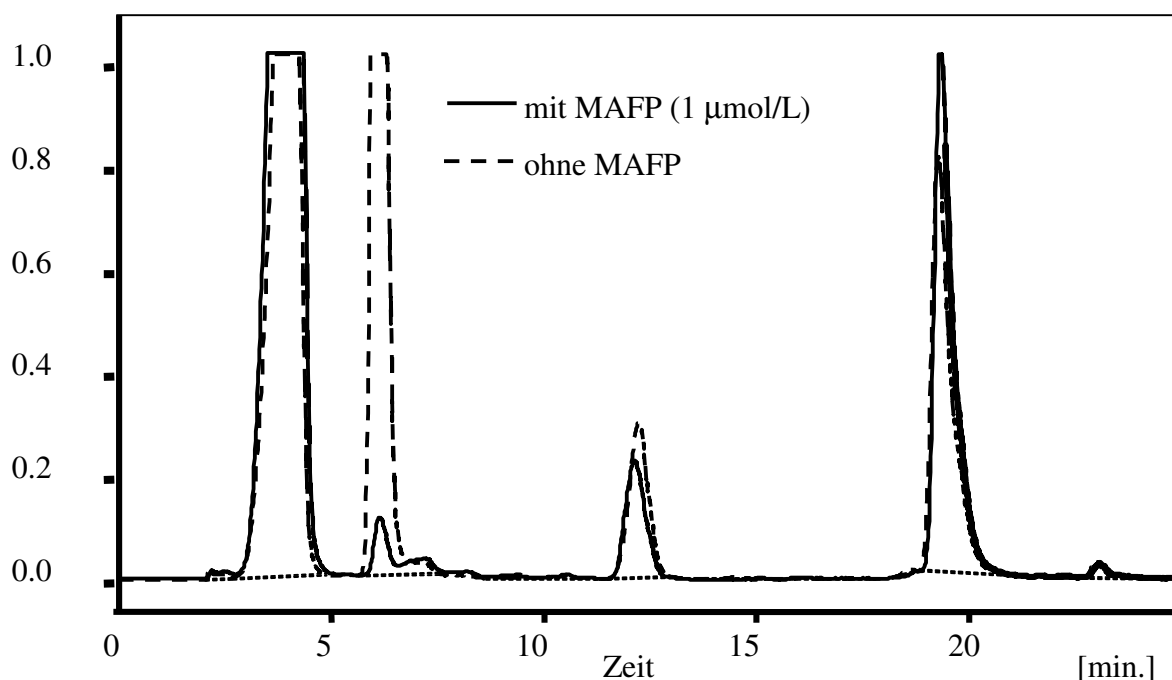


Abbildung 7: PAP-Versuch ohne und mit MAFP als Inhibitor der Phospholipase A2-Aktivität.

Ohne MAFP: 30 µl Trispuffer (20 mM Tris-Base, 2 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM DTT, pH 7,5) wurden mit 5 µl BODIPY-PA (10 µM), 5 µl DMSO (ohne MAFP) und 10 µl Membranen (10 µg Protein) für 60 min in einem Thermoschüttler (Thermomixer compact, Eppendorf) bei 37°C und 1000 rpm inkubiert.

Mit MAFP: 5 µl MAFP (10 µM) wurden mit 30 µl Trispuffer (20 mM Tris-Base, 2 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM DTT, pH 7,5), 5 µl BODIPY-PA (10 µM) und 10 µl Membranen (10 µg Protein) für 60 min in einem Thermoschüttler (Thermomixer compact, Eppendorf) bei 37°C und 1000 rpm inkubiert. Es folgte jeweils eine Lipidextraktion nach Bligh und Dyer sowie die Messung der PAP-Aktivität mittels HPLC.

Der Versuch zeigte in den MAFP-haltigen Proben eine Zunahme des 4-Minuten-Peaks bei gleichzeitiger Abnahme des 6-Minuten-Peaks. In den Proben ohne MAFP verhielt es sich genau umgekehrt (Abbildung 7).

Aufgrund der Versuchsergebnisse ist der Peak, welcher sich nach 20 Minuten abbildete, BODIPY-PA zuzuordnen. Der 6-Minuten-Peak entspricht der BODIPY-Fettsäure, welche während der Konversion von B-PA zu LPA mittels PLA2 entsteht und dessen Bildung durch Anwesenheit von MAFP als PLA2-Inhibitor gehemmt werden kann. Der Peak bei 4 Minuten wird somit durch die PAP-vermittelte Bildung von BODIPY-DAG verursacht. Der DAG-Peak nahm im Versuch unter MAFP-Einfluss zu, weil PA unter PLA2-Inhibition vermehrt zu BODIPY-markiertem DAG umgewandelt wurde.

Gleichzeitig nahm der 6-Minuten-Peak ab, weil die Konversion von B-PA zu LPA und der BODIPY-Fettsäure gehemmt wurde. Der Peak bei 12 Minuten konnte nicht weiter identifiziert werden und repräsentiert eine Kontamination des BODIPY-PA-Standards durch eine Substanz, welche in Anwesenheit myokardialer Membranen nicht reagiert. Dieser Versuch wurde mit einem Trispuffer ohne DTT (20 mM Tris-Base, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7,5) wiederholt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit bzw. Abwesenheit von DTT keinen Einfluss auf die PLA2-Aktivität hat.

Diacylglycerol-Kinase-Assay:

Der endgültige Beweis dafür, dass der Peak bei 4 Minuten tatsächlich BODIPY-DAG abbildet, sollte eine Reaktionsumkehr erbringen. PA wird mittels PAP zu DAG und Phosphat umgewandelt. Ebenso gibt es die Möglichkeit der umgekehrten Reaktion mittels des Enzyms DAG-Kinase, welches die Fähigkeit besitzt, DAG wieder in Phosphatidische Säure umzuwandeln. Wir machten uns diese Eigenschaft zunutze, indem wir 35 µl Trispuffer (ohne DTT, s. o.) mit 5 µl BODIPY-PA (10 µM) und 10 µl Rattenherzmembranen mit 10 µg Protein/ 10 µl für 60 min inkubierten. Nach der Inkubation wurde mit den Proben so verfahren, wie bereits im obigen Absatz beschrieben. Während des HPLC-Laufes wurden die Flüssigkeiten, welche während der Peak-Entstehung bei 4 und bei 6 Minuten die Chromatographiesäule und den Lichtstredetektor durchliefen, getrennt gesammelt und unter flüssigem Stickstoff zur Trockene eingedampft.

Durchführung des DAG-Kinase-Assays :

30 µl Cardiolipin (25 mg/ml) wurde mit 100 µl 1 mM DETAPAC (Diethylenetriamine-pentaacetic acid) und 30 µl 825 mM Octyl-beta-D-glucopyranoside versetzt. Außerdem wurde Reaktionspuffer (100 mM NaCl, 100 mM Imidazol-HCl, 2 mM EDTA, 25 mM MgCl₂*H₂O, pH 6,6) mit 10 µl 100 mM DTT, 5 µl 100 mM ATP, 50 µl ddH₂O und 25 µl DAG-Kinase (1mg/ml) versetzt. Beide Ansätze wurden miteinander vermischt und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. 100 µl dieses Gemisches wurden jeweils zu der eingedampften 4- bzw. 6-Minuten-Probe gegeben und für 30 min bei 25°C inkubiert.

Anschließend wurde die Konversions-Reaktion mittels CHCl₃-KCl-Lösung gestoppt, das entstandene BODIPY-markierte Produkt nach der Methode von Bligh und Dyer extrahiert und mittels HPLC gemessen.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Versuch einer Konversion von B-DAG zu B-PA mittels DAG-Kinase in der 4-Minuten-Probe erfolgreich war (Abbildung 8), während in der 6-Minuten-Probe keine Umsetzung stattgefunden hat (Abbildung 9). Dieser Versuch beweist, dass der Peak bei 4 Minuten das entstandene B-DAG abbildet.

Spannung [V]

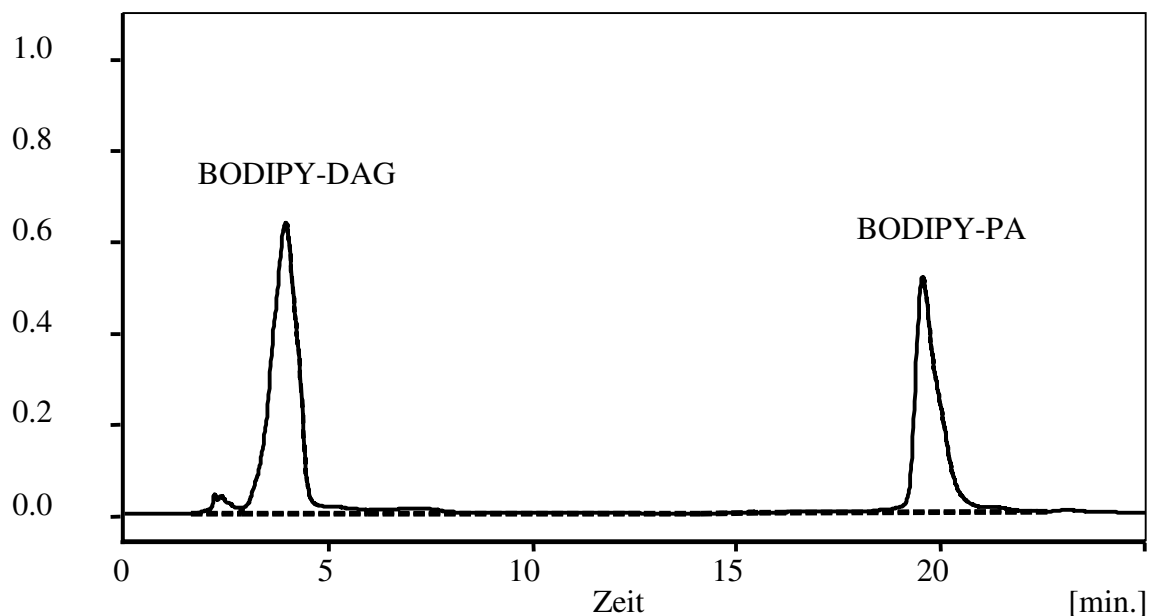


Abbildung 8: Erfolgreiche Umwandlung von BODIPY-DAG in BODIPY-PA mittels des Enzyms DAG-Kinase.

Spannung [V]

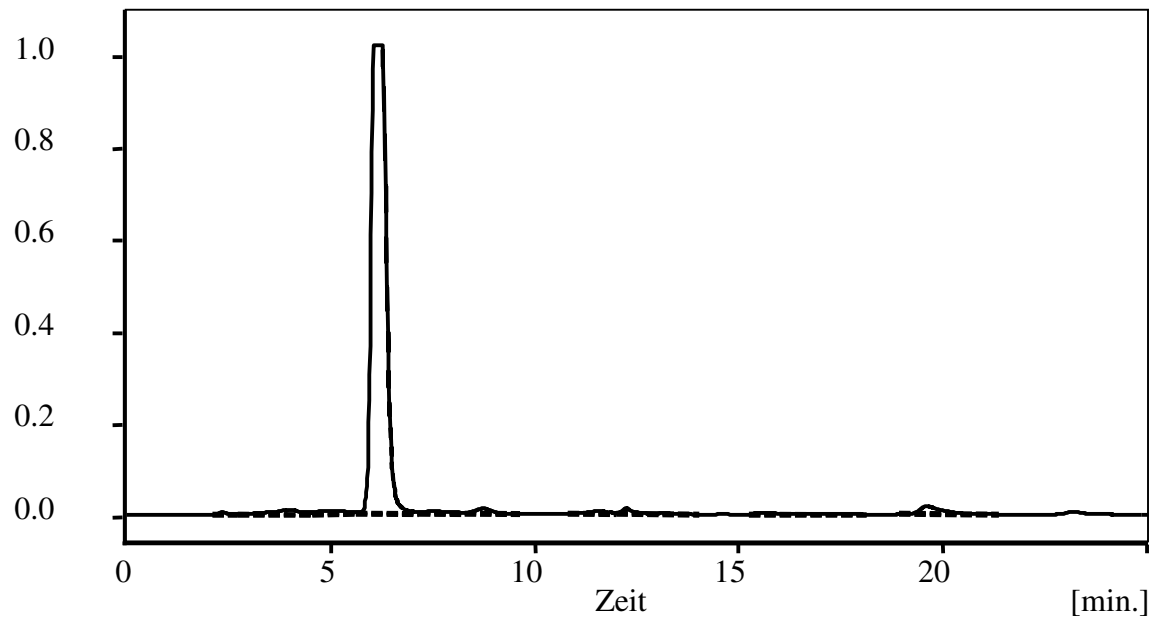


Abbildung 9: Unter Anwendung des DAG-Kinase-Assays blieb der Peak bei 6 Minuten unverändert. Eine Bildung von BODIPY-markierter Phosphatidischer Säure (BODIPY-PA) fand nicht statt.

3.1.2. Validierung

3.1.2.1. Bildung von BODIPY-Diazylglycerol in Rattenherzmembranen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

2 µl Rattenherzmembranen (2 µg Protein) wurden mit 5 µl MAFP, 5 µl BODIPY-PA und 38 µl Tris-Puffer (ohne DTT) bei 37°C und 1000 rpm in einem Thermoschüttler inkubiert (Gesamtvolumen jeder Probe: 50 µl). Die Inkubationszeiten betragen: 0, 5, 10, 15, 20, 25 und 30 Minuten (jeweils n = 3). Nach der Inkubation wurde mit den Proben so verfahren, wie bereits im obigen Absatz über die Messung der Phosphatidatphosphohydrolase-Aktivität beschrieben. Die quantitative Messung des gebildeten BODIPY-DAG erfolgte mittels HPLC. Mit Hilfe von Messwerten einer BODIPY-PA-Standardreihe wurde eine lineare Regression durchgeführt, welche der Berechnung bzw. Quantifizierung der Versuchsergebnisse diente.

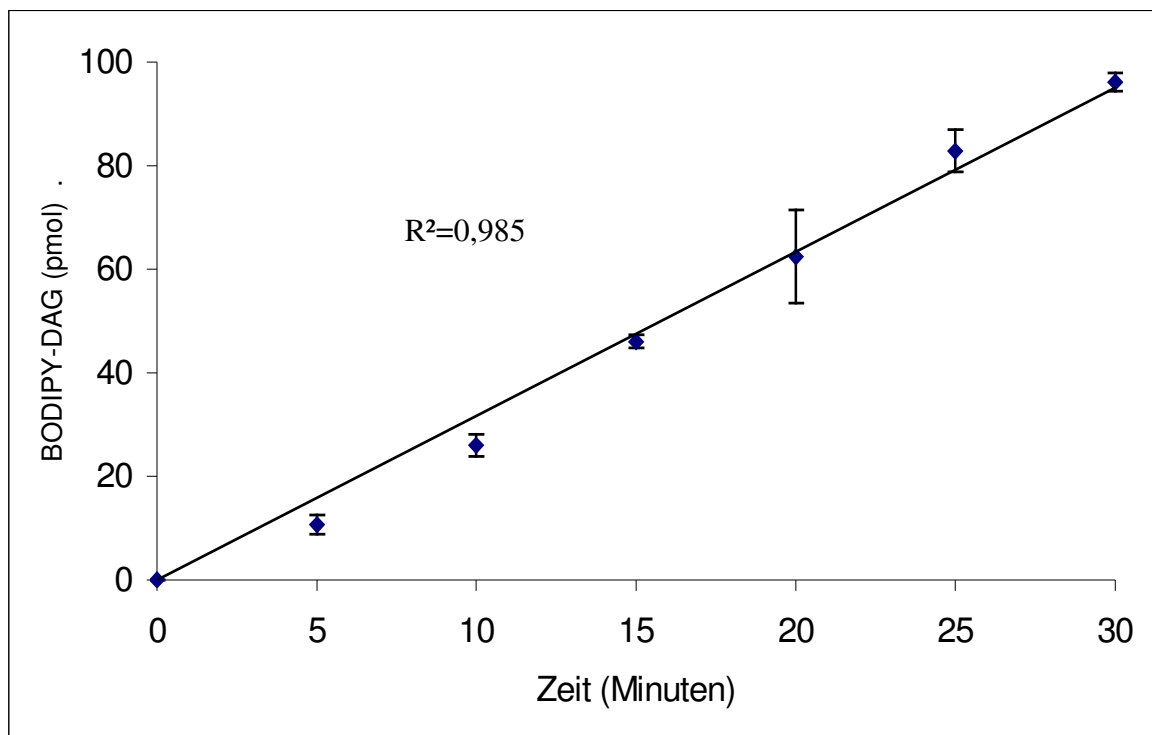


Abbildung 10: Bildung von fluoreszenzmarkiertem Diazylglycerol (BODIPY-DAG) in Rattenherzmembranen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Die Inkubationszeiten betragen 0-30 Minuten bei Einsatz von 2 µg Membranprotein. Die quantitative Messung von gebildetem BODIPY-DAG erfolgte mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion. Gezeigt sind Mittelwerte +/- SD (jeweils n=3); R^2 : Korrelationskoeffizient

Mit Verlängerung der Inkubationszeit kommt es zu einer Steigerung der PAP-Aktivität mit linearer Steigerung der BODIPY-DAG-Produktion (Abbildung 10). Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,985 (n=3).

3.1.2.2. Bildung von BODIPY-DAG in Rattenherzmembranen in Abhängigkeit von der Menge des eingesetzten Membranproteins

0, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4 und 8 μg Membranprotein von Rattenherzmembranen wurde jeweils mit 5 μl BODIPY-PA und 5 μl MAFP sowie Trispuffer versetzt, sodass jede Probe ein Gesamtvolumen von 50 μl aufwies.

Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Es wurde mit den Proben wie bisher verfahren.

Mit Hilfe von Messwerten der BODIPY-PA-Standardreihe wurde eine lineare Regression durchgeführt, welche der Berechnung bzw. Quantifizierung der Versuchsergebnisse diente.

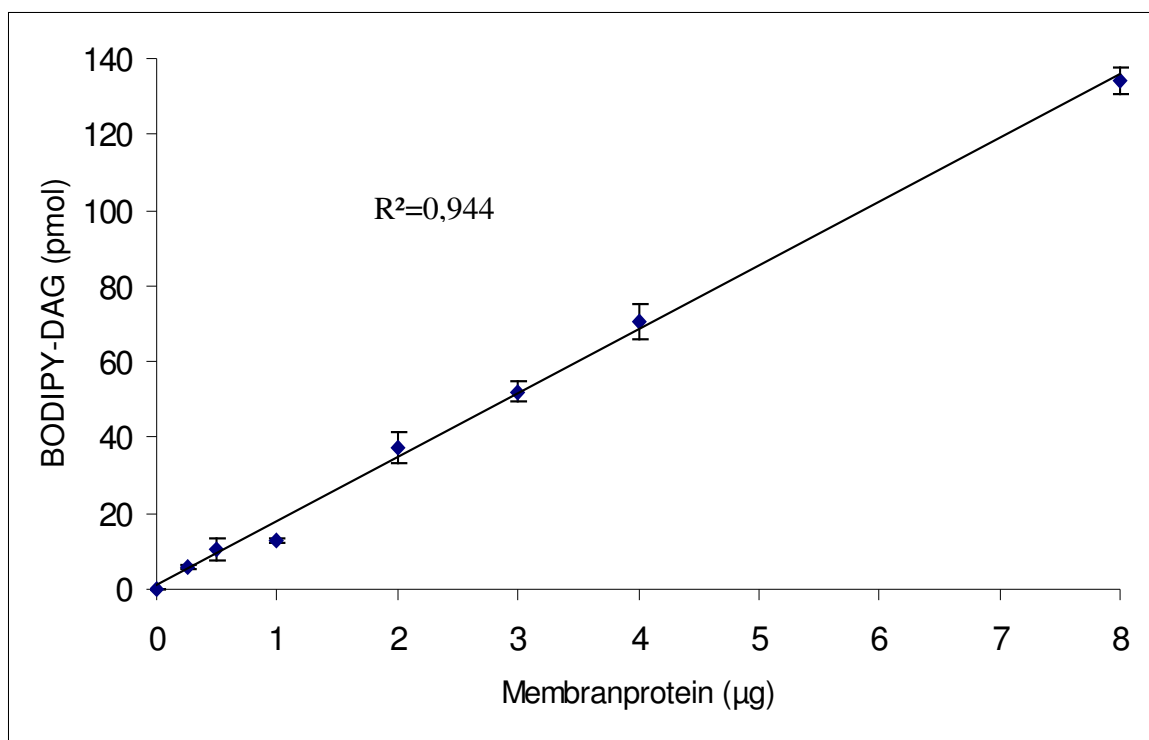


Abbildung 11: Bildung von fluoreszenzmarkiertem Diazylglyzerol (BODIPY-DAG) in Rattenherzmembranen in Abhängigkeit von der Menge des eingesetzten Membranproteins. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten bei Einsatz von 0-8 μg Membranprotein. Die quantitative Messung von gebildetem BODIPY-DAG erfolgte mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD (jeweils $n=3$);

R^2 : Korrelationskoeffizient

Mit kontinuierlicher Erhöhung des eingesetzten Membranproteins von 0 auf 8 μg (jeweils $n=3$) kommt es zu einer Steigerung der PAP-Aktivität mit linearem Anstieg der BODIPY-DAG-Konzentration (Abbildung 11). Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,944 ($n=3$).

3.1.2.3. Optimierung des Assays unter Berücksichtigung der Versuchsergebnisse

Basierend auf den Versuchsergebnissen der Peakidentifizierung und Validierung des Phosphohydrolase-Assays wurde die Messung der Gesamtaktivität der Phosphatidatphosphohydrolase (PAP) in Rattenherzmembranen unter optimierten Bedingungen wiederholt. 10 µl Rattenherzmembranen (2 µg Protein), 5 µl BODIPY-PA (10 µM) und 30 µl Tris-Puffer (pH 7,5) wurden in Anwesenheit von 5 µl MAFP (1 µM) 30 Minuten bei 37°C und 1000 rpm (Thermomixer compact, Eppendorf) inkubiert. Es folgte eine Lipidextraktion nach Bligh und Dyer sowie die Messung der PAP-Aktivität mittels HPLC (Abbildung 12).

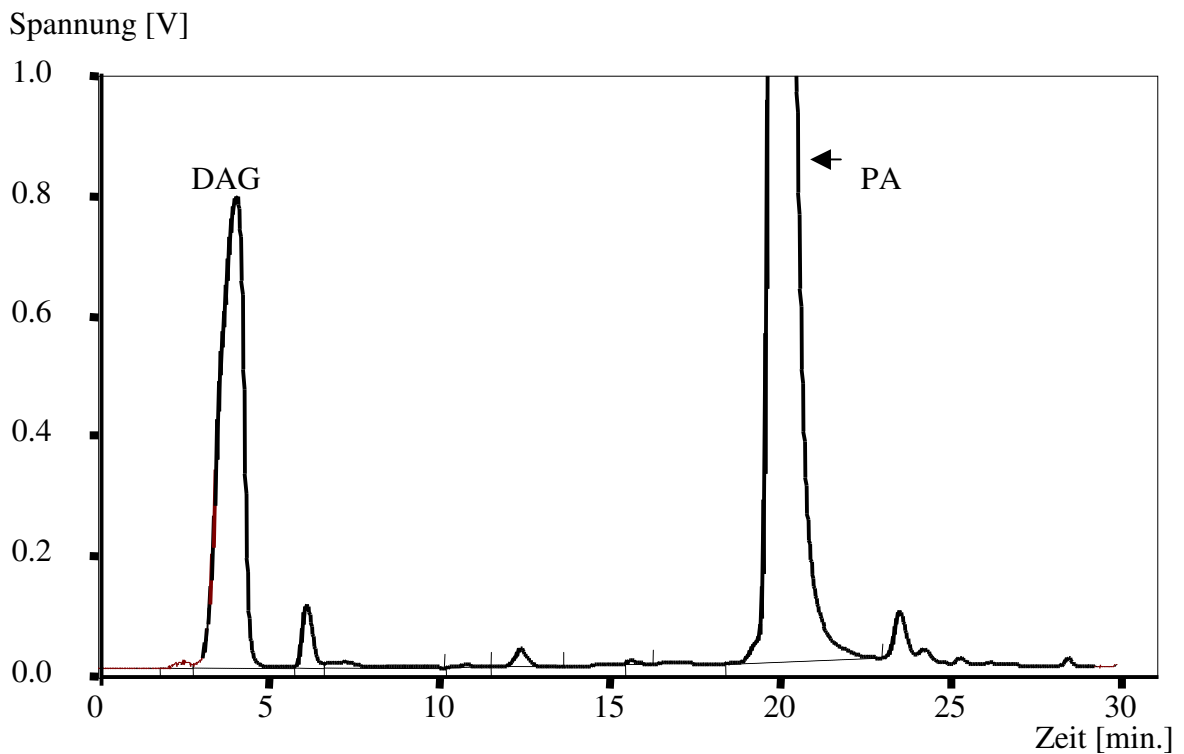


Abbildung 12: 10 µl Rattenherzmembranen (2 µg Protein) wurden in Anwesenheit von 5 µl MAFP (1 µM), 5 µl BODIPY-PA (10 µM) und 30 µl Tris-Puffer (pH 7,5) 30 Minuten bei 37°C und 1000 rpm (Thermomixer compact, Eppendorf) inkubiert. Es folgte eine Lipidextraktion nach Bligh und Dyer sowie die Messung der PAP-Aktivität mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion.

3.1.3. Aktivität der Phosphatidatphosphohydrolase in Rattenherzmembranen

Wir untersuchten die PAP-Gesamtaktivität sowie die Aktivität der beiden Isoenzyme PAP1 und PAP2 unter Anwendung des PAP-Assays in Proben von Rattenherzmembranen, welche vor der Messung mit $MgCl_2$ oder N-Ethylmaleimid (NEM) versetzt und inkubiert wurden. Magnesium wurde mit dem Ziel dazu gegeben, die Mg^{2+} -abhängige PAP1-Isoform zusätzlich zur PAP2-Aktivität zu stimulieren, um die maximale bzw. totale PAP-Aktivität messen zu können. NEM hingegen hemmt die Aktivität von PAP1, welche empfindlich gegenüber Sulfhydrylreagenzien ist, sodass die unter NEM-Einfluss gemessene PAP-Aktivität der PAP2-Aktivität entspricht. Die Messungen ergaben eine totale PAP-Aktivität von 72,96 nmol/h/mg (Abbildung 13). Nach Zugabe von NEM betrug die gemessene PAP-Aktivität 65,63 nmol/h/mg. Subtrahiert man die unter NEM-Einfluss gemessene PAP2-Aktivität von der totalen Enzym-Aktivität, erhält man den Anteil der in den Membranproben enthaltenen PAP1-Aktivität. Diese fiel, im Vergleich zur PAP2-Aktivität, gering aus (PAP1: 7,33 nmol/h/mg, PAP2: 65,63 nmol/h/mg). Ca. 10 % der totalen PAP-Aktivität in den Rattenherzmembranen entsprechen einer PAP1-Aktivität, die restlichen 90 % einer PAP2-Aktivität.

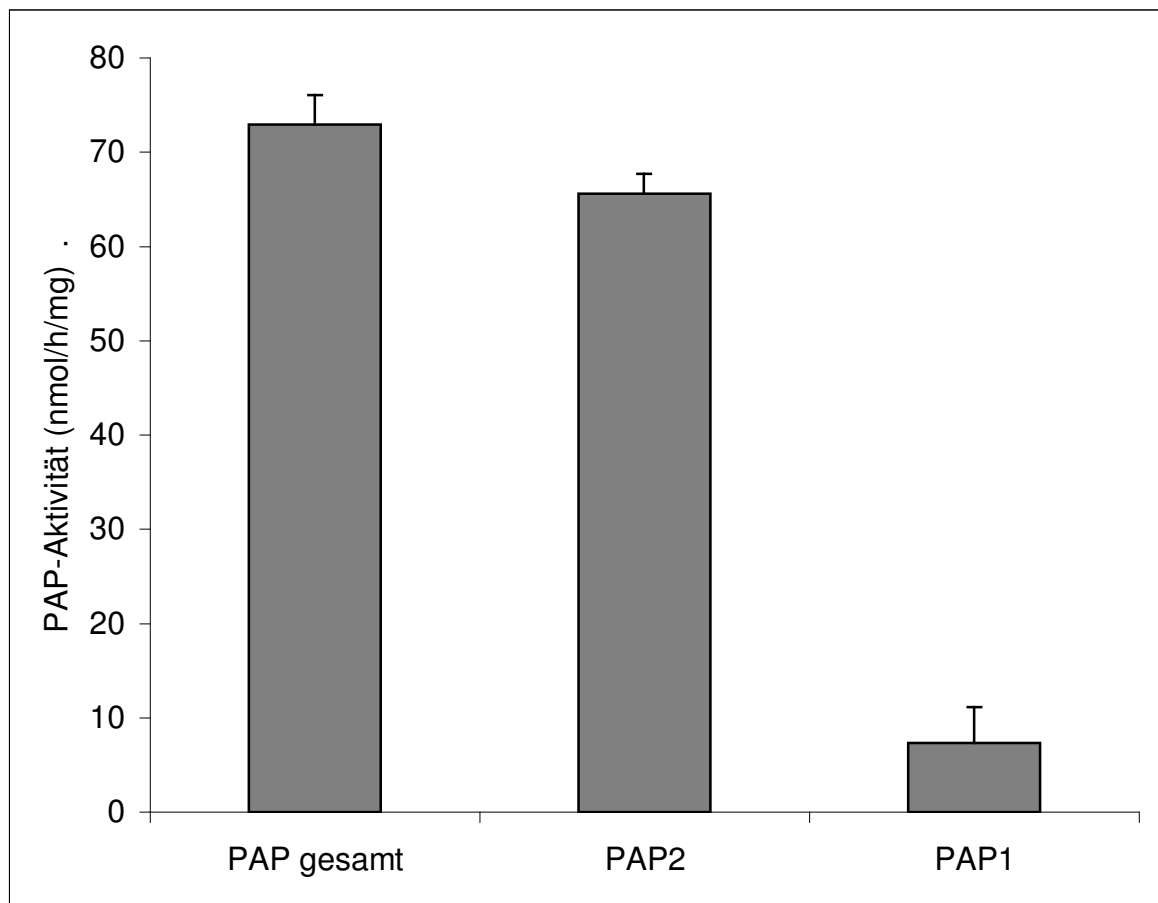


Abbildung 13: Eine Probe mit 10 μ l Rattenherzmembranen und einem Proteingehalt vom 2 μ g wurde mit 5 μ l MAFP (1 μ M), Tris-Puffer (20 mM Tris-Base, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7,5) und 5 μ l BODIPY-PA (10 μ M) versetzt. Einer zweiten Probe wurden zusätzlich 5 μ l MgCl₂ (5 mM) und einer dritten Probe 5 μ l NEM (5 mM) ohne MgCl₂ hinzugefügt (jeweils n=3). Die Proben wurden für 15 min bei 37 °C, 1000 rpm inkubiert (Thermomixer compact, Eppendorf). Es folgte eine Lipidextraktion nach Bligh und Dyer sowie die Messung der PAP-Aktivität mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion.

3.1.4. Aktivität der Phosphatidatphosphohydrolase in Rattenherzhomogenat

Die Messung der PAP-Aktivität in Rattenherzhomogenat zeigt eine PAP-Gesamtaktivität von 5,70 nmol/h/mg (Abbildung 14). Ca. 75 % dieses gemessenen Wertes (4,23 nmol/h/mg) entsprechen der PAP2-Aktivität, die restlichen 25 % (1,47 nmol/h/mg) der PAP1-Aktivität.

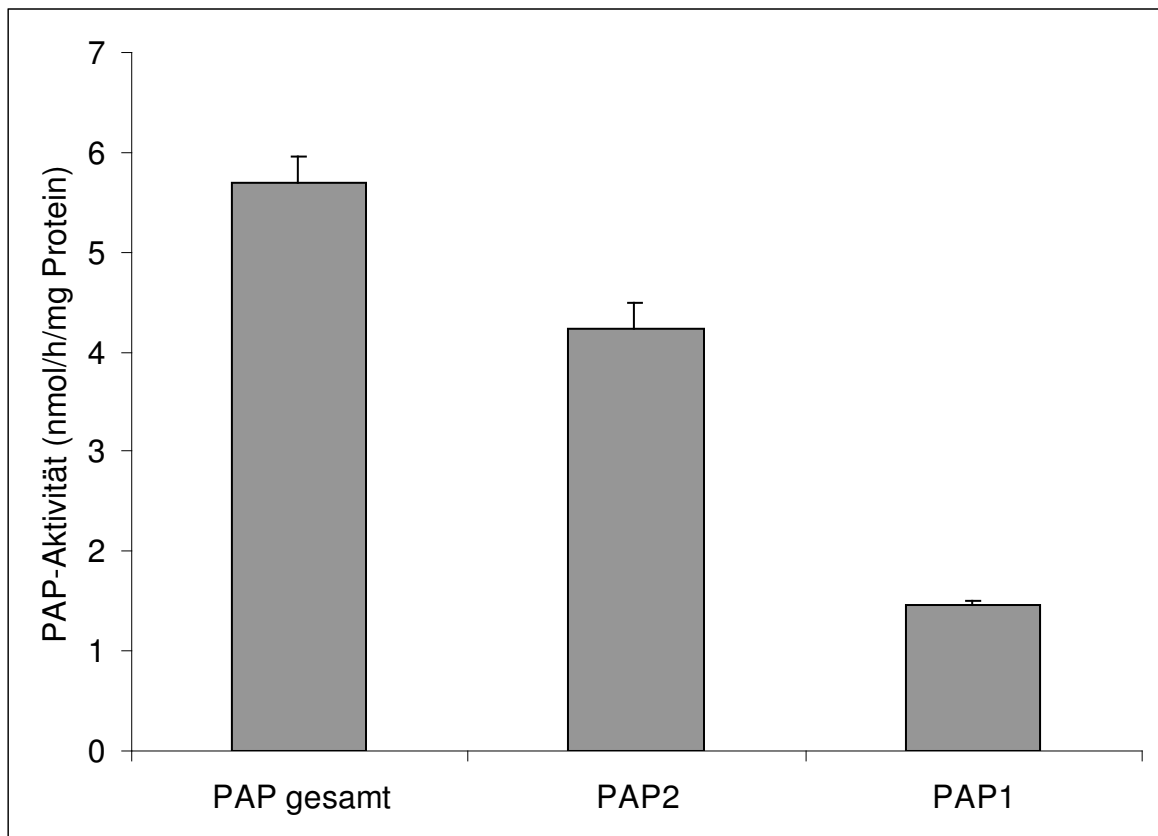


Abbildung 14: 2,6 μ l Gesamthomogenat der Ratte mit einem Proteingehalt von 3 μ g wurden mit 5 μ l MAFP (1 μ M), Tris-Puffer (20 mM Tris, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7,5) und 5 μ l BODIPY-PA (10 μ M) versetzt. Einer zweiten Probe wurden zusätzlich 5 μ l MgCl₂ (5mM) und einer dritten Probe 5 μ l NEM (5 mM) ohne MgCl₂ hinzugefügt (jeweils n=3). Die Proben wurden für 15 min bei 37 °C, 1000 rpm inkubiert (Thermomixer compact, Eppendorf). Es folgte eine Lipidextraktion nach Bligh und Dyer sowie die Messung der PAP-Aktivität mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion.

3.1.5. Aktivität der Phosphatidatphosphohydrolase in humanem Vorhofgewebe

Wir untersuchten die PAP-Aktivität in Gewebe-Proben des humanen Vorhofs. Nach Zugabe von MgCl fand sich in den Homogenaten eine totale PAP-Aktivität von 23,33 nmol/h/mg (Abbildung 15). Unter Einfluss von NEM betrug die gemessene PAP2-Aktivität 24,37 nmol/h/mg. Die Zugabe von MgCl führte zu einer leichten Erhöhung der PAP-Aktivität, während sich nach NEM-Zusatz keine nennenswerte Aktivitätsänderung fand. Somit konnte keine PAP1-Aktivität in humanem Vorhofgewebe nachgewiesen werden.

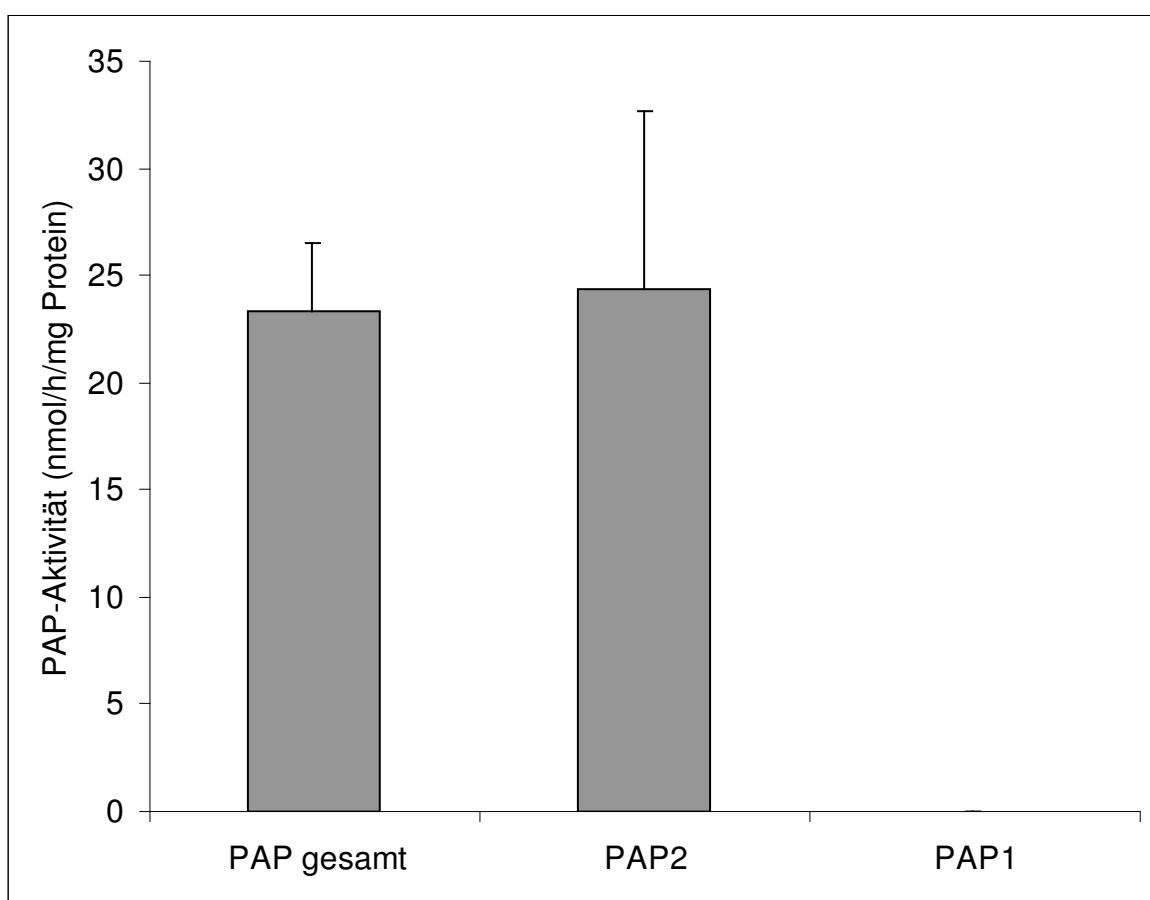


Abbildung 15: 2,3 μ l eines Homogenats aus humanem Vorhofgewebe mit einem Proteingehalt von 4 μ g wurden mit 5 μ l MAFP (1 μ M), Tris-Puffer (20 mM Tris, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7,5) und 5 μ l BODIPY-PA (10 μ M) versetzt. Einer zweiten Probe wurden zusätzlich 5 μ l MgCl₂ (5mM) und einer dritten Probe 5 μ l NEM (5 mM) ohne MgCl₂ (jeweils n=3) hinzugefügt. Die Proben wurden für 15 min bei 37 °C, 1000 rpm inkubiert (Thermomixer compact, Eppendorf). Es folgte eine Lipidextraktion nach Blich und Dyer sowie die Messung der PAP-Aktivität mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion.

3.1.6. Aktivität der Phosphatidatphosphohydrolase in humanem rechten Ventrikelgewebe

Wir untersuchten die PAP-Aktivität in Homogenaten, welche zuvor aus Biopsien des humanen rechten Ventrikels hergestellt wurden. Die gemessene totale PAP-Aktivität betrug 43,08 nmol/h/mg (Abbildung 16). Unter Zusatz von NEM wurde eine PAP2-Aktivität von 35,73 nmol/h/mg gemessen. Somit ergab sich eine PAP1-Aktivität von 7,35 nmol/h/mg. Vergleicht man die PAP-Aktivität des humanen rechten Ventrikelgewebes mit der PAP-Aktivität im humanen Vorhof, zeigt sich eine bedeutend höhere Aktivität der Phosphatidatphosphohydrolase im Ventrikelgewebe.

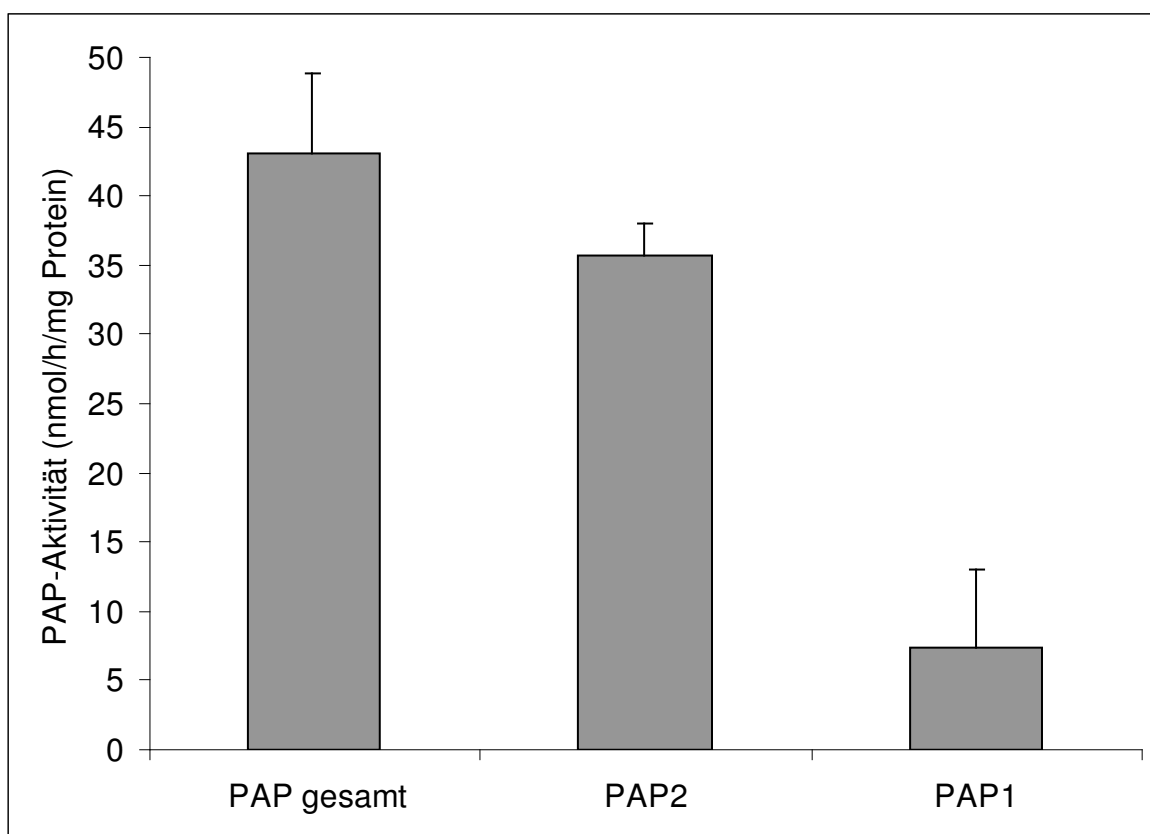


Abbildung 16: 6,9 μ l eines Homogenats aus humanem rechten Ventrikelgewebe mit einem Proteingehalt von 6 μ g wurden mit 5 μ l MAFP (1 μ M), Tris-Puffer (20 mM Tris, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7,5) und 5 μ l BODIPY-PA (10 μ M) versetzt. Einer zweiten Probe wurden zusätzlich 5 μ l MgCl₂ (5mM) und einer dritten Probe 5 μ l NEM (5 mM) ohne MgCl₂ hinzugefügt (jeweils n=3). Die Proben wurden für 15 min bei 37 °C, 1000 rpm inkubiert (Thermomixer compact, Eppendorf). Es folgte eine Lipidextraktion nach Bligh und Dyer sowie die Messung der PAP-Aktivität mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion.

3.2. Phospholipase D-Assay

3.2.1. Aktivität der Phospholipase D in humanem rechten Ventrikelgewebe von herzgesunden und DCM-Patienten

Wir haben mittels der bereits beschriebenen Methode die Phospholipase D-Aktivität rechtsventrikulärer endomyokardialer Biopsien von insgesamt 23 Patienten untersucht. Bei 14 Patienten war das Vorliegen einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) bekannt, die restlichen 9 Patienten dienten als Kontrollgruppe. DCM- und Kontrollpatienten unterschieden sich nicht hinsichtlich ihres Alters, ihres Geschlechts oder ihres body mass index (BMI), wiesen jedoch signifikante Unterschiede auf, was die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF), den mittleren pulmonalarteriellen Druck (PAP), den pulmonalkapillären Verschluss-Druck (PCWP) und den pulmonalen Gefäßwiderstand (PVR) betraf. Die Unterschiede hinsichtlich des Aortendruckes, des Herzzeitvolumens (HZV), des arteriellen Mitteldruckes (SVR) sowie des linksventrikulären enddiastolischen Druckes (LVEDP) waren nicht signifikant (Tabelle 4).

	Kontrolle (n = 9)	DCM (n = 14)	Student`s-t-test
Alter (Jahre)	44 ± 4	46 ± 4	n.s.
Geschlecht (männlich / weiblich)	4 / 5	12 / 2	n.s.
BMI (kg/m ²)	29,3 ± 1,9	28,4 ± 1,8	n.s.
LVEF (%)	64,2 ± 4,9	44,5 ± 5,4	p < 0,02
HZV (l/min)	6,4 ± 0,5	5,7 ± 0,5	n.s.
Herzindex (l/min/m ²)	3,3 ± 0,3	2,8 ± 0,3	n.s.
mittlerer PAP* (mmHg)	15,7 ± 1,7	26,0 ± 2,6	p < 0,01
PCWP (mmHg)	10,2 ± 1,7	17,3 ± 1,8	p < 0,02
PVR (dyn x sec x cmE-5)	69,1 ± 11,7	122,1 ± 18,8	p < 0,05
SVR (dyn x sec x cmE-5)	1102,0 ± 69,4	1299,2 ± 96,9	n.s.
LVEDP (mmHg)	14,1 ± 0,9	18,5 ± 2,2	n.s.
mittlerer Aortendruck (mmHg)	101,0 ± 6,6	95,1 ± 3,4	n.s.

Tabelle 4: Studienpopulation und zugehörige hämodynamische Parameter; BMI: body mass index; LVEF: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion; HZV: Herzzeitvolumen; PAP*: Pulmonalarteriendruck; PCWP: Pulmonaler kapillärer Verschlussdruck; PVR: Transpulmonaler Widerstand; SVR/SCR: Peripherer Widerstand; LVEDP: Linksventrikulärer enddiastolischer Druck; n.s.: nicht signifikant

Die mittlere PLD-Aktivität in den Biopsien der DCM-Patienten lag bei 260,2 pmol/h/mg, während sie bei den Kontrollpatienten 397,6 pmol/h/mg betrug (Abbildung 17). Die basale PLD-Aktivität fiel also bei den DCM-Patienten geringer aus als bei den gesunden Kontrollpatienten. Dieser Unterschied war signifikant (p = 0,013).

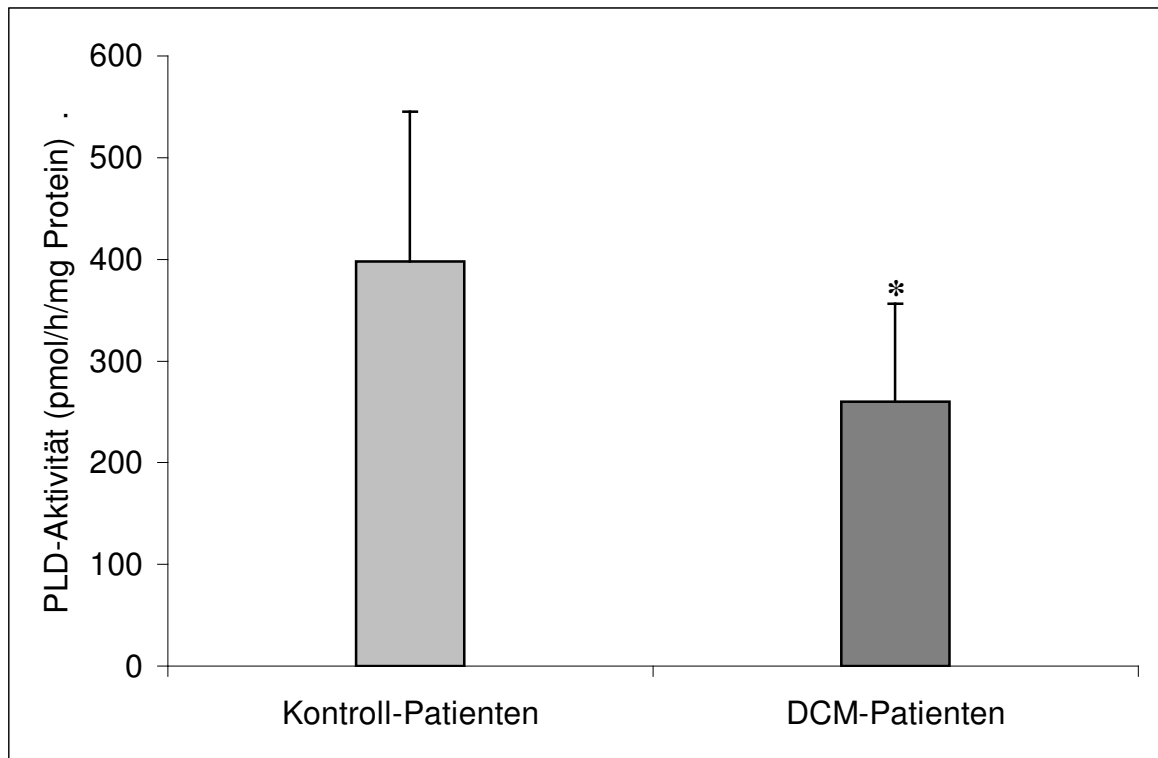


Abbildung 17: In einer Dreifachbestimmung wurden je 25 μl eines Biopsie-Homogenats mit 25 μl BODIPY-PC (10 mM) und 1 Vol. % Ethanol versetzt und für 30 Minuten bei 30 °C und 1000 rpm (Thermomixer compact, Eppendorf) inkubiert. Die Lipide wurden nach der Methode von Bligh und Dyer extrahiert und die Menge an Phosphatidylethanol (PEtOH) mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion bestimmt.

Mittelwert \pm SD; * $p=0,013$ (Kontroll-Patienten vs. DCM-Patienten)

3.2.2. Maximale Stimulation der Phospholipase D-Aktivität mittels Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in humanem rechten Ventrikelgewebe von herzgesunden und DCM-Patienten

Wir wiederholten die Messung der PLD-Aktivität aller 23 Biopsien nach Zusatz von 5 μl PIP_2 (100 μM im Ansatz), um die PLD-Aktivität maximal zu stimulieren. Unter dieser Stimulation stieg die PLD-Aktivität der DCM-Patienten durchschnittlich von 260,21 auf 1127,13 pmol/h/mg an (# $p<0,001$), bei den Kontrollpatienten gab es einen Anstieg von 397,56 auf 3289,07 pmol/h/mg (# $p<0,003$) (Abbildung 18). Die PIP_2 -stimulierte absolute PLD-Aktivität der Kontrollpatienten war signifikant höher als die der DCM-Patienten ($p<0,013$). Der relative Anstieg der PLD-Aktivität unter PIP_2 -Stimulation versus der basalen Aktivität war bei den DCM-Patienten durchschnittlich 6-fachen, bei den Kontrollen 9-fachen. Dieser Unterschied ist nicht signifikant (* $p=0,254$).

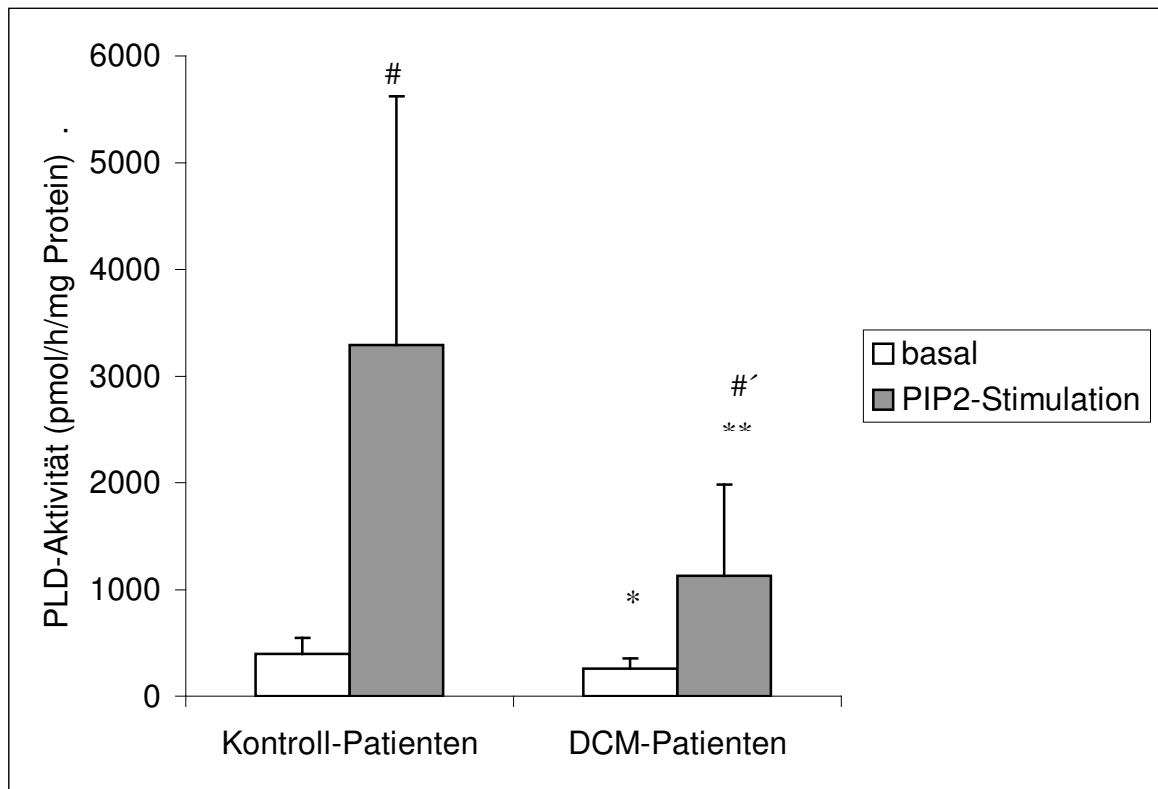


Abbildung 18: In einer Dreifachbestimmung wurden je 25 μl eines Biopsie-Homogenats mit 25 μl BODIPY-PC (10 mM) und 1 Vol. % Ethanol sowie in einer weiteren Dreifachbestimmung je 25 μl eines Biopsie-Homogenats mit 25 μl BODIPY-PC (10 mM), 100 μM PIP₂ und 1 Vol. % Ethanol versetzt und für 30 Minuten bei 30 °C und 1000 rpm (Thermomixer compact, Eppendorf) inkubiert. Die Lipide wurden nach der Methode von Bligh und Dyer extrahiert und die Menge an Phosphatidylethanol (PEtOH) mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion bestimmt.

Mittelwert \pm SD; # $p < 0,002$ (PLD-Aktivität der Kontroll-Patienten: basal vs. PIP₂-Stimulation); # $p < 0,001$ (PLD-Aktivität der DCM-Patienten: basal vs. PIP₂-Stimulation); * $p = 0,013$ (PLD-Aktivität basal: Kontroll-Patienten vs. DCM-Patienten); ** $p = 0,012$ (PLD-Aktivität unter PIP₂-Stimulation: Kontroll-Patienten vs. DCM-Patienten).

3.2.3. Aktivität der Phosphatidatphosphohydrolase in humanem rechten Ventrikelgewebe von herzgesunden und DCM-Patienten

Unter Anwendung des entwickelten PAP-Assays wurde die PAP-Aktivität in den Biopsien der DCM- und Kontrollpatienten bestimmt.

Die Ergebnisse zeigten eine im Vergleich zu den Kontrollen niedrigere totale PAP-Aktivität im myokardialen Gewebe der DCM-Patienten (DCM: 110,29 nmol/h/mg; Kontrollen: 221,82 nmol/h/mg) (Abbildung 19). Sowohl die PAP1- als auch die PAP2-Aktivität fiel in der Kontrollgruppe höher aus als bei den DCM-Patienten. Das jeweilige Verhältnis von PAP1- und PAP2-Aktivität war in beiden Gruppen annähernd gleich (DCM-Gruppe: PAP1: 28% / PAP2: 72% der totalen PAP-Aktivität; Kontrollgruppe: PAP1: 25% / PAP2: 75% der totalen PAP-Aktivität). Dabei ist der Unterschied zwischen der PAP2-Aktivität von Kontroll- und DCM-Gruppe signifikant ($p=0,048$). Bei der PAP1-Aktivität liegt kein signifikanter Unterschied vor.

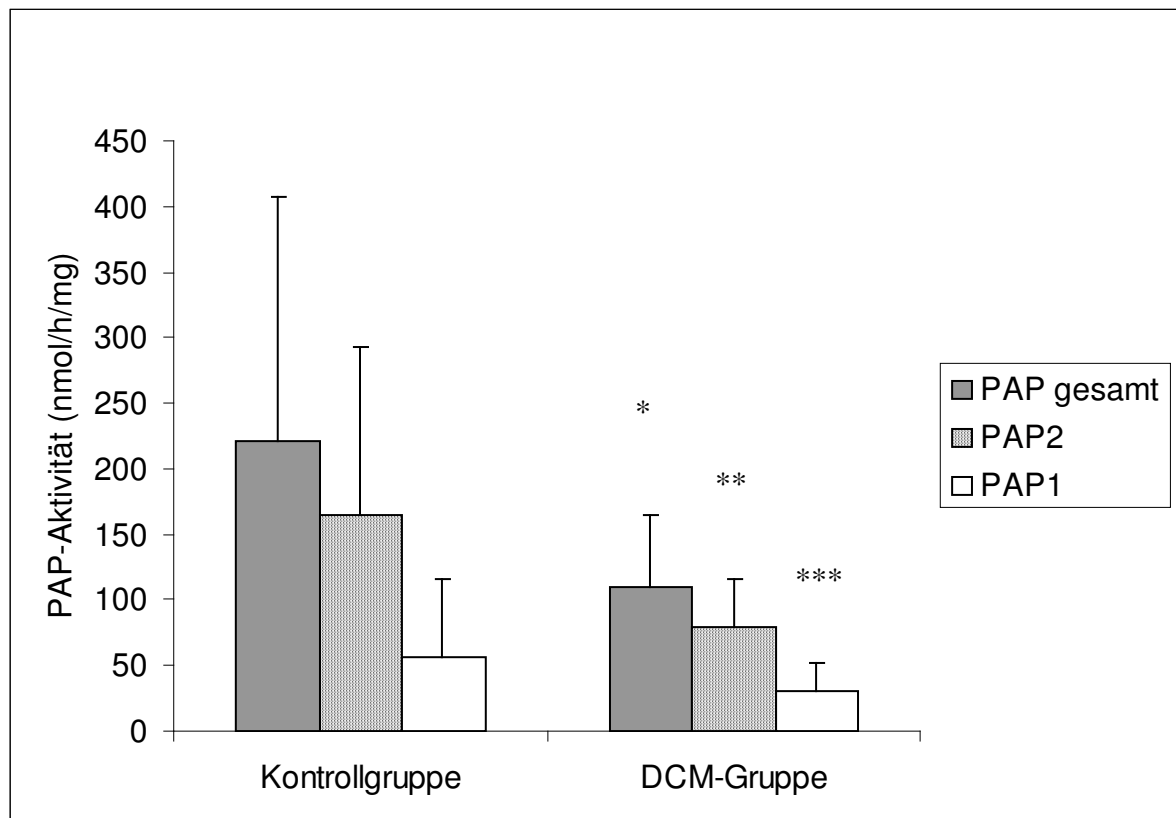


Abbildung 19: 2 μ l eines Homogenats aus humanem rechten Ventrikelgewebe mit einem Proteingehalt von 1 μ g wurden mit 5 μ l MAFP (1 μ M), Tris-Puffer (20 mM Tris, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7,5) und 5 μ l BODIPY-PA (10 μ M) versetzt. Einer zweiten Probe wurden zusätzlich 5 μ l MgCl₂ (5mM) und einer dritten Probe 5 μ l NEM (5 mM) ohne MgCl₂ hinzugefügt (jeweils n=3). Die Proben wurden für 30 min bei 37 °C, 1000 rpm inkubiert (Thermomixer compact, Eppendorf). Es folgte eine Lipidextraktion nach Bligh und Dyer sowie die Messung der PAP-Aktivität mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion. * p= 0,077 (PAP-Aktivität gesamt: Kontroll- vs. DCM-Patienten); ** p= 0,048 (PAP2-Aktivität: Kontroll- vs. DCM-Patienten); *** p=0,205 (PAP1-Aktivität: Kontroll- vs. DCM-Patienten)

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals Veränderungen der PLD-Aktivität in humanem kardiomyopathisch veränderten Herzmuskelgewebe. Dazu wurde die PLD-Aktivität in rechtsventrikulärem Myokardgewebe von herzgesunden Menschen und von Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) untersucht. Die Versuchsergebnisse zeigen eine signifikant niedrigere basale PLD-Aktivität im Myokardgewebe von Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie als im Gewebe von herzgesunden Patienten ($p=0,013$). Die Tatsache, dass die myokardiale PLD-Aktivität bei DCM-Patienten erniedrigt ist, könnte einerseits bedeuten, dass das Enzym nicht in die Entwicklung einer DCM involviert ist. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass sich die DCM erst aufgrund der erniedrigten PLD-Aktivität bzw. einer verminderten PLD-Funktion entwickelt hat. In vitro ist keine Aussage über die Wirkung möglicher endogener Faktoren auf die PLD möglich. Um zu untersuchen, ob die niedrigere Enzym-Aktivität bei den DCM-Patienten darauf beruht, dass basal nur ein kleiner Teil der insgesamt vorhandenen PLD aktiviert wird, wiederholten wir die Messungen der PLD-Aktivität unter PIP_2 -Stimulation. Frühere Versuche zeigten eine mehr als 10-fache Steigerung der Aktivität einer partiell solubilisierten PLD aus humanem Vorhofgewebe durch PIP_2 [23]. Unter dieser maximalen Enzym-Aktivierung stieg die PLD-Aktivität bei den DCM-Patienten um das Sechsfache des basalen Wertes, bei den gesunden Patienten um das Neunfache. Dieser Unterschied ist nicht signifikant. Die Ergebnisse schließen somit eine verminderte Aktivierung der PLD, bzw. einen Mangel an verfügbaren PLD-Aktivatoren, als Grund für die niedrigere PLD-Aktivität bei DCM-Patienten aus.

Eine Einschränkung der vorliegenden Untersuchung liegt darin, dass sie weder eine vermehrte Inhibition des Enzyms, noch mögliche Veränderungen der PLD-Gen-Expression als Grund für eine erniedrigte PLD-Aktivität ausschließt bzw. nachweist. Zusätzliche Versuche zur quantitativen Bestimmung des im Gewebe vorhandenen PLD-Enzymproteins sowie eine Untersuchung der Gen-Expression der PLD-Isoenzyme wären wünschenswert. Anhand der geringen Menge des zur Verfügung stehenden Untersuchungsmaterials war es weder möglich, das PLD-Enzymprotein in den Biopsien von DCM- und Kontrollpatienten zu bestimmen, noch die PLD auf mRNA-Ebene zu untersuchen.

PA entsteht durch die PLD-vermittelte Konversion von Phosphatidylcholin. PA wirkt positiv inotrop, indem es die Ca^{2+} -Freisetzung aus den intrazellulären Speichern des sarkoplasmatischen Retikulums induziert [49] und ist an der Regulation des myokardialen

Na^+ - Ca^{2+} -Austausches beteiligt [38]. Unsere Versuche haben gezeigt, dass die myokardiale PLD-Aktivität bei DCM-Patienten vermindert ist. Ausgehend von der Hypothese, dass sich die DCM aufgrund einer verminderten PLD-Aktivität entwickelt, könnte die dadurch bedingte Reduktion der PA-Synthese die Beeinträchtigung der myokardialen Kontraktilität von DCM-Patienten erklären.

Das Enzym PAP vermittelt die Konversion von PA zu DAG. Umgekehrt kann DAG durch das Enzym DAG-Kinase in PA umgewandelt werden. Der PAP-Signaltransduktionsweg ist demzufolge an der Regulation des myokardialen Kalzium-Haushaltes beteiligt und stellt einen alternativen DAG-Bildungsweg dar. Eine vermehrte Umwandlung von PA zu 1,2-DAG mittels des PAP-Enzyms führt zu einer Reduktion von PA sowie zu einer Erhöhung von 1,2-DAG. Die dabei gesteigerte 1,2-DAG-Bildung könnte die Entwicklung einer myokardialen Hypertrophie im Rahmen einer DCM erklären. Durch eine gesteigerte PAP-Aktivität kann eine verminderte DAG-Synthese, z. B. aufgrund einer verminderten PLD- und/oder PLC-Aktivität, kompensiert werden. Frühere Untersuchungen haben Veränderungen der myokardialen PAP-Aktivität in Rattenmyokardgewebe bei diabetogener Stoffwechsellage sowie unter ischämischen Bedingungen gezeigt [40]. Bisher liegen trotz dieser myokardialen Bedeutung des PAP-Signaltransduktionsweges keine Befunde zu Veränderungen der PAP-Aktivität im humanen kardiomyopathischen Herzen vor.

Bisherige In-vitro-Assays zur Bestimmung der PAP-Aktivität verwendeten radioaktivmarkiertes PA als Substrat [15,43]. Der Einsatz von radioaktivem Material hat jedoch erhebliche Nachteile. Es besteht die Gefahr der Kontamination als potenzielles Gesundheitsrisiko. Die Haltbarkeit der radioaktivmarkierten Isotope ist durch Aktivitätsverlust und Radiolyse (Zerstrahlung) beschränkt. Man benötigt ein Isotopenlabor sowie speziell geschultes Personal. Anfallender radioaktiver Abfall muss entsorgt werden. Dabei müssen die zunehmenden gesetzlichen Restriktionen beim Umgang mit radioaktiven Isotopen beachtet werden. Daher entwickelten und validierten wir anhand von Rattenmyokardgewebe einen nicht-radioaktiven Assay zur quantitativen Bestimmung der myokardialen PAP-Aktivität in vitro mit dem Ziel, Aussagen über die PAP-Aktivität in humanem Herzmuskelgewebe machen zu können.

Neben der Phosphatidatphosphohydrolase (PAP) nutzt auch Phospholipase A2 (PLA2) die phosphatidische Säure (PA) als Substrat. Um eine Konversion von PA zu LPA zu verhindern, wurden die Messungen der myokardialen PAP-Aktivität in Anwesenheit von MAFP, einem selektiven PLA2-Inhibitor, durchgeführt.

Bei der Untersuchung der PAP-Aktivität in Rattenmyokardgewebe zeigte sich eine um den Faktor 13 höhere PAP-Aktivität in Rattenherzmembranen als in den entsprechenden Homogenaten. Dabei betrug der relative Anteil der PAP2-Aktivität in den Membranen 90 %, in den Homogenaten 75 %. Dementsprechend betrug der relative Anteil der PAP1-Aktivität in den Membranen 10 %, in den Homogenaten hingegen 25%. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die absolute PAP-Aktivität als auch die PAP2-Aktivität in den Rattenherzmembranen überwiegen. In den Membranen beträgt die PAP1-Aktivität ein Zehntel der totalen PAP-Aktivität, in den Homogenaten hingegen ein Viertel. Es bestehen also regionale Unterschiede hinsichtlich der absoluten PAP-Aktivität sowie der Aktivität der PAP-Isoenzyme in Myokardgewebe von Ratten auf zellulärer Ebene. Die Versuchsergebnisse entsprechen früheren Untersuchungen, die zeigten, dass PAP1 hauptsächlich im Zytosol einer Zelle vorliegt, aber auch Beziehungen zum endoplasmatischen Retikulum sowie zur Mitochondrienmembran hat, während PAP2 überwiegend membrangebunden ist [19]. Während das PAP1-Isoenzym in die Triacylglycerolsynthese involviert ist, wird dem PAP2-Isoenzym eine wichtige Rolle in der zellulären Signaltransduktion zugeschrieben. Wir untersuchten die Aktivität der Phosphatidatphosphohydrolase in humanem Vorhofgewebe sowie in humanem Ventrikelgewebe. Die Versuche zeigen, dass die absolute (Gesamt-)PAP-Aktivität in menschlichem Ventrikelgewebe annähernd doppelt so hoch ist wie in humanem atrialen Gewebe. Dabei entspricht die gemessene absolute PAP-Aktivität im Vorhofgewebe annähernd der PAP2-Aktivität, während in humanen Ventrikelgewebe 83% der gemessenen PAP-Aktivität auf Aktivität von PAP2 und 17% auf PAP1-Aktivität beruhen. Die erhobenen Daten deuten auf regionale Unterschiede der PAP-Aktivität im menschlichen Herzen hin.

Die lokale Restriktion der PAP1-Aktivität im menschlichen Herzen auf das ventrikuläre Myokard könnte mit dem gesteigerten Energiebedarf des Ventrikelgewebes und der Beteiligung von PAP1 an der Biosynthese von Glycerolipiden bzw. Triacylglycerol (TAG) zusammenhängen. Freie Fettsäuren werden durch das Enzym Thiokinase in Azy-CoA, die aktivierte Form der Fettsäure, überführt. Azy-CoA wird durch das Enzym Glycerol-3-phosphatazytransferase (GPAT) in Lysophosphatidische Säure (LPA) umgewandelt.

Es folgt die Konversion von LPA in Phosphatidische Säure (PA) mithilfe der 1-Azyglycerol-3-phosphatazytransferase (AGPAT). PAP1 wird durch freie Fettsäuren aktiviert, wandert ins endoplasmatische Retikulum und katalysiert dort die Umwandlung von PA zu DAG. Es folgt die Acylierung von DAG durch das Enzym Diazyglycerolazytransferase (DGAT), wodurch Triacylglycerol (TAG) entsteht [24].

Das Herz deckt seinen Energiebedarf hauptsächlich über die mitochondriale β -Oxidation freier Fettsäuren [21]. Bei steigendem Energiebedarf kommt es zur Lipolyse von TAG, wodurch dem Organismus vermehrt freie Fettsäuren zur Verfügung stehen. Die Fettsäuren unterliegen der mitochondrialen β -Oxidation und dienen via Citrat-Zyklus und Atmungskette der ATP-Synthese. Durch die Speicherung freier Fettsäuren in Form von TAG ist es möglich, einen gesteigerten Energiebedarf des Myokards durch Aktivierung der Lipolyse zu decken. Der, im Vergleich zum atrialen Gewebe, hohe Energiebedarf des ventrikulären Myokards könnte die höhere PAP1-Aktivität im humanen Ventrikelgewebe erklären.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigen, dass die humane myokardiale PAP-Aktivität um ein Vielfaches höher ist als die PAP-Aktivität in Rattenmyokardgewebe. Es liegen also Spezies-Unterschiede hinsichtlich der PAP-Aktivität vor.

Bei der Untersuchung der PAP-Aktivität im Myokardgewebe von DCM- und Kontrollpatienten zeigte sich bei den DCM-Patienten eine deutlich niedrigere myokardiale PAP-Gesamtaktivität als bei den Kontrollpatienten. Sowohl die PAP1- als auch die PAP2-Aktivität fiel bei den DCM-Patienten geringer aus. Der Unterschied zwischen der PAP2-Aktivität im Myokardgewebe von Kontroll- und DCM-Patienten ist dabei signifikant ($p = 0,048$). Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die myokardiale PLD-, als auch die PAP-Aktivität bei Patienten mit einer DCM erniedrigt sind. Eine niedrige myokardiale PLD-Aktivität führt zu einer verminderten PA-Synthese. Eine dadurch bedingte Verminderung der myokardialen intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung könnte die gestörte myokardiale Funktion von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie erklären. Eine niedrige myokardiale PAP2-Aktivität könnte durch eine verringerte Konversion von PA zu DAG eine verminderte PA-Synthese kompensieren mit dem Ziel, eine basale PA-Konzentration für die Regulation des myokardialen Kalziumhaushaltes aufrecht zu erhalten.

5. Zusammenfassung

Die dilatative Kardiomyopathie gehört zu den häufigsten Ursachen einer Herzinsuffizienz. Bisher ist nicht bekannt, ob im Rahmen einer dilatativen Kardiomyopathie Veränderungen des Phospholipase D-(PLD)-Signaltransduktionsweges in humanem Myokard auftreten. PLD katalysiert die hydrolytische Spaltung von Phosphatidylcholin, wodurch Phosphatidische Säure und Cholin entstehen. Phosphatidische Säure wirkt über eine Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration positiv inotrop und stellt einen wichtigen intrazellulären Regulator der Herzfunktion dar. Unter Anwendung des fluoreszenzmarkierten Substrates Phosphatidylcholin wurde mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie die PLD-Aktivität in rechtsventrikulärem Myokardgewebe von herzgesunden Menschen und von Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie untersucht. Hierbei konnte erstmals eine signifikant niedrigere basale PLD-Aktivität im Myokardgewebe von Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie gezeigt werden. Nach maximaler Aktivierung der PLD mit Hilfe von Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der relativen Steigerung der myokardialen Enzymaktivität bei DCM-Patienten. Die Ergebnisse schließen eine verminderte Aktivierbarkeit der PLD durch endogene Faktoren als Grund für die niedrigere PLD-Aktivität bei DCM-Patienten aus und weisen auf eine verminderte Expression des PLD-Proteins hin. Die verminderte myokardiale PLD-Aktivität der DCM-Patienten führt zu einer Einschränkung der PA-Synthese. Eine dadurch bedingte Verminderung der intrazellulären Ca²⁺-Freisetzung könnte die gestörte myokardiale Kontraktilität von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie erklären.

PA wird durch das Enzym Phosphatidatphosphohydrolase (PAP) in 1,2-Diacylglycerol (1,2-DAG) umgewandelt. Ebenso kann 1,2-Diacylglycerol durch die Phospholipase C -vermittelte Konversion von PIP₂ entstehen. 1,2-DAG aktiviert die Proteinkinase C, welche über Phosphorylierung myokardialer Proteine in die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie involviert ist. Bisher liegen keine Erkenntnisse über die PAP-Aktivität als alternativer DAG-Bildungsweg am menschlichen Herzen vor. Wir entwickelten und validierten anhand von Rattenmyokardgewebe einen nicht-radioaktiven Assay zur quantitativen Bestimmung der myokardialen PAP-Aktivität in vitro. Dieser Assay wurde zur Charakterisierung der PAP-Aktivität in humanem Herzmuskelgewebe von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie eingesetzt und wurde mit der myokardialen PAP-Aktivität herzgesunder Menschen verglichen. Dabei zeigte sich bei den DCM-Patienten eine signifikant vermin-

derte myokardiale PAP2-Aktivität, dem PAP-Isoenzym mit besonderer Bedeutung für die intrazelluläre Signaltransduktion. Die niedrige myokardiale PAP2-Aktivität hat eine verminderte Konversion von PA zu 1,2-DAG zur Folge. Im Zusammenhang mit der verminderten PLD-Aktivität könnte eine niedrige myokardiale PAP2-Aktivität durch eine verringerte Konversion von PA zu DAG eine verminderte PA-Synthese kompensieren mit dem Ziel, eine basale PA-Konzentration für die Regulation des myokardialen Kalziumhaushaltes aufrecht zu erhalten. Die mögliche Beeinflussung der myokardialen Kalzium-Homöostase durch den Phospholipase D-Phosphatidatphosphohydrolase-Signaltransduktionsweg könnte daher eine Rolle bei der gestörten myokardialen Funktion von DCM-Patienten spielen.

6. Abkürzungsverzeichnis

Allgemein

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintrisphosphat
BHT	Butylated hydroxytoluene
BMI	body mass index
BODIPY	4,4-difluoro-5,7 dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-Indacene-3-propionyl
BSA	Rinderserumalbumin/ Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
d.h.	das heißt
DAG	Diacylglycerol
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethyleneglycol-bis(β -aminoethylether)tetraacetat
G-Protein	Guaninnucleotide-bindendes Protein
GTP	Guanosin-5`-triphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
hPLD	humane Phospholipase D
HZV	Herzzeitvolumen
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
KCl	Kaliumchlorid
LPP	Lipidphosphatphosphohydrolase
MAFP	Methylarachnoidylfluorophosponat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mTOR	mammalian target of rapamycin
n.s.	nicht signifikant

NaCl	Natriumchlorid
NEM	n-Ethylmaleimide
Nr.	Nummer
PA	Phosphatidische Säure
PAP	Phosphatidatphosphohydrolase
PAP*	Pulmonalarteriendruck
PAP1	Phosphatidatphosphohydrolase 1
PAP2	Phosphatidatphosphohydrolase 2
PC	Phosphatidylcholin
PEtOH	Phosphatidylethanol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat / Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositoltrisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PVR	Transpulmonaler Widerstand
Rho	Ras homology subfamiliy
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
sog.	sogenannt
STD	Standard
TAG	Triacylglycerol
(v/v)	Verhältnis Volumen zu Volumen
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel

Einheiten

°C	Temperaturangabe in Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
Da	Molekulargewicht in Dalton
KG	Körpergewicht
L	Liter
m	Meter
M	Molarität (Einheit mol/l)
min	Minute
mol	Mol (=Stoffmenge)
rpm	rotation per minute (Umdrehungen pro Minute)
V	Volt
Vol%	Volumenprozent

Vorsätze:

k	Kilo	(= 10^3)
c	Zenti	(= 10^2)
m	Milli	(= 10^{-3})
μ	Mikro	(= 10^{-6})
n	Nano	(= 10^{-9})
p	Pico	(= 10^{-12})

7. Literaturverzeichnis

1. Andresen BT, Rizzo MA, Shome K, Romero G :
The role of phosphatidic acid in the regulation of the Ras/MEK/Erk signaling cascade.
FEBS Lett 531, 65-68 (2002)
2. Asemu G, Dent MR, Singal T, Dhalla NS, Tappia PS:
Differential changes in phospholipase D and phosphatidate phosphohydrolase activities in ischemia-reperfusion of rat heart.
Arch Biochem Biophys 436, 136-144 (2005)
3. Bligh EG, Dyer WJ:
A rapid method of total lipid extraction and purification.
Can J Biochem Physiol 37, 911–917 (1959)
4. Brindley DN, Waggoner DW:
Mammalian lipid phosphate phosphohydrolases.
J Biol Chem 273, 24281-24284 (1998)
5. Dhalla NS, Xu YJ, Sheu SS, Tappia PS, Panagia V:
Phosphatidic acid: a potential signal transducer for cardiac hypertrophy.
J Mol Cell Cardiol 29, 2865-2871 (1997)
6. Dorn GW:
Adrenergic pathways and left ventricular remodeling.
J Card Fail 8, (6 Suppl.) S370-S373 (2002)
7. Dorn GW, Force T:
Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy.
J Clin Invest 115, 527-537 (2005)

8. Ella KM, Dolan JW, Qi C, Meier KE:
A fluorescent assay for agonist-activated phospholipase D in mammalian cell extracts.
Anal Biochem 218, 136-142 (1994)
9. Eskildsen-Helmond YEG, Bezstarosti K, Dekkers DHW, Van Heugten HAA, Lamers MJM:
Cross-talk between receptor-mediated phospholipase C- β and D via protein kinase C as intracellular signal possibly leading to hypertrophy in serum-free cultured cardiomyocytes.
J Mol Cell Cardiol 29, 2545-2559 (1997)
10. Eskildsen-Helmond YEG, Hahnel D, Reinhardt U, Dekkers DHW, Engelmann B, Lamers MJM:
Phospholipid source and molecular species composition of 1,2-diacylglycerol in agonist-stimulated rat cardiomyocytes.
Cardiovasc Res 40, 182-190 (1998)
11. Eskildsen-Helmond YEG, Van Heugten HAA, Lamers MJM:
Regulation and functional significance of phospholipase D in myocardium.
Mol Cell Biochem 157, 39-48 (1996)
12. Exton JH:
Review: Phospholipase D: Enzymology, mechanisms of regulation and function.
Physiol Rev 77, 303-320 (1997)
13. Exton JH:
Review: Regulation of Phospholipase D.
Biochim Biophys Acta 1439, 121-133 (1999)
14. Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, Flanigan A, Chen J:
Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling.
Science 294, 1942-1945 (2001)

15. Flynn TJ, Deshmukh DS, Pieringer RA:
A rapid and sensitive radiochemical assay for phosphatidic acid phosphohydrolase activity.
J Lipid Res 18, 777-780 (1977)

16. Hammond SM, Altshuler YM, Sung TC, Rudge SA, Rose K, Engebrecht J, Morris AJ, Frohman MA:
Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family.
J Biol Chem 270, 29640-29643 (1995)

17. Hammond SM, Jenco JM, Nakashima S, Cadwallader K, Gu Q, Cook S, Nozawa Y, Prestwich GD, Frohman MA, Morris AJ:
Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1.
J Biol Chem 272, 3860-3868 (1997)

18. Houle MG, Bourgoin S: Review:
Regulation of phospholipase D by phosphorylation-dependent mechanisms. Biochim Biophys Acta 1439, 135-149 (1999)

19. Jamal Z, Martin A, Gomez-Munoz A, Brindley DN:
Plasma membrane fractions from rat liver contain a phosphatidate phosphohydrolase distinct from that in the endoplasmic reticulum and cytosol.
J Biol Chem 266, 2988-2996 (1991)

20. Kanfer JN:
The base exchange enzymes and phospholipase D of mammalian tissue.
Can J Biochem 58, 1370-1380 (1980)

21. Kelly DP, Strauss AW:
Inherited cardiomyopathies.
N Engl J Med 330, 913-919 (1994)

22. Knabb MT, Rubio R, Berne RM:
Calcium-dependent atrial slow action potentials generated with phosphatidic acid or phospholipase D.
Pflügers Arch 401, 435-437 (1984)

23. Kurz T, Kemken D, Mier K, Weber I, Richardt G:
Human cardiac phospholipase D activity is tightly controlled by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate.
J Mol Cell Cardiol 36, 225-232 (2004)

24. Lewin TM, Coleman RA: Regulation of myocardial triacylglycerol synthesis and metabolism.
Biochim Biophys Acta 1634, 63-75 (2003)

25. Li D, Tapscoft T, Gonzalez O, Burch PE, Quinones MA, Zoghbi WA, Hill R, Bachinski LL, Mann DL, Roberts R:
Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy.
Circulation 100, 461-464 (1999)

26. Liscovitch M, Czarny M, Fiucci G, Tang X:
Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family.
J Biochem 345, 401-415 (2000)

27. Lopez I, Arnold RS, Lambeth JD:
Cloning and initial characterization of a human phospholipase D2 (hPLD2). ADP-ribosylation factor regulates hPLD2.
J Biol Chem 273, 12846-12852 (1998)

28. Lowry OH, Rosebrought NJ, Farr AL, Randall RJ:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J Biol Chem 193, 265-275 (1951)

29. Maisch B:
Einteilung der Kardiomyopathien nach der WHO/ISFC Task Force - Mehr Fragen als Antworten?
Med Klin 93, 199-209 (1998)

30. Moraru II, Popescu LM, Maulik N, Liu X, Das DK:
Phospholipase D signaling in ischemic heart.
Biochim Biophys Acta 1139, 148-154 (1992)

31. Murphy RT, Mogensen J, Shaw A, Kubo T, Hughes S, McKenna WJ:
Novel mutation in cardiac troponin I in recessive idiopathic dilated cardiomyopathy.
Lancet 363, 371-372 (2004)

32. Nanjundan M, Possmayer F:
Pulmonary phosphatidic acid phosphatase and lipid phosphate phosphohydrolase.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 284, L1-L23 (2003)

33. Olson TM, Kishimoto NY, Whitby FG, Michels VV:
Mutations that alter the surface charge of alpha-tropomyosin are associated with dilated cardiomyopathy.
J Mol Cell Cardiol 33, 723-732 (2001)

34. Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, Tai YS, Keating MT:
Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure.
Science 280, 750-752 (1998)

35. Osterziel KJ, Perrot A:
Dilated cardiomyopathy: more genes means more phenotypes.
Eur Heart J 26, 751-754 (2005)

36. Panagia V, Ou C, Taira Y, Dai J, Dhalla NS:
Phospholipase D activity in subcellular membranes of rat ventricular myocardium.
Biochim Biophys Acta 1064, 242-250 (1991)
37. Park JB, Kim JH, Kim Y, Ha SH, Yoo JS, Du G, Frohman MA, Suh PG, Ryu SH:
Cardiac phospholipase D2 localizes to sarcolemmal membranes and is inhibited by alpha-actinin in an ADP-ribosylation factor-reversible manner.
J Biol Chem 275: 21295-21301 (2000)
38. Philipson KD, Nishimoto AY:
Stimulation of Na⁺-Ca²⁺ exchange in cardiac sarcolemmal vesicles by phospholipase D.
J Biol Chem 259, 16-19 (1984)
39. Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P:
Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies.
Circulation 93, 841-842 (1996)
40. Schoonderwoerd K, Broekhoven-Schokker S, Hülsmann WC, Stam H:
Properties of phosphatidate phosphohydrolase and diacylglycerol acyltransferase activities in the isolated rat heart. Effect of glucagon, ischaemia and diabetes.
Biochem J 268, 487-492 (1990)
41. Sigusch HH, Reinhardt D, Figulla HR:
Klinisches Bild und Differentialdiagnose von Kardiomyopathie und Myokarditis.
Med Klin 93, 236-239 (1998)

42. Silversand C, Haux C:
Improved high-performance liquid chromatographic method for the separation and quantification of lipid classes: application to fish lipids.
J Chromatogr 703, 7-14 (1997)
43. Stark M, Humble E:
Difficulties in the assay of phosphatidate phosphohydrolase activity. Influence of ionic strength, detergent, and selection of substrate.
Lipids 31, 1097-1102 (1996)
44. Tosaki A, Maulik N, Cordis G, Trifan OC, Popescu LM, Das DK:
Ischemic preconditioning triggers phospholipase D signaling in rat heart.
Am J Physiol 273, H1860-1866 (1997)
45. Towbin JA, Bowles NE:
The failing heart.
Nature 415, 227-233 (2002)
46. Towbin JA, Heitmancik JF, Brink P, Gelb B, Zhu XM, Chamberlain JS, McCabe ER, Swift M:
X-linked dilated cardiomyopathy. Molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus.
Circulation 87, 1854-1865 (1993)
47. Villard E, Duboscq-Bidot L, Charron P, Benaiche A, Conraads V, Sylvius N, Komajda M:
Mutation screening in dilated cardiomyopathy: prominent role of the beta myosin heavy chain gene.
Eur Heart J 26, 794-803 (2005)
48. Waggoner DW, Xu J, Singh I, Jasinska R, Zhang QX, Brindley DN:
Structural organisation of mammalian lipid phosphate phosphatases: implications for signal transduction.
Biochim Biophys Acta 1439, 299-316 (1999)

49. Xu YJ, Panagia V, Shao Q, Wang X, Dhalla NS:
Phosphatidic acid increases intracellular free Ca^{2+} and cardiac contractile force.
Am J Physiol 271, H651-H659 (1996)
50. Yu CH, Panagia V, Tappia PS, Liu SY, Takeda N, Dhalla NS:
Alterations of sarcolemmal phospholipase D and phosphatidate phosphohydrolyase in congestive heart failure.
Biochim Biophys Acta 1584, 65-72 (2002)

8. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name : Antje Prey
Geburtsdatum : 21. März 1979
Geburtsort : Eschwege

Schulausbildung:

1985 – 1989 : Grundschule Heidacker, Hamburg
1989 – 1998 : Gymnasium Dörpsweg, Hamburg
31.07.1998 : Schulabschluss Abitur

Studium:

01.10.1998 : Beginn des Medizinstudiums an der
Medizinischen Universität zu Lübeck
30.03.2001 : Ärztliche Vorprüfung
21.03.2002 : Erstes Staatsexamen
14.09.2004 : Zweites Staatsexamen
01.12.2005 : Drittes Staatsexamen

Beruflicher Werdegang:

Seit 01.06.2006 : Assistenzärztin in der Abteilung für In-
nere Medizin, Evangelisches Kranken-
haus Lütgendortmund

9. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med Thomas Kurz für die geduldige Betreuung in allen Phasen dieser Doktorarbeit. Ich konnte mich jederzeit mit meinen Fragen an ihn wenden. Er half mir mit seinem Wissen und seiner Erfahrung sowohl bei wissenschaftlichen als auch bei technischen Problemen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. H. Schunkert, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit an seinem Institut durchzuführen.

Für eine hervorragende Einarbeitung insbesondere in die Arbeit mit der HPLC danke ich Frau Dipl.-Ing. Dorit Kemken. Ohne ihr Wissen über chemische Prozesse und die Vermittlung technischer Grundlagen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ich danke den Mitarbeiterinnen des Katecholaminlabors Frau Ines Stölting, Frau Anke Constanz und Frau Cindy Krause für ihre große Geduld und ihre Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente.

Herrn Prof. Dr. Feller danke ich für die Bereitstellung der histologischen Daten meiner verwendeten Gewebeproben. Ganz besonders danken möchte ich dabei seinem Institutsmitarbeiter Herrn Dr. Bernd. Er vermittelte mir die Grundlagen der histologischen Färbetechniken.

Ich danke meinen Eltern für die große Unterstützung, die es mir ermöglicht hat, diesen Weg zu gehen. Meinem Bruder Steffen und meinem Lebensgefährten Bastian danke ich für die Hilfe beim Formatieren der Datei sowie das Korrekturlesen der Arbeit. Mein großer Dank gilt zudem meiner Schwester Kathrin für ihre Hilfe beim Layout.

Ein herzliches Dankeschön gilt Johanna Kühn für ihren wertvollen Rat bei diversen Computerproblemen.

