

Daniel Oehler
Dr. med.

Charakterisierung des Proteins VPS41 in der Pathophysiologie der Dilatativen Kardiomyopathie

Fach/Einrichtung: Innere Medizin
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Benjamin Meder

In dieser Arbeit wurde der Knockdown des Tethering-Proteins VPS41 im Zebrafisch charakterisiert und mögliche Ursachen der Entstehung des durch den Knockdown hervorgerufenen kardialen Phänotyps analysiert. Um den Knockdown zu erreichen, wurde im 2-4 Zellstadium eine veränderte Antisense-RNA-Sequenz injiziert, die durch seine komplementäre Abfolge die Expression des Proteins VPS41 im Zebrafisch von Beginn der Entwicklung des Organismus an nahezu vollständig unterdrückt, um anschließend den Knockdown mittels eines Nachweises des veränderten Genprodukts zu beweisen.

Nachfolgend wurde der entstandene Phänotyp zunächst strukturell untersucht. Die so entstandenen VPS41-defizienten Embryonen zeigen nach 48 Stunden bereits einen deutlichen kardialen Phänotyp mit dilatiertem Atrium, einer kongestiven Herzinsuffizienz mit perikardialem Ödem sowie einem offensichtlichen Pendelvolumenphänomen bei sekundärem Klappenfehler zwischen Herzkammer und Vorhof. Bei 72 Stunden nach Befruchtung ist in einem Teil der Population derselbe Phänotyp zu erkennen (hier „HF-Phänotyp“ genannt), während eine Subgruppe von Embryonen eine äußerliche Erholung aufweist (hier „Recovery-Phänotyp“ genannt). Diese Unterscheidung der verschiedenen Subgruppen zeigte einen deutlichen Zusammenhang mit dem Entwicklungszeitpunkt. Bei circa 60 Stunden nach Befruchtung ist der beobachtete Wechsel der Embryonen von der HF-Phänotyp-Gruppe zur Recovery-Phänotypgruppe am größten; danach ist der Zuwachs der „Recovery-Phänotyp“-Gruppe nur noch marginal.

In histologischen Schnitten und ultrastrukturellen EM-Aufnahmen in VPS41-defizienten Embryonen zeigt sich eine deutliche atriale Dilatation, aber keine strukturelle Veränderung der Herzmuskelschichten oder der Klappenstruktur. Eine Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung von atrialen und ventrikulären Strukturproteinen zeigte ebenfalls ein normales Muster, sodass nicht von einer Entwicklungsstörung im Aufbau von Kammer oder Atriums an sich auszugehen ist.

Im Folgenden wurde der Knockdown von VP41 in Zebrafisch funktionell untersucht. Im sogenannten Fractional Shortening (FS), der relativen Verkürzungsfraction, die ein Maß für die Kontraktilität darstellt, konnte eine signifikante Abnahme des FS in beiden Knockdown-Gruppen relativ zu den mit Standard-Kontroll-Morpholino injizierten Embryonen in allen untersuchten Entwicklungszeitpunkten (48, 72 und 96 Stunden) gezeigt werden. Zudem konnte die bereits vorher optisch beschriebene atriale Dilatation auch quantitativ und relativ gezeigt werden; dabei ist ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen und der Kontrollgruppe, aber auch innerhalb der einzelnen Phänotyp-Gruppen erkennbar, was zur Gesamtbeschreibung des Phänotyps kongruent erscheint.

Anschließend wurde aufgrund dieses beobachteten, interessanten Phänomens eine Analyse der möglichen Ursachen der Entstehung zweier Phänotypen durchgeführt. Zunächst ließ sich

mittels quantitativer Echtzeit-PCR gegen VPS41 ausschließen, dass dies ein artifizieller Effekt eines nicht mehr effektiven Knockdowns ist. Im Folgenden wurde der Fokus auf die in Hefezellen gut studierten Bindungs- und Interaktionspartner von VPS41 gelegt, zu denen es in tierischen Zellen bisher kaum valide Daten gibt.

Um zunächst einen Überblick über das Expressionsmuster dieser Proteine zu erhalten, wurde eine Untersuchung einer Auswahl der Bindungspartner sowie VPS41 selbst mittels quantitativer Echtzeit-PCR in Wildtyp-Embryonen unterschiedlichen Alters durchgeführt. Eine Analyse dieser zeigte einen deutlichen Expressionsunterschied bei 60 Stunden nach Befruchtung im Gegensatz zu den anderen Beobachtungszeiträumen, was gut mit der Beobachtung der Phänotyp-Differenzierung im VPS41-Knockdown korreliert. In einer anschließend durchgeführten Expressionsanalyse mittels quantitativer Echtzeit-PCR konnte zudem die zeitliche Korrelation des Kompensationsphänomens mit der Expression der Bindungspartner in den Subphänotypen im VPS41-Knockdown gezeigt werden. Besonders auffällig zeigte sich bei VPS39 ein signifikanter Unterschied im Alter von 60 Stunden gegenüber 48 und 72 Stunden nach Befruchtung: Dabei war in der Recovery-Gruppe im Vergleich zur HF-Phänotyp-Gruppe VPS39 signifikant höher reguliert, was seine Bedeutung in der Phänotypen-Differenzierung nochmals unterstreicht.

Bis zur Veröffentlichung dieser Arbeit ist kein Zusammenhang zwischen VPS41 und kardialen Erkrankungen beschrieben worden. Die Ergebnisse meiner Untersuchungen belegen, dass VPS41 entscheidend für die kardiale Funktion in Vertebraten ist und der Knockdown zu einem signifikanten Herzinsuffizienz-Phänotyp sowie zu einer konsekutiven Beeinträchtigung des gesamten Organismus führt. Die geplante weiterführende molekularbiologische Untersuchung von VPS41 und VPS39 und anderer Interaktionspartner wird das Verständnis der Signalwege in der Genese der Phänotypenbildung und damit das Verständnis der Pathogenese der Herzinsuffizienz verbessern. Die molekulargenetische Analyse von Herzinsuffizienzpatienten im Allgemeinen und Patienten mit Kardiomyopathien im Speziellen in Hinblick auf Mutationen in VPS41 und VPS39 wird die klinische Relevanz dieser Beobachtungen weiter stärken und mittelfristig neue, diagnostische und therapeutische Ziele generieren.