

Molekulare Kardiologie  
Klinik für Innere Medizin III mit den Schwerpunkten Kardiologie,  
Angiologie und internistische Intensivmedizin  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
Direktor: Prof. Dr. med. Norbert Frey

**Die Rolle des herzspezifischen Proteins CEFIP in der  
kardialen Hypertrophie und Kardiomyopathie**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
vorgelegt von

**Franziska Dierck**

Kiel, 2018



---

Molekulare Kardiologie  
Klinik für Innere Medizin III mit den Schwerpunkten Kardiologie, Angiologie und  
internistische Intensivmedizin  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
Direktor: Prof. Dr. med. Norbert Frey

## **Die Rolle des herzspezifischen Proteins CEFIP in der kardialen Hypertrophie und Kardiomyopathie**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
vorgelegt von

**Franziska Dierck**

Kiel, 2018

Erster Gutachter: Prof. Dr. Norbert Frey

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Bernd Clement

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2018

Zum Druck genehmigt: 10.07.2018

gez.:

(Dekanin)



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>I    Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>3</b>
<b>II   Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>5</b>
<b>III  Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>7</b>
<b>IV  Zusammenfassung .....</b>	<b>11</b>
<b>V   Abstract .....</b>	<b>13</b>
<b>1    Einleitung.....</b>	<b>15</b>
1.1 Kardiomyopathien.....	15
1.2 Kardiale Hypertrophie .....	18
1.3 Die Z-Scheibe .....	24
1.4 Screening für unbekannte Z-Scheibenproteine .....	27
1.4.1 Fbxl22 .....	27
1.4.2 CEFIP.....	27
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	30
<b>2    Material und Methoden.....</b>	<b>31</b>
2.1 Materialien .....	31
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial.....	31
2.1.2 Chemikalien .....	32
2.1.3 Enzyme .....	34
2.1.4 Kits .....	35
2.1.5 Oligonukleotide und Primer.....	36
2.1.6 Adenovirale Konstrukte.....	40
2.1.7 Vektoren und Plasmide.....	40
2.1.8 Silencer® siRNA .....	41
2.1.9 Antikörper.....	41
2.1.10 Puffer und Lösungen.....	42
2.1.11 Medien .....	43
2.1.12 Zelllinien .....	44
2.1.13 Bakterien .....	45
2.1.14 Versuchstiere .....	45
2.2 Methoden.....	45
2.2.1 Mikrobiologische Methoden .....	45
2.2.2 Zellkulturmethoden.....	47
2.2.3 Molekularbiologische und biochemische Methoden .....	50
2.2.4 Tierversuche .....	64
2.2.5 Statistische Auswertung.....	67

---

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>69</b>
3.1	Systematische Suche nach unbekanntem kardialen Genen und deren Bestätigung .....	69
3.1.1	CEFIP ist ein herz- und skelettmuskel-spezifisches Protein .....	69
3.2	Die Untersuchung des kardialen CEFIP in der pathologischen Hypertrophie .....	74
3.2.1	CEFIP ist in <i>in vivo</i> Modellen der Hypertrophie reguliert .....	74
3.2.2	Humane DCM-Proben zeigen erhöhte <i>CEFIP</i> Spiegel .....	75
3.3	Einfluss von CEFIP auf die Hypertrophie <i>in vitro</i> .....	76
3.3.1	Adenovirale CEFIP-Überexpression führt zu Hypertrophie .....	76
3.3.2	CEFIP ist ein hochdynamisches Protein .....	78
3.4	CEFIP interagiert mit FHL2 und induziert eine Calcineurin abhängige Hypertrophie .....	80
3.4.1	CEFIP aktiviert den Calcineurin-NFAT Signalweg in NRVCMS .....	81
3.4.2	„Knockdown“ von CEFIP blockiert den Calcineurin-NFAT Signalweg in NRVCMS .....	82
3.4.3	Die Induktion der NFAT-Luciferase-Aktivität durch CEFIP ist nicht FHL2-abhängig .....	84
3.4.4	CEFIP reguliert nicht den SRF-Signalweg .....	85
3.4.5	CEFIP besitzt zwei Phosphorylierungsstellen .....	86
3.5	Charakterisierung CEFIP-defizienter Mäuse.....	88
3.5.1	CEFIP-Knockout Mäuse weisen erhöhte Spiegel bekannter Hypertrophiemarker auf .....	89
3.5.2	Auch einjährige CEFIP-defiziente Tiere zeigen keinen kardialen Phänotyp .....	93
3.6	Einfluss verschiedener Hypertrophie-Stimuli auf CEFIP-defiziente Tiere.....	95
3.6.1	CEFIP-Knockout Mäuse entwickeln unter Konstriktion der Aorta transversa eine kardiale Dysfunktion .....	96
3.6.2	Stimulation mit Isoproterenol führt bei CEFIP-Knockout Mäusen zur Vergrößerung des Herzens.....	100
3.6.3	Die Calcineurin-induzierte Hypertrophie wird durch CEFIP-Defizienz nicht verstärkt.....	104
3.7	Bestätigung des CEFIP-Einflusses in isolierten neonatalen Mauscardiomyozyten.....	110
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>113</b>
4.1	CEFIP ist ein neues Z-Scheibenprotein .....	113
4.2	Funktionelle Einordnung von CEFIP .....	114
4.3	Abhängigkeit der Hypertrophieinduktion von CEFIP .....	115
4.4	Rolle von CEFIP in Kardiomyopathien.....	117
4.5	CEFIP Funktion <i>in vivo</i> .....	118
4.6	Einfluss von CEFIP auf den aktivierten Calcineurin-NFAT Signalweg .....	122
4.7	<i>In vitro</i> vs. <i>in vivo</i> Ergebnisse.....	125
<b>5</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>127</b>
<b>6</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>129</b>
<b>VI</b>	<b>Erklärung.....</b>	<b>141</b>
<b>VII</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>145</b>
<b>VIII</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>147</b>
<b>IX</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>149</b>

# I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1–1: Klassifikation der Kardiomyopathien nach AHA 2006 .....	16
Abbildung 1–2: Klassifikation der Kardiomyopathien nach ESC 2008 .....	17
Abbildung 1–3: Krankheitsgene der Kardiomyopathie .....	18
Abbildung 1–4: Schematische Darstellung des Sarkomers.....	20
Abbildung 1–5: Schematische Darstellung der wichtigsten Signaltransduktionswege in der Herzhypertrophie.....	21
Abbildung 1–6: Die Z-Scheibe als wichtige Komponente in der Signaltransduktion .....	25
Abbildung 1–7: CEFIP Expression mittels Northern Blot.....	28
Abbildung 1–8: CEFIP Konstrukte für Y2H.....	28
Abbildung 1–9: Co-Immopräzipitation von CEFIP und FHL2 .....	29
Abbildung 3–1: Expression von CEFIP in Herz- und Skelettmuskulatur .....	70
Abbildung 3–2: Evolutionäre Konservierung von CEFIP .....	71
Abbildung 3–3: Computerbasierte Suche nach bekannten Domänen.....	72
Abbildung 3–4: Subzelluläre Lokalisation von CEFIP in NRVCN, ARVCN und murinem Gewebe.....	73
Abbildung 3–5: Regulation von <i>Cefip</i> in Modellen der myokardialen Hypertrophie .....	74
Abbildung 3–6: Regulation von <i>CEFIP</i> in ICM und DCM .....	75
Abbildung 3–7: Auswirkung der adenoviralen Überexpression von CEFIP in NRVCNs.....	77
Abbildung 3–8: Auswirkung des „Knockdowns“ von CEFIP in NRVCNs .....	78
Abbildung 3–9: Analyse der Mobilität von CEFIP in Myotuben .....	79
Abbildung 3–10: Bestätigung des identifizierten Interaktionspartner FHL2 mittels Co-Lokalisation .....	81
Abbildung 3–11: Modulation der NFAT-Luciferase-Aktivität in NRVCNs nach CEFIP Überexpression .....	82
Abbildung 3–12: Modulation der NFAT-Luciferase-Aktivität in NRVCNs nach CEFIP „Knockdown“ .....	83
Abbildung 3–13: Untersuchung eines additiven Effekts von FHL2 und CEFIP auf die NFAT- Luciferase-Aktivität.....	85
Abbildung 3–14: Einfluss von CEFIP auf die RhoA vermittelte SRF-Induktion .....	86
Abbildung 3–15: Identifizierung möglicher Phosphorylierungsstellen mittels Phosphoproteom- Studie .....	87
Abbildung 3–16: Generierung der konstitutiven CEFIP-Knockout Maus.....	88
Abbildung 3–17: Genotypisierung der CEFIP-Knockout Maus.....	89
Abbildung 3–18: Morphometrische Analyse 7 Wochen alter CEFIP-Knockout Mäuse .....	90
Abbildung 3–19: Echokardiographische Analyse 7 Wochen alter CEFIP-Knockout Mäuse .....	91
Abbildung 3–20: Quantitative Untersuchung des hypertrophen Genprogramms in 7 Wochen alten CEFIP-Knockout Mäusen.....	92
Abbildung 3–21: Morphometrische Analyse 1,5 Jahre alter CEFIP-Knockout Mäuse .....	93
Abbildung 3–22: Echokardiographische Analyse 1,5 Jahre alter CEFIP-Knockout Mäuse .....	94
Abbildung 3–23: Quantitative Untersuchung des hypertrophen Genprogramms 1,5 Jahre alter CEFIP-Knockout Mäuse.....	95

Abbildung 3–24: Morphometrische Analyse von CEFIP-Knockout Mäusen nach transversalen Aortenkonstriktion .....	97
Abbildung 3–25: Echokardiographische Analyse von CEFIP-Knockout Mäuse nach transversaler Aortenkonstriktion .....	99
Abbildung 3–26: Quantitative Untersuchung des hypertrophen Genprogramms von CEFIP-Knockout Mäusen nach transversaler Aortenkonstriktion .....	100
Abbildung 3–27: Morphometrische Analyse von CEFIP-Knockout Mäusen nach chronischer Isoproterenolstimulation.....	102
Abbildung 3–28: Echokardiographische Analyse von CEFIP-Knockout Mäusen nach chronischer Isoproterenolstimulation.....	103
Abbildung 3–29: Quantitative Untersuchung des hypertrophen Genprogramms von CEFIP-Knockout Mäusen nach chronischer Isoproterenolstimulation .....	104
Abbildung 3–30: Morphometrische Analyse von CnA-TG/CEFIP-KO Mäusen.....	106
Abbildung 3–31: Echokardiographische Analyse von CnA-TG/CEFIP-KO Mäusen.....	107
Abbildung 3–32: Quantitative Untersuchung des hypertrophen Genprogramms von CnA-TG/CEFIP-KO Mäusen .....	108
Abbildung 3–33: Vergleich der CEFIP-KO Herzen mit CnA-TG und deren Kreuzung.....	109
Abbildung 3–34: Auswirkung der Kreuzung von CnA-TG mit CEFIP-KO auf die Sterblichkeit.....	110
Abbildung 3–35: Regulation der NFAT-Luciferase-Aktivität in isolierten CEFIP-defizienten Kardiomyozyten .....	111
Abbildung 4–1: Modell des Calcineurin-NFAT Signalweges und der potentiellen Rolle von CEFIP .....	117
Abbildung 4–2: Calcineurin-NFAT Signalweg .....	123



## II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1–1: Auslösende Faktoren einer akuten Herzinsuffizienz (Laufs, Anker et al. 2016) .....	15
Tabelle 1–2: Ergebnisse der drei unabhängigen Y2H-Screens (Dierck, Kuhn et al. 2017) .....	29
Tabelle 2–1: Primer zur Generierung rekombinanter Adenoviren (Gateway Klonierung) .....	36
Tabelle 2–2: Primer zur Generierung mutagenisierter CEFIP-Konstrukte .....	36
Tabelle 2–3: Primer für Genotypisierung .....	37
Tabelle 2–4: Oligonukleotide zur Generierung rekombinanter anti-miR-Adenoviren .....	37
Tabelle 2–5: Primer für quantitative Real-Time PCR .....	38
Tabelle 2–6: Primer für quantitative Real-Time PCR .....	39
Tabelle 2–7: Adenovirale Kontrukte für Überexpressions- und Knockdownversuche in neonatalen Rattenkardiomyozyten .....	40
Tabelle 2–8: Silencer™ Select Pre-Designed siRNA von Thermo Fisher Scientific .....	41
Tabelle 2–9: Erstantikörper .....	41
Tabelle 2–10: Zweitantikörper .....	41
Tabelle 2–11: <i>E. coli</i> Bakterienstämme .....	45
Tabelle 2–12: NRVCM-Verteilung nach Versuchsaufbau .....	48
Tabelle 2–13: CEFIP-ORF-PCR mit der Pfu-Polymerase .....	52
Tabelle 2–14: Temperaturprofil der ORF-PCR .....	52
Tabelle 2–15: Reaktionsansatz für Real-Time PCR .....	58
Tabelle 2–16: Temperaturprofil der Real-Time PCR .....	58
Tabelle 2–17: Reaktionsansatz für Multiplex Real-Time PCR .....	59
Tabelle 2–18: Temperaturprofil der Real-Time PCR .....	59
Tabelle 2–19: Herstellung der Polyacrylamidgele .....	60
Tabelle 2–20: Bandengröße .....	64
Tabelle 2–21: PCR-Ansatz für Genotypisierung .....	65
Tabelle 2–22: Temperaturprofil Genotypisierung .....	65
Tabelle 3–1: Übersicht von Halbwertszeiten und mobilen Fraktionen von bekannten herzspezifischen Proteinen .....	80
Tabelle 3–2: Morphometrische Daten von CEFIP-KO im Vergleich zu Wildtypen im Alter von 7 Wochen .....	90
Tabelle 3–3: Echokardiographische Daten von CEFIP-Knockout Mäuse im Vergleich zu Wildtypen im Alter von 7 Wochen .....	91
Tabelle 3–4: Morphometrische Daten von CEFIP-Knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtypen im Alter von 1,5 Jahren .....	93
Tabelle 3–5: Echokardiographische Daten von CEFIP-Knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtypen im Alter von 1,5 Jahren .....	94
Tabelle 3–6: Morphometrische Daten von CEFIP-Knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtypen unter transversaler Aortenkonstriktion .....	96
Tabelle 3–7: Echokardiographische Daten von CEFIP-Knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtypen unter transversaler Aortenkonstriktion .....	98

## Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 3–8: Morphometrische Daten von CEFIP-Knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen nach 14-tägiger Isoproterenol-Stimulation.....	101
Tabelle 3–9: Echokardiographische Daten von CEFIP-Knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäuse nach 14-tägiger Isoproterenol-Stimulation.....	102
Tabelle 3–10: Morphometrische Daten von CEFIP-Knockout Tieren gekreuzt mit Calcineurin-TG Mäusen .....	105
Tabelle 3–11: Echokardiographische Daten von CEFIP-Knockout Tieren gekreuzt mit Calcineurin-TG Mäusen und deren Kontrolltieren .....	106

### III Abkürzungsverzeichnis

ΔCnA	Konstitutiv aktives Calcineurin A
°C	Grad Celsius
λ	Lambda
ad	bis zu
Ad	Adenovirus
ADS	Verdaupuffer mit Kollagenase und Pankreatin
AF	AlexaFluor®-Fluoreszenzfarbstoff
AHA	American Heart Association
Ala	Alanin
ANF	Atrial Natriuretic Factor
APS	Ammouniumpersulfat
ARVCM	Adulte Rattenkardiomyozyten
bp	Basenpaare
BNP	Brain Natriuretic Factor
BSA	Bovine Serum Albumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cDNA	complementary DNA
CMV	Cytomegalovirus
CnB	Calcineurin B
d	Diastole
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethyldicarbonat
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EF	Ejektionsfraktion
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FS	Fractional Shortening

## Abkürzungsverzeichnis

---

g	Gramm
gln	Glutamin
h	Stunden
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HG	Herzgewicht
HRP	Horseradish Peroxidase
hsa	<i>homo sapiens</i>
ICM	Ischämische Kardiomyopathie
IF	Immunofluoreszenz
IVS	Wandstärke des Septums (Interventrikular Septum)
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KO	Knockout
L	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LV	Linker Ventrikel
LVID	linksventrikulärer Diameter (Left Ventrikular Internal Diameter)
LVPW	Stärke der Hinterwand (Left Ventrikular Posterior Wall)
M	Molar
MAP	Mitogen Activated Protein
miR-Ktr.	Kontroll micro-RNA
min	Minute
miRNA	Micro-RNA
mmu	<i>mus musculus</i>
mL	Milliliter
MLP	Muscle-LIM-Protein
mRNA	messenger RNA
N	Normalität
NCS	Newborn Calf Serum
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
Nppa	natriuretisches Peptid Typ A
Nppb	natriuretisches Peptid Typ B
nm	Nanometer
NRVCM	Neonatale Rattenkardiomyozyten
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte

---

ORF	Open Reading Frame
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phenylephrin
PFA	Paraformaldehyd
Pos.	Position
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative Real-Time PCR
Rcan	Regulator von Calcineurin
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
rno	<i>rattus norvegicus</i>
rpm	Umdrehungen pro minute
RT	Raumtemperatur
s	Systole
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SEM	Standardfehler
siRNA	small interfering RNA
SRF	Serum Response Factor
SRF-RE	Serum Response Factor Response Element
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TAC	transversale Aortenkonstriktion
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBST	Tris-Buffered Saline Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TG	Transgen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
U	Units
UV	Ultraviolett
Veh.	Vehikel
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
x g	Zentrifugalbeschleunigung



## IV Zusammenfassung

Die Z-Scheibe des Sarkomers ist ein subzellulärer Knotenpunkt in Kardiomyozyten, der sowohl für die Strukturhaltung als auch für die Signaltransduktion eine zentrale Rolle spielt. Viele Z-Scheibenproteine konnten bereits im Zusammenhang mit genetischen Kardiomyopathien und Muskelerkrankungen beschrieben werden. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. N. Frey konnten in systematischen *in silico* Screening-Experimenten neue, noch unbekannte Z-Scheibenproteine identifiziert werden, dabei auch das 230 kDa große Protein CEFIP (Cardiac Enriched FHL2 Interacting Protein). Seine herz- und skelettmuskelspezifische Expression konnten mittels quantitativer Real-Time PCR (163-fache Expression im Herzen; 384-fache Expression im Skelettmuskel) und Northern Blot bestätigt werden. Analysen in bekannten Modellen der Kardiomyopathie zeigten, dass *Cefip* auf mRNA-Ebene in Muscle-LIM-Protein-Knockout Mäusen (MLP-KO;  $2,94 \pm 0,5$ -fach,  $p < 0,05$ ) und in Calsarcin-1-Knockout Mäusen (CS1-KO;  $1,93 \pm 0,4$ -fach,  $p < 0,001$ ) signifikant hochreguliert ist. Ebenfalls in humanen Proben von dilatativen (DCM) und hypertrophen Kardiomyopathien (HCM) war *CEFIP* verstärkt exprimiert. Um CEFIP genauer zu charakterisieren, wurden adenovirale Konstrukte zur Überexpression und Herunterregulation von CEFIP generiert, wodurch Versuche in An- und Abwesenheit von CEFIP möglich waren. In neonatalen Kardiomyozyten führte eine Überexpression von CEFIP zu einer Induktion der hypertrophen Genmarker wie ANF (*Nppa*; 2,36-fach) und BNP (*Nppb*; 1,63-fach). Eine Herunterregulation der CEFIP-Expression um 80 % beeinflusst diese Marker nicht. Die Durchführung von Yeast 2-Hybrid Analysen konnte potentielle Bindungs- und Interaktionspartner von CEFIP entschlüsseln, wie das bereits charakterisierte Titin und Filamin-bindende Protein FHL2 (Four and a Half Lim domains Protein 2). Die Interaktion zwischen FHL2 und CEFIP konnte durch Co-Immunopräzipitation und Co-Lokalisation bestätigt werden. FHL2 spielt in der Calcineurin-abhängigen Myokardhypertrophie eine wichtige Rolle, in dem es durch Calcineurinbindung eine solche Hypertrophie reduzieren kann. Analysen von CEFIP im Calcineurin-NFAT Signalweg zeigen, dass eine Überexpression in Kardiomyozyten die NFAT-Luciferase-Reporteraktivität steigert und dieses Signal durch zugeführtes konstitutiv aktives Calcineurin noch weiter gesteigert werden kann, während eine Herunterregulation von CEFIP die Luciferase-Aktivität unterdrückt. Gleichzeitige Herunterregulation von FHL2 und Überexpression von CEFIP führte jedoch zu keinem additiven Effekt auf die NFAT-Luciferase-Reporteraktivität. Um die Rolle von CEFIP im gesamten Organismus zu bewerten, wurde eine CEFIP-Knockout Maus generiert, die sich bis zu einem Alter von über 20 Monaten normal entwickelte und keine kardialen Dysfunktionen aufzeigte. Nachdem die Auswirkungen des CEFIP-Knockouts in der Maus unter unterschiedlichen prohypertrophen Bedingungen getestet wurden, konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass die CEFIP-Deletion die Calcineurin-vermittelte Induktion

## Zusammenfassung

---

der Hypertrophie verzögert. Zusammenfassend konnte CEFIP als neuer Modulator im Calcineurin-NFAT Signalweg identifiziert werden, was ein neuer Beitrag zum Verständnis der Myokardhypertrophie ist und einen möglichen neuen Ansatzpunkt für Therapien von Herzerkrankungen darstellt.



## V Abstract

The sarcomeric z-disc has been recognized as a nodal point in cardiomyocyte function and signaling. Numerous z-disc proteins have been associated with cardiomyopathies and muscle diseases. Performing an „*in silico*“ screen for novel cardiac specific cDNAs many unknown heart and skeletal muscle specific proteins were discovered, like the 230 kDa protein CEFIP (Cardiac Enriched FHL2 Interacting protein). Via quantitative real-time PCR (163-fold enrichment in heart, 384-fold in skeletal muscle) and Northern blot the specific expression pattern was confirmed. First the differential expression of CEFIP in models of heart disease was examined. CEFIP mRNA was upregulated in cardiomyopathy, as observed in muscle-LIM-protein-knockout mice (MLP-KO,  $2.94 \pm 0.5$ -fold,  $p < 0.05$ ) and calsarcin1-KO animals (CS1-KO,  $1.93 \pm 0.4$ -fold,  $p < 0.001$ ). Consistently, the expression level of CEFIP mRNA was significantly higher in samples of myocardial tissue from human patients suffering from ischemic (ICM) or dilated (DCM) cardiomyopathy compared with non-failing controls. To further characterize the role of CEFIP in cardiomyocytes adenoviral constructs encoding for CEFIP and a synthetic miRNA targeting CEFIP to allow gain and loss of functions experiments were generated. Overexpression of CEFIP in cultivated neonatal rat cardiomyocytes led to induction of the hypertrophic gene markers such as ANF (*Nppa*, 2.36-fold) and BNP (*Nppb*, 1.63-fold). Conversely, miRNA-mediated 80 % downregulation of CEFIP did not modulate the expression pattern of these markers. In order to identify potential binding and interacting partners of CEFIP a yeast two-hybrid screen was performed. Several clones encoding FHL2 (Four and a Half Lim domains protein 2), a well-known titin and filamin binding protein, were identified. Co-immunoprecipitation and co-immunostaining confirmed the interaction between FHL2 and CEFIP. Of note, FHL2 has been found to repress pathological cardiac growth via calcineurin, a key phosphatase controlling cardiac hypertrophy. Therefore the effect by CEFIP in calcineurin signaling was further examined. Overexpression of CEFIP increased NFAT-luciferase-reporter activity with further signal enhancement in the presence of constitutively active calcineurin. Conversely, downregulation of CEFIP repressed NFAT-luciferase-reporter activity. Interestingly, simultaneous downregulation of the interacting partner FHL2 and overexpression of CEFIP at the same time did not show an additive increase of NFAT-luciferase-reporter activity. Given these *in vitro* data, a constitutive CEFIP-knockout mouse was generated. The knockout mice developed normally until the age of 20 months and did not show cardiac dysfunction as assessed by echocardiography. Inducing hypertrophic stimuli in CEFIP deficient mice revealed that the absence of CEFIP can blunt the calcineurin-induced hypertrophic response *in vivo*. To summarize, the previously uncharacterized protein CEFIP is introduced as a new modulator of the calcineurin-NFAT signaling and hypothesized to play a critical role in calcineurin-dependent hypertrophic signal transduction. These findings provide a novel

## Abstract

---

insight into the pathogenesis of cardiac hypertrophy and could lead to new therapeutic approaches.

# 1 Einleitung

## 1.1 Kardiomyopathien

Herz-Kreislauf-Erkrankungen zählten 2015 in Deutschland mit 39 % zu den weitaus häufigsten Todesursachen (Bundesamt 2017) und Gründen für vollstationäre Krankenhausaufenthalte. Allein 2,3 % der vollstationär behandelten Patienten hatten davon als Behandlungsanlass eine akute Herzinsuffizienz (Bundesamt 2016). Die Inzidenz von kardialen Erkrankungen nimmt durch Risikofaktoren wie Nikotinkonsum, Adipositas und Hypertonie weiterhin zu (Bonneux, Barendregt et al. 1994). Die Herzinsuffizienz ist ein Syndrom mit Symptomen, wie Dyspnoe und Müdigkeit, sowie typischen klinische Zeichen, zu denen periphere Ödeme und gestaute Halsvenen gehören, bedingt durch strukturelle oder funktionelle Abnormalitäten des Herzens (Ponikowski, Voors et al. 2016). Unterscheiden lässt sich hierbei die Herzinsuffizienz mit reduzierter und mit erhaltener systolischer Pumpfunktion. Die akute Herzinsuffizienz ist das rasche Einsetzen oder die Verschlechterung der Symptome und ein lebensbedrohlicher Zustand, welcher dringlicher Behandlung bedarf. Sie kann als Erstmanifestation einer Herzinsuffizienz oder in Form einer akuten Dekompensation einer chronischen Herzinsuffizienz auftreten. Als auslösende Faktoren kommen sowohl äußere Faktoren als auch eine zunehmende kardiale Dysfunktion in Frage (Tabelle 1-1) (Ponikowski, Voors et al. 2016).

**Tabelle 1–1: Auslösende Faktoren einer akuten Herzinsuffizienz (Laufs, Anker et al. 2016)**

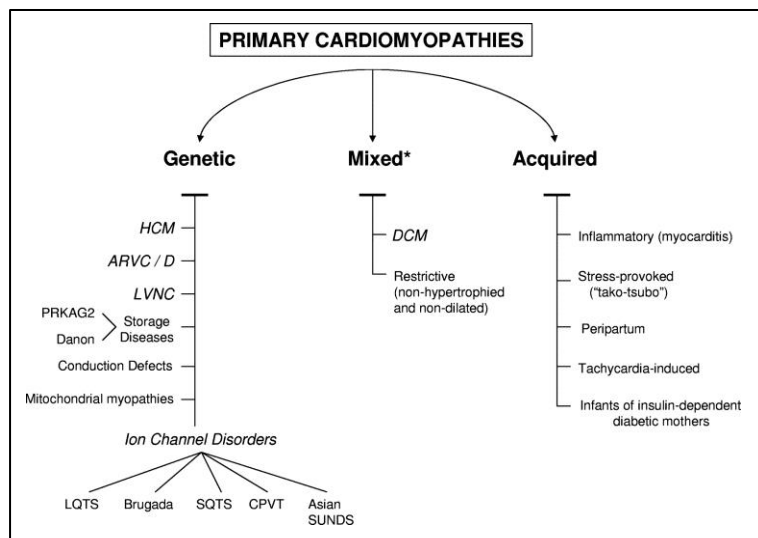
<b>Tabelle 4: Auslösende Faktoren einer akuten Herzinsuffizienz</b>
Akutes Koronarsyndrom.
Tachyarrhythmien (z.B. Vorhofflimmern, Kammertachykardie).
Übermäßiger Blutdruck-Anstieg.
Infektion (z.B. Pneumonie, infektiöse Endokarditis, Sepsis).
Mangelnde Compliance bezüglich Salz/Flüssigkeits-Aufnahme oder Medikamenten-Einnahme.
Bradyarrhythmie.
Toxische Substanzen (Alkohol, "Partydrogen").
Medikamente (z.B. NSAID, Kortikosteroide, negativ inotrope Substanzen, kardiotoxische Chemotherapeutika).
Exazerbation einer chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung.
Lungenembolie.
Chirurgischer Eingriff und perioperative Komplikationen.
Erhöhter sympathischer Antrieb, Stress-bedingte Kardiomyopathie.
Metabolische/hormonelle Entgleisungen (z.B. Schilddrüsendysfunktion, diabetische Ketose, adrenale Dysfunktion, Schwangerschaft und peripartale Auffälligkeiten).
zerebrovaskulärer Insult
Akute mechanische Ursachen: Myokardruptur als Komplikation eines ACS (Ruptur der freien linksventrikulären Wand, Ventrikelseptumdefekt, akute Mitralinsuffizienz), Thoraxtrauma oder kardiale Intervention, akute Nativ- oder Prothesen-Klappeninsuffizienz infolge einer Endokarditis, Aortendissektion oder Thrombose.

Die chronische Herzinsuffizienz hingegen entwickelt sich über einen längeren Zeitraum und kann in Folge unterschiedlicher Erkrankungen wie koronare Herzkrankheit, arterielle

Hypertohie oder auch Kardiomyopathien entstehen (Hiramitsu & Hishida 2007; Bundesärztekammer (BÄK) 2017).

Kardiomyopathien repräsentieren eine Gruppe Erkrankungen des Myokards, die zu Veränderungen der Herzgröße, Form und Funktion führen können. Kardiomyopathien werden nach dem Phänotyp klassifiziert. Kardiomyopathien können asymptomatisch verlaufen, aber auch zu Herzinsuffizienz führen. Bisher wurden zwei unterschiedliche Klassifikationen veröffentlicht in denen auch genetische Grundlagen für Kardiomyopathien berücksichtigt werden (McKenna, Maron et al. 2017).

2006 legte die American Heart Association (AHA) eine Einteilung in primäre und sekundäre Kardiomyopathien dar (Maron, Towbin et al. 2006) (Abbildung 1-1). Die primär vorkommenden Kardiomyopathien sind dabei am häufigsten und können genetisch bedingt sein. Sie sind hauptsächlich auf den Herzmuskel beschränkt, während die sekundären durch eine systemische Erkrankung, die mehrere Organe betrifft (zum Beispiel Diabetes mellitus, Amyloidose), ausgelöst werden. Diese Abgrenzung ist aber gerade in der Klinik nicht so strikt durchzuführen (McCartan, Mason et al. 2012).

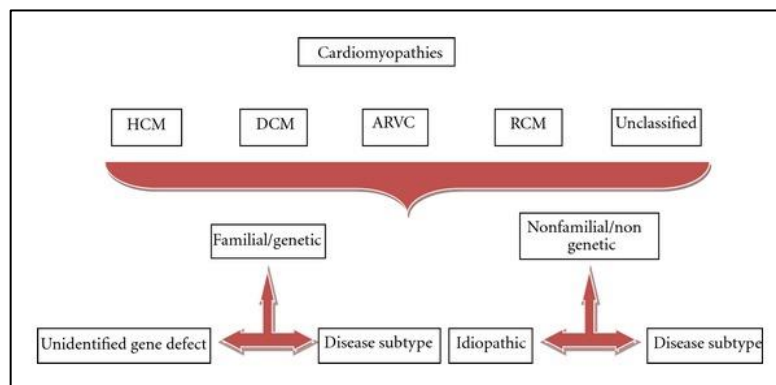


**Abbildung 1–1: Klassifikation der Kardiomyopathien nach AHA 2006**

Primäre Kardiomyopathien werden nach genetisch, gemischt oder erworben eingeteilt. Bei ihnen ist der klinisch relevante Krankheitsprozess überwiegend am Myokard beteiligt. Sekundäre werden hier nicht aufgelistet (Maron, Towbin et al. 2006).

Eine weitere Klassifizierung der Kardiomyopathien wurde 2008 von der „European Society of Cardiology“ (ESC) vorgestellt (Elliott, Andersson et al. 2008) (Abbildung 1-2). Hierbei wurden Kardiomyopathien als Funktionsstörungen beschrieben, welche durch strukturelle und funktionelle Veränderungen des Myokards und nicht durch koronare Herzerkrankungen, Bluthochdruck oder erblich bedingter Herzschwäche hervorgerufen werden. Die

Eingruppierung erfolgt nach morphologisch-funktionellen Phänotypen in dilatative (DCM), hypertrophe (HCM), restriktive (RCM) und arrhythmogene rechtsventrikuläre (ARVC) Kardiomyopathien oder nicht klassifizierbare Kardiomyopathien. Besonders die Unterteilung in familiäre/genetische oder nicht-familiäre/nicht genetisch bedingte Kardiomyopathien wird hier hervorgehoben (McCartan, Mason et al. 2012), wobei sie als familiär gelten sobald mehr als ein Mitglied der Familie von der Mutation betroffen ist (Arbustini, Narula et al. 2013).



**Abbildung 1–2: Klassifikation der Kardiomyopathien nach ESC 2008**

Kardiomyopathien werden besonders unter dem genetischen Fokus unterteilt. In erster Linie aber nach hypertropher (HCM), dilatativer (DCM), arrhythmogener (ARVC) und restriktiver (RCM) Kardiomyopathie (Elliott, Andersson et al. 2008).

Die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist eine genetische Erkrankung und wird durch Mutationen von Sarkomer-Genen hervorgerufen. Kennzeichen hierfür ist eine primäre Hypertrophie des linken bzw. selten des rechten Ventrikels, die auch zu einer Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstrakts führen kann und bis zu 60 % familiär auftritt (Marian & Braunwald 2017). Dabei ist die diastolische Funktion gestört. Die systolische Funktion des linken Ventrikels kann unverändert sein. Die hypertrophe Kardiomyopathie betrifft Männer und Frauen gleichermaßen und ist nicht altersspezifisch. Jeder 500ste Mensch ist von dieser kardialen Erkrankung betroffen. Kardiale Arrhythmien, Herzinsuffizienz oder sogar plötzlicher Herztod können Folgen einer HCM sein (Maron, Towbin et al. 2006).

Die HCM wird auch als Krankheit des Sarkomers bezeichnet, da ihr häufig Einzelmutationen in Genen zugrunde liegen, die für verschiedene kontraktile Proteine des kardialen Sarkomers kodieren (Seidman & Seidman 2001; Alcalai, Seidman et al. 2008). Bisher konnten über 1400 Mutationen in mehr als 27 Genen, wovon 18 Gene sarkomerspezifisch sind, identifiziert werden (Friedrich & Carrier 2012; Ho, Charron et al. 2015; McNally, Barefield et al. 2015). Circa 80 % der zur HCM führenden Mutationen wurden in den Genen für die  $\beta$ -Myosin-Schwerkette (MYH7) und das myosinbindende Protein C (MYBPC3) nachgewiesen (Alcalai, Seidman et al. 2008; Kensler, Shaffer et al. 2011).

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist charakterisiert durch eine Dilatation der Herzkammern und durch eine verminderte Pumpfunktion. Durch die strukturellen Veränderungen des Myokards kann es zu Arrhythmien, Herzklappenfehlern und einer stark eingeschränkten Ejektionsfraktion kommen. Die DCM zählt neben der KHK und der arteriellen Hypertonie zu den häufigsten Ursachen der Herzinsuffizienz und gilt als häufigster Grund für Herztransplantationen (Maron, Towbin et al. 2006). Fast die Hälfte der DCM-Patienten haben einen familiären Hintergrund (Grunig, Tasman et al. 1998; Frey & Katus 2008) für welche bisher mehr als 40 verantwortliche Gene identifiziert werden konnten (Towbin & Bowles 2002; Dellefave & McNally 2010). Im Gegensatz zur HCM werden diese Krankheitsgene an verschiedenen Orten in der Zelle exprimiert (Frey & Katus 2008).

Bei der DCM werden häufig auch Mutationen in sarkomeren Proteinen gefunden, die auch bei der Entstehung von HCM beteiligt sind, zum Beispiel Troponine I und C (Abbildung 1-3).

HCM			DCM	
GLA	ACTC1	MYH6	ABCC9	NEBL
MYL2	ACTN2	MYH7	CRYAB	RBM20
MYL3	ANKRD1	NEXN	CTF1	SCN5A
MYLK2	BAG3	PLN	EMD	SGCD
MYOZ2	CAV3	TNNC1	FHL2	TAZ
PRKAG2	CSRP3	TNNI3	GATAD1	TCAP
TTR	LAMP2	TNNT2	LAMA4	TMPO
	LDB3	TPM1	LMNA	
	MYBPC3	VCL		
RYR2		TTN	DES	DSP
			DSC2	PKP2
			DSG2	
CASQ2		JUP		TMEM43
		ARVC		

**Abbildung 1–3: Krankheitsgene der Kardiomyopathie**

Für HCM (pink) oder DCM (blau) konnten bereits viele Gene identifiziert werden. Einige können sowohl für die HCM als auch für die DCM verantwortlich sein (lila). Auch die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie kann mit Mutationen in Genen assoziiert werden (grün) (McNally, Barefield et al. 2015).

## 1.2 Kardiale Hypertrophie

Die makroskopischen und mikroskopischen Veränderungen des Herzens, die bei der Herzhypertrophie zu sehen sind, weisen nicht automatisch auf eine spezifische Erkrankung hin. Bei steigender Druck- und Volumenbelastung reagiert das Herz mit Hypertrophie und/oder Dilatation.

Bei anhaltender Steigerung des Druckes auf das Herz kommt es zur kompensatorischen Zunahme der Myokardmasse, bedingt durch Vergrößerung der Zellen (Sugden & Clerk

1998), da Kardiomyozyten als terminal differenzierte Zellen nicht fähig sind sich zu teilen. Die Herzhypertrophie kann prinzipiell in drei Klassen eingeteilt werden: die entwicklungsbedingten, die physiologischen und die pathologischen Herzhypertrophie.

Die entwicklungsbedingte Hypertrophie bezeichnet das normale Herzwachstum von der Geburt bis zum Erwachsenenalter.

Die physiologische Hypertrophie ist hauptsächlich mit gesteigertem Training (Sportlerherz) oder Schwangerschaft assoziiert und reversibel. Hierbei nehmen Wanddicke der Ventrikel und des Septums in gleichem Maße (exzentrisch) zu wie der Innendurchmesser des Ventrikels (Heineke & Molkentin 2006). Im Gegensatz zur pathologischen Hypertrophie findet hier keine Aktivierung des hypertrophie-assoziierten Genprogramms oder Fibrose statt. Das Herz ist einem erhöhten biomechanischen Stress ausgesetzt und normalisiert durch die Hypertrophie die ventrikuläre Wandspannung und Herzfunktion (Norton 2001).

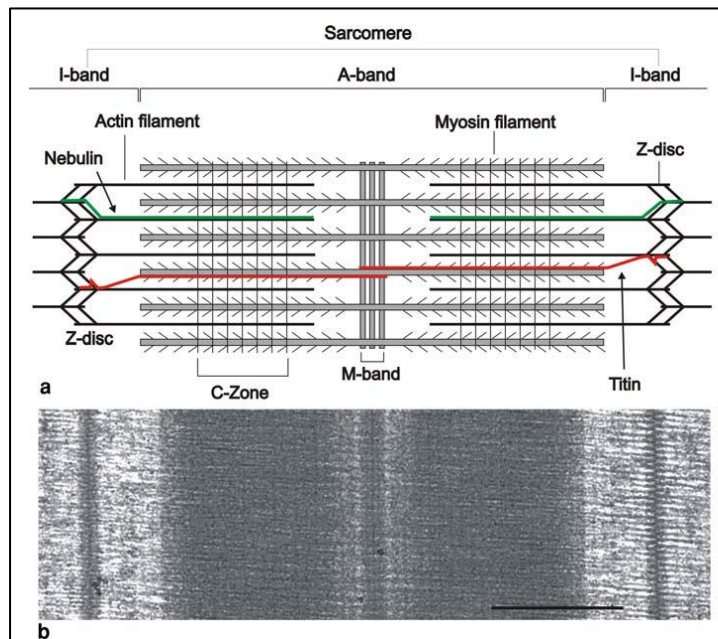
Bei der pathologischen Hypertrophie hingegen steht das so genannte ventrikuläre „Remodeling“ im Vordergrund. Dieses wirkt sich sowohl auf die Herzfunktion als auch auf den Energieverbrauch negativ aus. Die Herzmuskelwände verdicken sich konzentrisch und verkleinern so das Ventrikelvolumen. Dies führt zu einem verminderten Pumpvolumen. In der pathologischen Hypertrophie verlieren die Herzen auch an Elastizität (Heineke & Molkentin 2006). Auslöser für die Entstehung der Hypertrophie sind extrinsische oder intrinsische Stress-Faktoren. Extrinsische Faktoren sind Herzklappendefekte oder auch arterieller Bluthochdruck (Frey & Olson 2003), während es sich bei den intrinsischen Faktoren z. B. um Gendefekte in Sarkomer-Proteinen handelt. Bei der pathologischen Hypertrophie kann aus dem konzentrischen Wachstum durch anschließende Dilatation eine exzentrische Hypertrophie werden, welche bis zur Herzinsuffizienz führen kann. Auch die myokardialen Fibrosen nehmen zu, so dass es zum vermehrten Absterben von Kardiomyozyten und zur Aktivierung des fötalen hypertrophie-assoziierten Genprogramms kommt. Hierbei werden die typischen hypertrophen Gene wie ANF (Atrial Natriuretic Factor, Transkript *Nppa*), BNP (Brain Natriuretic Peptide, Transkript *Nppb*) und Skelettmuskel-Alpha-Actin (*Acta1*) induziert (Chien, Knowlton et al. 1991). Ebenso nimmt die kardiale Dysfunktion zu und es kann der plötzliche Herztod auftreten (Frey & Olson 2003; Heineke & Molkentin 2006; Porrello, Widdop et al. 2008).

Damit wird die Hypertrophie als prognostisch relevanter, unabhängiger Risikofaktor für die Herzinsuffizienz eingestuft (Levy, Garrison et al. 1990).

### **Signalwege in der pathologischen Hypertrophie**

In der quergestreiften Muskulatur, also auch im Herzen, bildet das Sarkomer die kleinste funktionell kontraktile Einheit und setzt sich aus dünnen und dicken Filamenten sowie Titin- und Nebulinfilamenten zusammen. Das dicke Filament wird durch schwere und leichte

Myosinketten und das Myosin-Bindungsprotein C aufgebaut. Zu dem dünnen Filament zählen  $\alpha$ -Aktin,  $\alpha$ -Tropomyosin und der Troponinkomplex. Untereinander werden die in Reihe angeordneten Sarkomere von der Z-Scheibe begrenzt, in der die dünnen Filamente benachbarter Sarkomere überlappen (Abbildung 1-4 a). Die hellen I-Banden bestehen aus dem dünnen Filament, hauptsächlich aus Aktin, während die dunklen A-Banden die Region des dicken Filaments hauptsächlich Myosin enthalten (Abbildung 1-4 b).



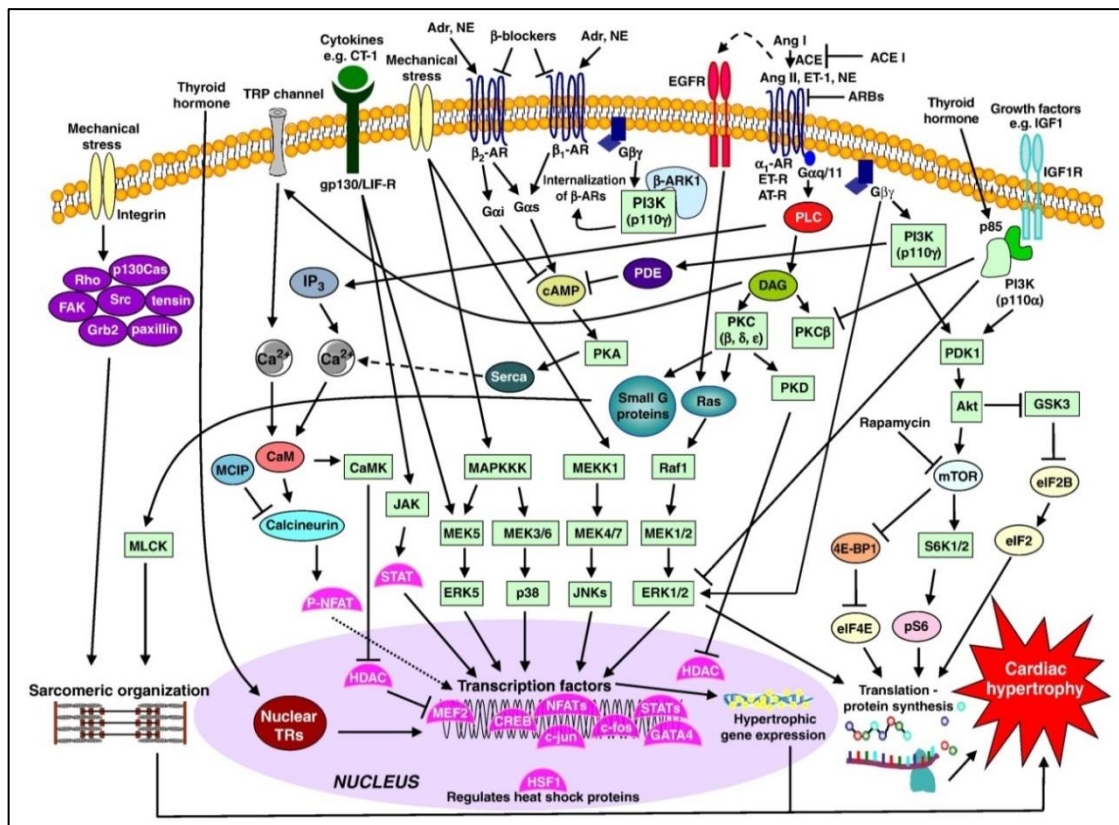
**Abbildung 1–4: Schematische Darstellung des Sarkomers**

(a), Die Z-Scheibe als laterale Begrenzung des Sarkomers dient der Verankerung von Aktinfilamenten, die wiederum mit Myosinfilamenten interagieren, um so eine Verkürzung des Sarkomers zu bewerkstelligen (b), Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Sarkomers (Luther 2009).

Speziell an der Z-Scheibe ist neben den Strukturproteinen eine Vielzahl von Signalproteinen lokalisiert. Damit hat die Z-Scheibe nicht allein die Funktion der Strukturhaltung sondern ist ein Schnittpunkt vieler Signalkaskaden.

Viele dieser Signalwege sind an der Induktion der Hypertrophie beteiligt und an der zellulären Antwort auf extrinsische (Druck- oder Volumenbelastung) oder intrinsische (familiäre HCM) Stimuli (Frey & Olson 2003). Zu den wichtigsten Signalwegen im Herzen gehören unter anderem die Signalkaskaden der G-Protein gekoppelten Rezeptoren ( $G_s$ -,  $G_{q/11}$ - und  $G_i$ ), der MAPK-, PI3K- und auch der Calcineurin-NFAT Signalweg (Frey & Olson 2003; Bernardo, Weeks et al. 2010) (Abbildung 1-5). Werden diese Signalwege dauerhaft aktiviert, kommt es zum Remodeling, welches eine Veränderung der Zellstruktur und Zellfunktion darstellt.





**Abbildung 1–5: Schematische Darstellung der wichtigsten Signaltransduktionswege in der Herzhypertrophie**

Zusammenfassung der in der Hypertrophie beteiligten Signalwege und deren Interaktionen innerhalb einer Zelle (Bernardo, Weeks et al. 2010). Hervorzuheben ist der Calcineurin-NFAT Signalweg, welcher bei der Entstehung der Herzmuskelhypertrophie eine große Bedeutung hat.

**Die GPCR-abhängige Signalweiterleitung**

Eine zentrale Rolle bei der Aktivierung pathologischer Signalwege und Weiterleitung hypertropher Signale nehmen die G-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Sie gehören zu den 7-Transmembranrezeptoren und jedes G-Protein setzt sich aus  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ - Untereinheiten zusammen. Durch die GPCR-abhängige Konformationsänderung im G-Protein können  $G_s$  und  $G_{\beta\gamma}$  dissoziierten und verschiedene Signalmoleküle aktivieren oder auch inhibieren (Molkentin & Dorn 2001). Je nach spezifischer Wirkung des GPCRs können die unterschiedlichen Klassen der G-Proteine ( $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_{q/11}$ ) aktiviert werden (Frey & Olson 2003). Zu den  $G_s$ -gekoppelten GPCRs gehören die  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren. Durch Stimulation des  $G_s$ -gekoppelten Signalwegs wird die Adenylatzyklase aktiviert, welche ATP zu zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) umsetzt und somit die Protein Kinase A (PKA) aktiviert (Molkentin & Dorn 2001). Dies führt zu einer Erhöhung der Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten und die langfristige Stimulation dieses Signalweges zu Arrhythmien, Hypertrophie und Herzversagen (Scoote & Williams 2004; Marian 2006).

Entgegengesetzt dazu sind die  $G_i$ -gekoppelten Rezeptoren inhibitorische Proteine, welche

hemmend auf die Aktivierung der Adenylatzyklase wirken. Sie werden über die muskarinerge Rezeptoren M2 und M4 sowie über den  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptor aktiviert (Frey & Olson 2003).

$G_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren, zu denen  $\alpha$ 1-adrenerge- und muskarinerge GPCRs bzw. Rezeptoren für Endothelin-1 und Angiotensin II gehören, können über die Aktivierung der Phospholipase C $\beta$  (PLC $\beta$ ) die Bildung der Signalmoleküle Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) induzieren. IP3 fördert eine schnelle  $Ca^{2+}$ -Freisetzung, wodurch wiederum Calcineurin aktiviert und somit Hypertrophie induziert wird. DAG hingegen aktiviert die Protein Kinase C (PKC), welche verschiedenste Signalkaskaden (MEK/ERK1/2) auslöst und somit an der Regulation der Transkription Hypertrophieinduktion beteiligt ist (Molkentin & Dorn 2001).

### **PI3K-Signalweg**

Der PI3K-Signalweg spielt sowohl in der physiologischen als auch in der pathologischen Hypertrophie eine Rolle (Bernardo, Weeks et al. 2010). Die Aktivierung des physiologischen Signalweges erfolgt durch die Isoform Phosphatidylinositol-3-Kinase *p110 $\alpha$*  und dessen Bindung von Wachstumsfaktoren wie Insulin, IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*) und EGF (*Epidermal growth factor*) an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK). Die pathologische Hypertrophie wird durch PI3K *p110 $\gamma$*  induziert und wird durch Agonisten wie Endothelin-1, Angiotensin II oder Katecholamine (GPCR), oder auch durch Druckbelastung ( $G\beta\gamma$ ) stimuliert (Schluter, Goldberg et al. 1998; Naga Prasad, Esposito et al. 2000; Cantley 2002). Beide führen zu Zellwachstum und Differenzierung. Das aktivierte PI3K kann an der Plasmamembran die Umwandlung von PIP2 zu PIP3 katalysieren, welche wiederum die Kinasen Akt und PDK1 binden können. Dadurch kann Akt phosphoryliert werden und ins Zytoplasma und in den Zellkern translozieren (Osaki, Oshimura et al. 2004; Manning & Cantley 2007). Entscheidend für die Ausbildung einer Hypertrophie scheinen das Expressionsniveau und die Dauer der Akt-Aktivierung zu sein (Shiojima, Sato et al. 2005). Die Aktivierung von mTOR, einem positiven Modulator des Zellwachstums, durch Akt und die Deaktivierung des negativen Regulators GSK3 $\beta$  resultieren in vermehrter Proteinsynthese und somit in der Induktion der kardialen Hypertrophie (Morisco, Zebrowski et al. 2000; Morisco, Seta et al. 2001; Fingar, Salama et al. 2002; McMullen, Sherwood et al. 2004).

### **MAPK-Signalweg**

Die MAPKs (*mitogen-aktiviert protein kinase*) werden entsprechend ihrer terminalen Kinase im Signalweg in drei Unterfamilien eingeteilt: der ERKs (*extracellular-signalregulated kinase*), der JNKs (*c-Jun amino-terminal kinase*) und der p38-MAPKs. Sie alle stellen über Phosphorylierung und Regulierung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren eine Verbindung

zwischen extrinsischen Stimuli und Zellkern dar, und sind somit an der Regulation hypertropher Gene beteiligt (Garrington & Johnson 1999; Frey & Olson 2003; Heineke & Molkentin 2006). Durch Bindung der G-Protein gekoppelten Rezeptor- (GPCR) Agonisten an ihre entsprechenden Rezeptoren, wie AT1-, ET- und  $\alpha$ 1-adrenerger Rezeptor, erfolgt die Aktivierung  $G_{\alpha q}$ -vermittelt (Tilley 2011). Ebenso aktivieren zytotoxische oder mechanische (Druckbelastung) Stressfaktoren die Signalwege (Sugden & Clerk 1998; McKinsey & Olson 1999). Nachgeschaltet wird eine Kaskade an unterschiedlichen Kinasen aktiviert, welche in der Phosphorylierung und Aktivierung der drei terminalen Kinasen (ERK, JNK, p38) endet. Diese Kinasen können Transkriptionsfaktoren im Zellkern aktivieren und so die hypertrophe Genexpression regulieren (Bernardo, Weeks et al. 2010). Die wichtige Rolle dieser MAPK-Signalwege in der Entstehung der kardialen Hypertrophie konnte bereits in vielen Veröffentlichungen gezeigt werden (Sugden & Clerk 1998; Yamazaki, Komuro et al. 1999; Bueno, De Windt et al. 2000; Haq, Choukroun et al. 2001; Frey & Olson 2003). So führt die Überaktivierung von ERK1/2 zu einer konzentrischen Hypertrophie (Bueno, De Windt et al. 2000). Eine gesteigerte Aktivierung der MAP-Kinasen konnte ebenfalls im dekompensierten hypertrophen Herzen und in Myozyten, welche mechanischem Stress ausgesetzt waren, nachgewiesen werden (Yamazaki, Komuro et al. 1999; Haq, Choukroun et al. 2001; Heineke & Molkentin 2006; Bernardo, Weeks et al. 2010).

### **Der Calcineurin-NFAT Signalweg**

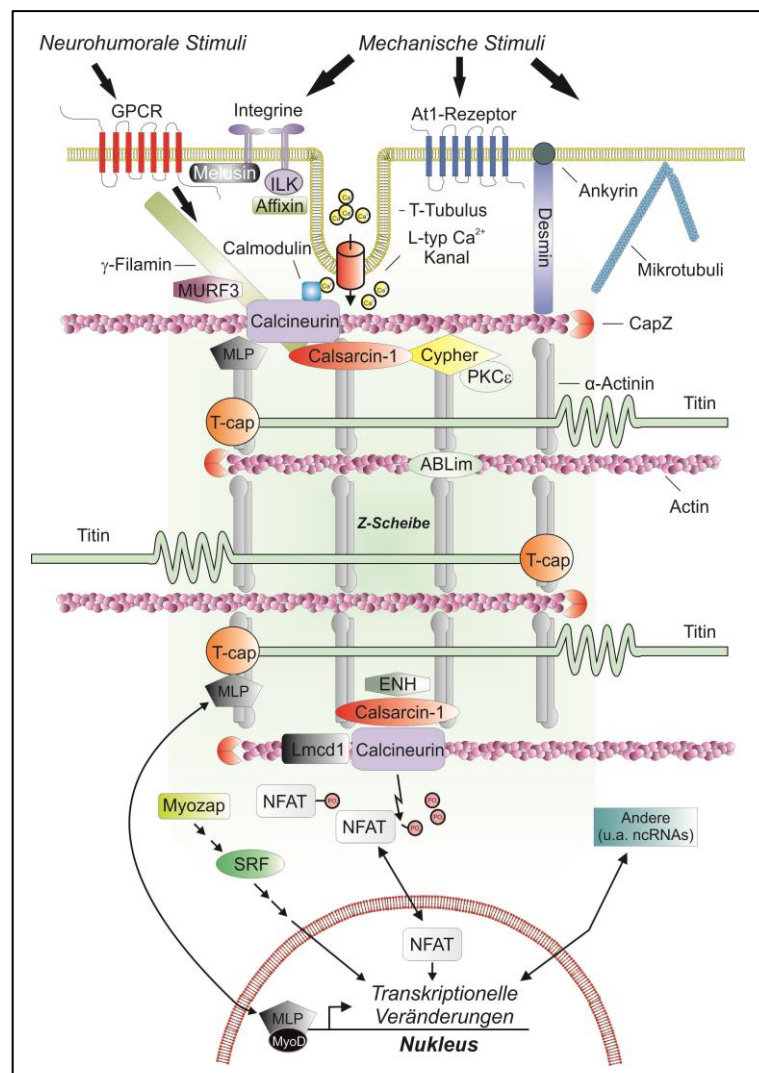
Die Serine-Threonin-Proteinphosphatase Calcineurin (PPP3CA oder PP2B) nimmt in der Vermittlung einer pathologischen Myokardhypertrophie eine Schlüsselrolle ein (Molkentin, Lu et al. 1998; Bueno, Wilkins et al. 2002; Frey & Olson 2003). Das Heterodimer besteht aus einer regulatorischen Untereinheit Calcineurin B (CnB) und einer größeren katalytischen Untereinheit Calcineurin A (CnA). Calcineurin A beinhaltet eine N-terminale katalytische Domäne sowie eine C-terminale autoinhibierende Domäne. Die autoinhibierende Einheit kann die katalytische Domäne blockieren und das Protein desaktivieren (Bueno, van Rooij et al. 2002; Burkard, Becher et al. 2005). Die kleinere Untereinheit B (16-19 kDa) trägt die Calcium-Bindungstelle. Von der größeren Untereinheit A (58-59 kDa) existieren drei Isoformen *CnA $\alpha$* , *CnA $\beta$*  und *CnA $\gamma$* , von welchen *CnA $\alpha$*  und *CnA $\beta$*  im Herzen exprimiert werden (Guerini, Montell et al. 1992; Taigen, De Windt et al. 2000; Bueno, Wilkins et al. 2002). Die kleinere Untereinheit CnB wird von *CnB1* und *CnB2* kodiert (Ueki, Muramatsu et al. 1992), wobei nur *CnB1* im Herzen exprimiert wird. Steigt die intrazelluläre Calciumkonzentration an, bindet Calmodulin an die Calmodulin-bindende Domäne im CnA. Dies führt zu einer Konformationsänderung, wodurch die katalytische Domäne sterisch frei ist (Klee, Ren et al. 1998). Dadurch kann Calcineurin die NFATs (Nuclear Factor of Activated T-Cells) dephosphorylieren, welche darauf in den Nukleus translozieren. Dort können sie mit

anderen Transkriptionsfaktoren wie MEF-2 oder GATA-4 interagieren und Promotoren prohypertropher Gene wie zum Beispiel *Nppa* (atrialen natriuretische Faktor (ANF)) und *Nppb* (brain natriuretisches Peptid (BNP)) aktivieren (Wilkins, Dai et al. 2004; Wilkins & Molkentin 2004). Als Gegenspieler von Calcineurin agieren diverse Kinasen, die NFATs phosphorylieren können. Zu diesen gehören MAPK, PKA, GSK3beta oder DYRK (Beals, Sheridan et al. 1997; Kuhn, Frank et al. 2009). Für die Phosphatase Calcineurin konnten viele Proteine gefunden werden, die einen inhibitorischen Effekt auf die Phosphataseaktivität besitzen, wie zum Beispiel das Protein Cain oder auch AKAP7 (Lai, Burnett et al. 1998; Taigen, De Windt et al. 2000). Aber auch Pharmakologika wie Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK506) können einen solchen Effekt bewirken (Heineke & Molkentin 2006). Als wichtiger endogener Modulator des Calcineurin-NFAT Signalweges ist RCAN1.4 zu erwähnen, wobei der genaue Mechanismus noch diskutiert wird. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um eine negative Rückkopplung (Yang, Rothermel et al. 2000). Die Dephosphorylierung der NFAT Transkriptionsfaktoren durch Calcineurin führt zur Expression von RCAN1.4. Ab einer bestimmten Menge an RCAN1.4, kann dieses durch Bindung an die katalytische Untereinheit von Calcineurin dessen Aktivität inhibieren (Vega, Yang et al. 2002). Damit wird ein Überschießen der hypertrophen Reaktion verhindert (Shin, Yang et al. 2011). Als wichtiger Interaktionspartner im Calcineurin-NFAT Signalweg wurden erst kürzlich die Calsarcin-Isoformen (Calcineurin-binding sarcomeric protein), eine neue Familie Z-Scheiben spezifischer Proteine entdeckt. Von den drei Proteinen ist nur Calsarcin-1 im Herzen und in der Skelettmuskulatur exprimiert, während Calsarcin-2 und 3 allein in der Skelettmuskulatur vorkommen (Frey, Richardson et al. 2000; Frey & Olson 2002). Durch seine Lokalisation an der Z-Scheibe können Mutationen in Calsarcin-1 zu Herzerkrankungen wie hypertrophen Kardiomyopathie führen (Osio, Tan et al. 2007). Calsarcin-1 defiziente Mäuse zeigten in einem gemischten genetischen Hintergrund erst unter pathologischen biomechanischen Stress eine erhöhte kardiale Hypertrophie (Frey, Barrientos et al. 2004). Im reinen C57/Bl6-Hintergrund entwickelten die Calsarcin-1-Knockout Tiere einen dilatativen Phänotyp (unpublizierte Daten).

### 1.3 Die Z-Scheibe

Die quergestreifte Muskulatur, welche in Herzmuskulatur und Skelettmuskulatur vorkommt, setzt sich aus Myofibrillen zusammen, welche selbst aus vielen aneinander gereihten kontraktilen Elementen, den Sarkomeren bestehen. Diese kleinen homogenen Funktionseinheiten bestehen im Wesentlichen aus den Myofilamenten Aktin und Myosin, welche sich überlappen und so unter dem Elektronenmikroskop unterschiedliche Strukturen erkennen lassen (Abbildung 1-6). Dieser Komplex wird lateral von der Z-Scheibe begrenzt

und aufrechterhalten. An der Z-Scheibe sind die Aktinfilamente zweier aufeinanderfolgender Sarkomere verhaftet und durch ein  $\alpha$ -Aktinin Homodimer miteinander verknüpft, welche bei Kontraktion des Sarkomers den Winkel der Bindung zueinander ändert. In transversen Schnitten sind zwei Konformationen der Z-Scheibe möglich: die quadratische Struktur und eine engmaschige Korbgeflechtstruktur (Goldstein, Michael et al. 1989; Voelkel & Linke 2011). Somit ist die Z-Scheibe sowohl im Herzen als auch in der Skelettmuskulatur maßgeblich für die mechanische Stabilität und Kontraktilität wichtig. Des Weiteren sind mehr als 40 Proteine an der Z-Scheibe lokalisiert und tragen sowohl zur Stabilität als auch zur Kraftübertragung zwischen dem Zytoskelett und dem kontraktilen Apparat bei. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass sie darüber hinaus noch eine Schlüsselfunktion in der myokardialen Signaltransduktion hat und somit an der Entstehung von Herz- und Skelettmuskelerkrankungen beteiligt ist (Frank, Kuhn et al. 2007).



**Abbildung 1–6: Die Z-Scheibe als wichtige Komponente in der Signaltransduktion**

Schematische Darstellungen einer Z-Scheibe mit ihren bekannten Proteinen und Signalwegen (modifiziert) (Frank & Frey 2011).

## **Rolle der Z-Scheibe in Kardiomyopathien**

Während der letzten Jahre wurden bemerkenswerte Fortschritte in der Entschlüsselung der Rolle der Z-Scheibe in der quergestreiften Muskulatur gemacht. Basierend auf dem heutigen Wissen befinden sich an der Z-Scheibe nicht nur Strukturproteine sondern auch Z-Scheibenproteine, die mit vielen Signalproteinen in Verbindung stehen und somit an unterschiedlichen Signalkaskaden teilnehmen (Frank, Kuhn et al. 2006; Frank, Kuhn et al. 2007) (Abbildung 1-6). In Folge spezifischer Stimulation ändern diese Signalproteine ihre Konformität und translozieren in andere Zellkomponenten, u.a. in den Nukleus (Voelkel & Linke 2011). Im Nukleus können die Signalproteine mit Transkriptionsfaktoren interagieren und so die Genexpression von u. a. hypertrophen Faktoren initiieren.

Neben den bereits beschriebenen Proteinen Calcineurin und Calsarcin gehören häufig auch LIM-Domänen Proteine wie z. B. die Four and a Half Lim domain Protein (FHL) Familie oder auch das Muscle-LIM-Protein (MLP) zu den Z-Scheiben assoziierten Signalproteinen. MLP besitzt zwei LIM-Domänen und interagiert u.a. mit  $\alpha$ -Aktinin, Telethonin/T-Cap und CnA (Knoll, Hoshijima et al. 2002; Heineke, Ruetten et al. 2005). Durch direkte Bindung von Calcineurin reguliert MLP die Calcineurin-Aktivität und scheint sogar für die Verankerung von Calcineurin an der Z-Scheibe essentiell zu sein (Flick & Konieczny 2000; Heineke, Ruetten et al. 2005). Die Familie der FHL besteht aus vier Mitgliedern (FHL1-4), welche alle eine kritische Rolle in unterschiedlichen zellulären Prozessen, wie zum Beispiel in der Regulierung des Zytoskeletts, der Signaltransduktion oder der Genexpression, spielen (Purcell, Darwis et al. 2004; Johannessen, Moller et al. 2006). Die Isoform FHL2 ist alleinig im Herzen stark exprimiert. FHL2-defiziente Mäuse zeigen sowohl unter Basisbedingungen als auch unter aortaler Konstriktion keinen kardialen Phänotyp. Unter chronischer Isoproterenol-Stimulation entwickeln sie jedoch eine kardiale Hypertrophie mit Induktion der Hypertrophiemarker (Chu, Bardwell et al. 2000; Kong, Shelton et al. 2001). FHL2 bindet direkt an Calcineurin und kann so die Entstehung einer pathologischen Hypertrophie mildern (Hojayev, Rothermel et al. 2012).

Somit zeigt sich, dass Z-Scheibenproteine elementare Faktoren in der kardialen Signaltransduktion sind. Eine weitere Bestätigung dieser Hypothese erbrachte die Erforschung von Z-Scheibenproteine kodierenden Genen und derer genetisch bedingten Mutationen, welche Kardiomyopathien und Muskeldystrophien verursachen. In der hypertrophen Kardiomyopathie wurden bisher fast nur Proteinmutationen im Sarkomer als Auslöser lokalisiert (Spirito, Seidman et al. 1997). Mutationen, die eine dilatative Kardiomyopathie auslösen können, sind hingegen breit gefächert lokalisiert, zum Beispiel sarkomere Proteine oder auch Kernmembranproteine. Beispielsweise führen Mutationen in bekannten Z-Scheibenproteinen wie  $\alpha$ -Aktinin oder Desmin zu DCM, wohingegen Mutationen in MLP und T-Cap auch HCM verursachen können (Frank, Kuhn et al. 2006; Kruger & Linke

2009; Luther 2009). Da die Z-Scheibenproteine einen Komplex mit eng benachbarten Strukturen und anderen Signalproteinen bilden, entstehen viele Wechselwirkungen untereinander und die Erforschung der Pathophysiologie kardialer Erkrankungen dauert an. Demnach müssen neue Komponenten der Z-Scheibe entdeckt werden und deren Funktion bzw. Bedeutung in den Signaltransduktionswegen entschlüsselt werden.

## **1.4 Screening für unbekannte Z-Scheibenproteine**

Auf der Suche nach noch unbekanntem, kardialen Z-Scheibenständigen Proteinen wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. N. Frey „*in silico*“ Screens durchgeführt. Hierfür wurden computergestützt EST (expressed sequence tag) Datenbanken nach noch nicht charakterisierten Genen mit hoher herz- und skelettmuskelspezifischer Expression analysiert. Nach bioinformatischer Auswertung mit Hilfe von T-STAG und Unigene Datenbanken konnten eine Reihe unbekannter Kandidatengene für Kardiomyopathien identifiziert werden.

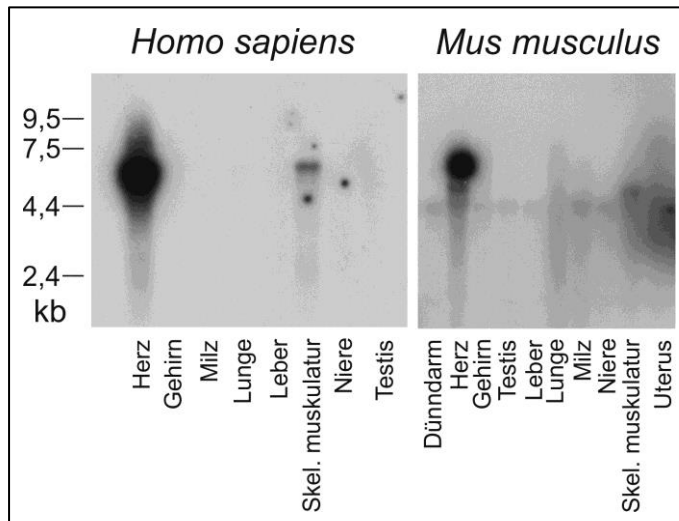
### **1.4.1 Fbxl22**

In beschriebenen systematischen „*in silico*“ Screening Experiment konnte ebenfalls Fbxl22 (F-box and leucine-rich repeat protein 22) als neues kardiales Z-Scheibenprotein beschrieben werden (Spaich, Will et al. 2012). Seine reine herzspezifische Expression wurde mittels Northern und Western Blot bestätigt. Fbxl22 ist ein Teil der SCF (Skp 1/Cul1/F-box) E3-Ligase, welche die proteasomale Degradation von  $\alpha$ -Aktinin und Filamin C leitet. Der „Knockdown“ von Fbxl22 *in vitro* und *in vivo* führt zu einer Akkumulation von  $\alpha$ -Aktinin und somit zu einer Verminderung der Kontraktilität im Herzen und zu einer Entstehung einer Kardiomyopathie.

### **1.4.2 CEFIP**

Ein weiteres bislang noch nicht charakterisiertes Protein ist das 230 kDa große Protein „CEFIP“ (Cardiac Enriched FHL2 Interacting Protein). CEFIP zeichnete sich durch seine EST-basierende Herz- und Skelettmuskelspezifische Expression aus und zeigte keine Homologie zu bereits bekannten Proteinen in den Datenbanken. Die Daten des Screening Experiments wurden daraufhin mit Hilfe unterschiedlicher Methoden bestätigt. Die hohe kardiale und skelettale Expression von CEFIP konnte sowohl in humanem als auch in

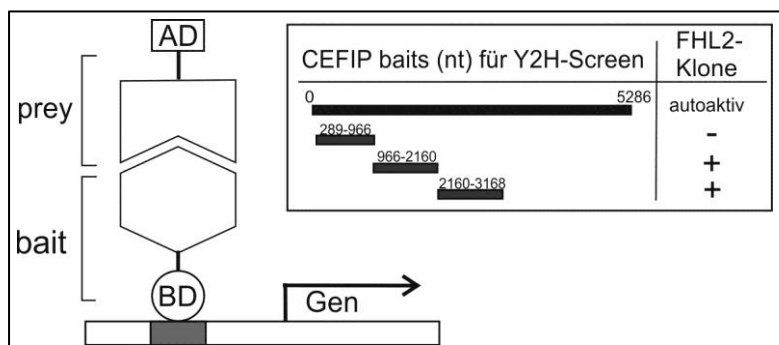
murinem Gewebe auf DNA-Ebene via Northern Blot (Abbildung 1-7) gezeigt werden (Dierck, Kuhn et al. 2017).



**Abbildung 1–7: CEFIP Expression mittels Northern Blot**

Bestätigung der kardialen- und skelettmuskel-spezifischen Expression von humanem und murinem CEFIP durch Northern Blot Analyse in humanem und murinem Gewebe (Dierck, Kuhn et al. 2017).

Für die genauere Charakterisierung von CEFIP wurde nach Interaktionspartnern via Yeast 2-Hybrid Screen gesucht. Da ein Yeast 2-Hybrid mit dem ganzen CEFIP-ORF (open reading frame) nicht möglich war, da eine Autoaktivierung eintrat, wurde der ORF aufgeteilt. Mittels drei unterschiedlicher Fragmente von CEFIP als „Bait“ wurden unabhängige Screens durchgeführt und ausgewertet (Abbildung 1-8). In allen drei Sets konnte das  $\alpha$ -Aktinin als Interaktionspartner gefunden werden. Neben anderen geläufigen kardialen Proteinen, wie zum Beispiel HSP27, konnte als potentieller Interaktionspartner FHL2, ein bereits bekanntes Z-Scheibenprotein und ein Hypertrophie-Inhibitor, identifiziert werden (Tabelle 1-2).



**Abbildung 1–8: CEFIP Konstrukte für Y2H**

Drei voneinander unabhängige Y2H-Screens wurden mit CEFIP-Fragmenten (289-966nt, 966-2160nt, 2160-3168nt) als „Bait“ gegen eine humane Herz-cDNA-Bibliothek durchgeführt und ausgewertet.

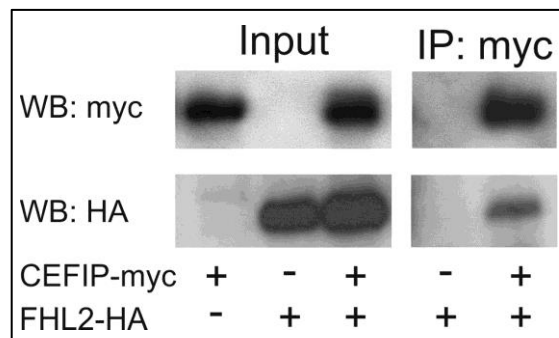


**Tabelle 1–2: Ergebnisse der drei unabhängigen Y2H-Screens (Dierck, Kuhn et al. 2017)**

Prey	Gene description	Gene ID	Protein	Accession no.
<b>Bait CEFIP (nt 289–966)</b>				
ACTN2	Actinin $\alpha$ 2	88	$\alpha$ -actinin-2 isoform 1	NP_001094
DES	Desmin	1674	Desmin	NP_1918
DYNLL1	Dynein light chain LC8-type 1	8655	Dynein light chain LC8-type 1	AAI04245
EDC4	Enhancer of mRNA decapping 4	23644	Enhancer of mRNA decapping 4	AAH64567
EFEMP2	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2	30008	Fibulin-4	CAA10791
HSPB3	Heat shock protein family B (small) member 3	8988	Heat shock protein $\beta$ -3	NP_006299.1
HSPB2	Heat shock protein family B (small) member 2	3316	Heat shock 27-kDa protein 2	AAI09394
IMMT	Inner membrane mitochondrial protein	10989	Proliferation-inducing gene 4	AAI09394
IMMT	Inner membrane mitochondrial protein	10989	Inner membrane protein, mitochondrial (mitofilin)	AAH02412
LZTS2	Leucine zipper tumor suppressor 2	84445	LAPSER1	AAK31577
MPRIIP	Myosin phosphatase Rho-interacting protein	23164	Myosin phosphatase Rho-interacting protein isoform	NP_958431
PDE4DIP	Phosphodiesterase 4D-interacting protein	9659	Phosphodiesterase 4D-interacting protein	AAH78660
VIM	Vimentin	7431	Vimentin	CAI39485
VPS51	VPS51, GARP complex subunit	738	Chromosome 11 open reading frame 2	AAH07198
<b>Bait CEFIP (nt 966–2160)</b>				
ACTN2	Actinin $\alpha$ 2	88	$\alpha$ -Actinin-2 isoform 1	NP_001094
FHL2	Four and a half LIM domains 2	2274	FHL2 isoform 5	ABB73038
GYPC	Glycophorin C	2995	Glycophorin-C isoform 1	NP_002092
HSPB3	Heat shock protein family B (small) member 3	8988	Heat shock protein $\beta$ -3	NP_006299.1
IFITM1	Interferon-induced transmembrane protein 1	8519	Interferon-induced transmembrane protein 1	AAH00897
MYL2	Myosin light chain 2	4633	cardiac myosin light chain 2	AAA91832.1
<b>Bait CEFIP (nt 2160–3168)</b>				
ACTN2	Actinin $\alpha$ 2	88	$\alpha$ -Actinin-2 isoform 1	NP_001094
FHL2	Four and a half LIM domains 2	2274	FHL2 isoform 5	ABB73038
HSPB3	Heat shock protein family B (small) member 3	8988	Heat shock protein $\beta$ -3	NP_006299.1
MPC1	Mitochondrial pyruvate carrier 1 (brain protein 44-like protein)	51660	Brain protein 44-like	AAH00810
TAOK3	TAO kinase 3	51347	STE20-like kinase	AAF14559

Für eine Bestätigung dieser Interaktion wurde in HEK293-A Zellen CEFIP-MYC und FHL2-HA überexprimiert. Durch Co-Immunopräzipitation konnte diese Interaktion zwischen CEFIP und FHL2 bestätigt werden (Abbildung 1-9).

Andere Proteine konnten bisher nicht als potentielle Interaktionspartner nachgewiesen werden.



**Abbildung 1–9: Co-Immopräzipitation von CEFIP und FHL2**

Die Interaktion von FHL2 mit CEFIP wurde durch Co-Immunopräzipitation von überexprimierten CEFIP-MYC mit FHL2-HA in HEK293-A Zellen bestätigt (Dierck, Kuhn et al. 2017).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Z-Scheibe ist nicht nur eine zentrale Schnittstelle zwischen Sarkomer und Zytoskelett, sondern auch ein Knotenpunkt der myokardialen Signaltransduktion. Viele neue herz- und skelettmuskel-spezifische Proteine sind Bestandteil dieser Signalwege. Mutationen in den entsprechenden Genen können unter Umständen Kardiomyopathien verursachen. Dennoch sind die Mechanismen der Pathogenese der Kardiomyopathien immer noch nicht vollständig geklärt und eine Suche nach weiteren Schlüsselproteinen und ihrer Funktion ist unumgänglich.

In einem „*in silico*“ Screen für solche unbekanntes Z-Scheibenproteine wurde CEFIP als uncharakterisiertes Protein entdeckt und soll im Rahmen dieser Arbeit auf seine molekulare Rolle und Funktionalität untersucht werden.

In *in vitro* Experimenten soll die Auswirkungen der An- bzw. Abwesenheit von CEFIP in Kardiomyozyten mittels adenoviraler Infektion auf molekularer Ebene analysiert, die strukturelle und funktionelle Interaktion zu FHL2 charakterisiert und die Rolle von CEFIP an der Z-Scheibe bzw. in den myokardialen Signalkaskaden definiert werden.

Des Weiteren soll anhand einer konstitutiven CEFIP-Knockout Maus die *in vivo* Funktion untersucht werden. Dabei wird zuerst die CEFIP-defiziente Maus unter Basisbedingungen in unterschiedlichen Altersstufen charakterisiert. Im Anschluss sollen die *in vitro* Rahmenbedingungen auf die Maus übertragen werden und die Funktion von CEFIP auch im Ganztiermodell bestätigt werden. Hierfür werden durch unterschiedlichste Stimulationen von Signalkaskaden Kardiomyopathien ausgelöst und die CEFIP-Knockout Mäuse hinsichtlich der Ausbildung und Modulation von Kardiomyopathien analysiert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

AmershamHybond-PPVDF Membran	GE Healthcare
Axiovert 40 C Mikroskop	Carl Zeiss
BZ-9000 Mikroskop	Keyence
Cellstar® Zellkulturplatten 6-, 12-, 24-Well	Greiner Bio-One
Centrifuge 5810	Eppendorf
CFX96 Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories
Chromatographiepapier	Whatman
Deckgläser 18 mm Durchmesser	VWR International
Duomax 1030, Wippschüttler	Heidolph Instruments
ECX-F26.M UV-Transluminator	Peqlab Biotechnologie
Elektroporationsküvetten	Peqlab Biotechnologie
Faltenfilter 110 mm Durchmesser	Schleicher & Schuell
FlourChem Q Kamera	Alpha Innotech
Galaxy ministar Mikrozentrifuge	VWR International
Heraeus Fresco 21 Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific
Heraeus Multifuge X3R Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific
Heraeus Pico 21 Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific
Infinite M200Pro Mikroplattenleser	Tecan
LSM800	Carl Zeiss Microscopy
MaxQ 8000 Schüttler	Thermo Fisher Scientific
Mini Protean Tetra System	Bio-Rad Laboratories
Multiply- $\mu$ Strip 8er Kette	Sarstedt
MyCycler Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories
NanoDrop 2000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific
Neubauer-Zählkammer	Assistent
Objektträger 76x26x1 mm	MARIENFELD
Olympus BX53 Mikroskop	Olympus
Olympus DP72 Kamera	Olympus
Parafilm	Bemis
Pasteurpipetten, Glas	Carl Roth

## Material und Methoden

---

PCR Platte 96-Well, farblos	Biozym Scientific
PCR Folien, adhäsiv, farblos	Biozym Scientific
Petrischale 35*10 mm	Sarstedt
Pipette Eppendorf- Reference	Eppendorf Research
Pipettenspitzen Biosphere Filter Tip	Sarstedt
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Power Pac HC	Bio-Rad Laboratories
PP-Mikroplatte 96-Well	Greiner Bio-One
Precellys 24 Homogenisator	Peqlab Biotechnologie
QIAvac 24 Plus	Qiagen
RCT Basic Magnetrührer	IKA
Reagiergefäße 0,5/1,5/2,0 mL	Sarstedt
Röhrchen, luftdurchlässig, 14 mL	Sarstedt
Röhrchen, 15/50 mL	Sarstedt
Serologische Pipetten, 2/5/10/25 mL	Sarstedt
Seven Easy pH-Messgerät	Mettler Toledo
Stemi 2000-C	Carl Zeiss
Steri-Cult 200 Inkubator	Labotec
Sterifilter 0,2 µm Porengröße	Nalgene Labware
SteriGARD Hood	The Baker Company
TE1502S Präzisionswaage	Sartorius
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Titan PCR-Arbeitsstation	Scanlaf
Vacusaft Absaugsystem	Integra Bioscience
Variomag Poly Magnetrührer	Thermo Fisher Scientific
Vevo 1100	VisualSonics
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Zellkulturflaschen T75/T175 cm <sup>2</sup>	Sarstedt
Zellschaber 16 cm/ 25 cm	Sarstedt

### 2.1.2 Chemikalien

Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth
Agar	Carl Roth
Agarose	Biozym Scientific GmbH
Albumin Fraktion V aus Rinderserum	Merck
Carbenecillin	Carl Roth

---

DAPI	Roche
DEPC	Carl Roth
DMEM	PAA-Laboratories
DMSO	Sigma Aldrich
dNTP	Thermo Fisher Scientific
DNA Loading Dye 6x	Thermo Fisher Scientific
DreamTaq 10x Puffer grün	Thermo Fisher Scientific
DTT	Carl Roth
EDTA	Serva Electrophoresis
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Thermo Fisher Scientific
FCS Gold	PAA Laboratories
Fluor Preserve Reagent	Calbiochem
Formamid	Sigma Aldrich
GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
Glukose	Carl Roth
Glycerin	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
HEPES	Carl Roth
iQ Multiplex 2000	Bio-Rad Laboratories
Isopropanol	Carl Roth
Isoproterenol	Calbiochem
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kanamycin	Sigma Aldrich
Kollagen I- Lösung aus Rinderhaut	BD Biosciences
LB-Agar X969	Carl Roth
LB-Medium X968	Carl Roth
Lipofectamin 2000	Thermo Fisher Scientific
Lipofectamin RNAiMAX	Thermo Fisher Scientific
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific
Magnesiumheptasulfat	Carl Roth
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Methanol	Carl Roth
Milchpulver	Carl Roth
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriummonohydrogenphosphat	Carl Roth
Natriumhydroxid	Carl Roth

NCS (Newborn Calf Serum)	PAA Laboratories
NP-40	Sigma Aldrich
Pankreatin	Sigma Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Percoll	GE Healthcare
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth
Phenylephrin	Sigma Aldrich
Protein-Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad
QIAzol Lysis Reagenz	Qiagen
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth
SDS	Serva Electrophoresis
Spectinomycin	Carl Roth
Spectra Multicolor High Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
SyBR GreenEr qPCR SuperMix	Thermo Fisher Scientific
TEMED	Carl Roth
Tissue-Tek	Sakura Finetek Germany GmbH
Tris-HCl	Carl Roth
Triton X-100	Carl Roth
Trypanblau	Sigma Aldrich
Tryptone	Sigma Aldrich
Tween 20	Sigma Aldrich

### 2.1.3 Enzyme

Collagenase Typ 2	Worthington/Cellsystems
Complete-Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics
Desoxyribonuclease I (DNase I)	Sigma Aldrich
Dream Taq DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Gateway BP-Clonase II Enzyme Mix	Thermo Fisher Scientific
Gateway LR-Clonase II Enzyme Mix	Thermo Fisher Scientific
Pac I	New England Biolabs
Pfu DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Phosphatase-Inhibitor 2 und 3	Sigma Aldrich
Proteinase K	Thermo Fisher Scientific
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific
Trypsin/EDTA-Lösung	Merck

### 2.1.4 Kits

BLOCK-iT Pol II miR RNAi-Expressionsvektorkit	Thermo Fisher Scientific
Amersham ECL-Plus Detektionssystem	GE Healthcare
MACS Dissociation Kit	Miltenyi Biotec GmbH
Nucleo Spin Plasmid Kit	Macherey-Nagel
Qiagen Plus Plasmid Midi/Maxi Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Quikchange II Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
QuickExtract DNA Extraction Solution	Biozym
Superscript III First Strand Kit	Thermo Fisher Scientific

## 2.1.5 Oligonukleotide und Primer

Alle Oligonukleotide, Primer und Sequenzierungen erfolgten durch die Firma Eurofins MWG Operon.

**Tabelle 2–1: Primer zur Generierung rekombinanter Adenoviren (Gateway Klonierung)**

Primer wurden spezifisch an den open reading frame (ORF) des jeweiligen Gens angepasst und mit Teilen der attB1- (forward) und attB2- (reverse) Adaptersequenzen begrenzt. Diese Adapterseiten werden in einer zweiten PCR durch spezifische attB1/2-Adapterprimer nochmals verlängert und somit zu Gateway-kompatiblen Konstrukten generiert. (Eurofins MWG Operon)

Primername	Sequenz 5' → 3'	Beschreibung
attB_CEFIP_F	GCTGGCACCATGATGCAGGGAAACAAAAAATGCAC	Cefip ORF Primer
attB_CEFIPms_R	GCTGGGTCGCCTCAAGAAACACCCTCTGTGGCAAAG	
attB1 Adapter	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCTGGCACC	Adapter für attB- Konstrukte
attB2 Adapter	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGCC	

**Tabelle 2–2: Primer zur Generierung mutagenisierter CEFIP-Konstrukte**

Mutageneseprimer wurden nach Angaben des Quickchange II Kit (Agilent Technologies) designed, wobei die zu mutagenisierende Position sich in der Mitte des Primers befindet. Für jede Position wurden eine Alanin- und/oder eine Glutamin-Mutagenese. (Eurofins MWG Operon)

Primername	Sequenz 5' → 3'	Beschreibung
CEFIP_mut221ala_F	CCTGGAGAACAAGAGGCTCCCAAGAACC	Primer Mutation Pos. 221 Alanin
CEFIP_mut221ala_R	GGTTCTTGGGAGCCTCTTGTCTCCAGG	
CEFIP_mut221gln_F	CCTGGAGAACAAGAGCAACCCAAGAACC	Primer Mutation Pos. 221 Glutamin
CEFIP_mut221gln_R	GGTTCTTGGGTTGCTCTTGTCTCCAGG	
CEFIP_mut1384ala_F	GTGGGCCTTCCCATGCTCCAGAGAAAGAGAG	Primer Mutation Pos. 1384 Alanin
CEFIP_mut1384ala_R	CTCTCTTTCTCTGGAGCATGGGAAGGCCAC	
CEFIP_mut1384gln_F	GTGGGCCTTCCCATCAACCAGAGAAAGAGAG	Primer Mutation Pos. 1384 Glutamin
CEFIP_mut1384gln_R	CTCTCTTTCTCTGGTTGATGGGAAGGCCAC	



**Tabelle 2–3: Primer für Genotypisierung**

Primer für die Genotypisierung von CEFIP-Knockout Mäusen, Wildtypmäusen und Calcineurin-Transgenen Mäusen.

Primername	Sequenz 5' → 3'	Beschreibung
1260_1	GAGACTCTGGCTACTCATCC	Primer für interne Kontrolle bei Knockout-PCR
1260_2	CCTTCAGCAAGAGCTGGGGAC	
3360_33 (F)	AGAGGCTAGCTAGTGAGAGATGG	Primer für Wildtyp- und Knockout-PCR
3358_34 (R)	CATAGCAACACCTGCTCAGC	Primer für Wildtyp-PCR
3360_38 (R)	GGGTGGTCGATTGTATCTGG	Primer für Knockout-PCR
hGHpolyA 3'	CAGGCATCTACTGAGTGGACCCAAC	Primer für transgene Mäuse mit hGH-Kassette (CnA-TG)
hGHpolyA 5'	GTCTATTCGGGAACCAAGCTGGAGTG	
18S_F	GCACGGCCGGTACAGTGA	Primer für interne Kontrolle bei transgenen Mäusen
18S_R	GCGCCCGTCGGCATGTATTA	

**Tabelle 2–4: Oligonukleotide zur Generierung rekombinanter anti-miR-Adenoviren**

Primer wurden spezifisch gegen den open reading frame (ORF) des jeweiligen Gens gerichtet (BLOCK-iT RNAi Designer). Nach Annealing des Top- und Bottom-Oligos werden die anti-miRs in den pcDNA6.2/GW-miR Vektor ligiert (BLOCK-iT Pol II miR RNAi Expressionsvektorkit (Thermo Fisher Scientific) und somit zu Gateway-kompatiblen Konstrukten generiert. (Eurofins MWG Operon)

Primername	Sequenz 5' → 3'	Beschreibung
BLOCK-iT_miR-CEFIP-TOP	TGCTGAGCAGAAGTTGACACCACTTTGTTTTGG CCACTGACTGACAAAGTGGTCACTTCTGCT	Micro RNA- Sequenz gegen CEFIP mit BLOCK-iT (Thermo Fisher Scientific)
BLOCK-iT_miR-CEFIP-BOTTOM	CCTGAGCAGAAGTTGACCACTTTGTCAGTCAGT GGCCAAAACAAAGTGGTGTCACTTCTGCTC	
BLOCK-iT_miR-Ktr.-TOP	GAAATGTACTGCGCGTGGAGACGTTTTGCCACT GACTGACGTCTCCACGCAGTACATTT	Scambled Micro RNA Sequenz als Negativkontrolle
BLOCK-iT_miR-Ktr.-BOTTOM	AAATGTACTGCGTGGAGACGTCAGTCAGTGGCC AAAACGTCTCCACGCAGTACATTTTC	

**Tabelle 2–5: Primer für quantitative Real-Time PCR**

Primer für spezifische quantitative Real-Time PCR.

<b>Primername</b>	<b>Sequenz 5' → 3'</b>	<b>Beschreibung</b>
qPCR-mmu+rno-CEFIP_F	CAGCTGGGACACTTGCACGG	qPCR- Primer für <i>Cefip</i>
qPCR-mmu+rno-CEFIP_R	CGCAGATGCCTGGCTTTTAGG	
qPCR-hsa-CEFIP_F	CACATCCTTCCATGACTCCTATCTGG	qPCR-Primer für <i>CEFIP</i>
qPCR-hsa-CEFIP_R	CCTCTGGACTGGCGTTGGTG	
qPCR-mmu+rno-FHL2_F	GAGAATCAGAACTTCTGCGTGCC	qPCR- Primer für <i>Fhl2</i>
qPCR-mmu+rno-FHL2_R	AGCATCACAGAAGCAGGTCAGGC	
qPCR-mmu+rno-RPL32_F	GGTGGCTGCCATCTGTTTTACG	qPCR- Primer für <i>Rpl32</i>
qPCR-mmu+rno-RPL32_R	CCGCACCCTGTTGTCAATGC	
qPCR-hsa-RPL32_F	TCTCCTTCTCGGCATCATGG	qPCR- Primer für <i>RPL32</i>
qPCR-hsa-RPL32_R	GGCATCAAGATCTGGCCCTT	
qPCR-hsa-NPPA_F	AGTGGATTGCTCCTTGACGA	qPCR- Primer für <i>NPPA</i>
qPCR-hsa-NPPA_R	CCAAATGGTCCAGCAAATTCTTG	
qPCR-hsa-NPPB_F	CACAGGTGTCTGGAAGTCCC	qPCR- Primer für <i>NPPB</i>
qPCR-hsa-NPPB_R	AGCCCCTTGTGGAATCAGAA	
qPCR-mmu+rno-ACTA1_F	CCAGAGTCAGAGCAGCAGAAACTAG	qPCR- Primer für <i>Acta1</i>
qPCR-mmu+rno-ACTA1_R	GACCATGACACCCTGGTGACG	
qPCR-mmu+rno-MYH7_F	CAAGCAGCAGTTGGATGAGCG	qPCR- Primer für <i>Myh7</i>
qPCR-mmu+rno-MYH7_R	TCCTCGATGCGTGCCTGAAG	
qPCR-mmu+rno-MYH6_F	GCTACACTTCTCTACCTATGC	qPCR- Primer für <i>Myh6</i>
qPCR-mmu+rno-MYH_R	CTTGTTGAGATTTTCCCCGTG	
qPCR-mmu+rno-RCAN1.1_F	GTGTTCGTGGACGGCCTGTG	qPCR- Primer für <i>Rcan1.1</i>
qPCR-mmu+rno-RCAN1.1_R	TCGGCTGCAGATAAGGGGTTGC	

**Tabelle 2–6: Primer für quantitative Real-Time PCR**

Primer für spezifische quantitative Multiplex Real-Time PCR.

<b>Primername</b>	<b>Sequenz 5' → 3'</b>	<b>Beschreibung</b>
mmu+rno-Rpl32_F	CTGCTGATGTGCAACAAATCT	Multiplex Primer und Sonde für <i>Rpl32</i>
mmu+rno-Rpl32_R	GCTGTGCTGCTCTTTCTACAAT	
mmu+rno-Rpl32_PRB	RED-ACTGTGCTGAGATTGCTCACAAATGTGT-BHQ2	
mmu+rno-Nppa_F	GGAGCAAATCCTGTGTACAGTG	Multiplex Primer und Sonde für <i>Nppa</i>
mmu+rno-Nppa_R	ACCTCATCTTCTACCGGCAT	
mmu+rno-Nppa_PRB	FAM-TGATGGATTTCAAGAACCTGCTAGACCA-BHQ1	
mmu-Nppb_F	ACAAGATAGACCGGATCGGA	Multiplex Primer und Sonde für <i>Nppb</i>
mmu-Nppb_R	AGCCAGGAGGTCTTCCTACA	
mmu-Nppb_PRB	HEX-TCAGTGCGTTACAGCCCAAACGA-BHQ1	
rno-Nppb_F	AGAAGATAGACCGGATCGGC	Multiplex Primer und Sonde für <i>Nppb</i>
rno-Nppb_R	AGCCAGGAGGTCTTCCTAAA	
rno-Nppb_PRB	HEX-TCAGCCCGTCACAGCCCAAGCGA-BHQ1	
mmu-Myh7_F	CTGCTCAGCAATCTATTTGCC	Multiplex Primer und Sonde für <i>Myh7</i>
mmu-Myh7_R	TGGAGCGCAAGTTTGTCAT	
mmu-Myh7_PRB	CY5-CTTGCCTTTGCCTTTGTCCGCCG-BHQ2	
mmu+rno-Rcan1_F	TAGCTCCCTGATTGCTTGTG	Multiplex Primer und Sonde für <i>Rcan1.4</i>
mmu+rno-Rcan1_R	GGATTCAAATTTGGCCCTGG	
rno-Rcan1_PRB	CY5.5-ACGATGATGTCTTCAGCGAAAGTGAGAC-ECL	
mmu-Rcan1_PRB	CY5-ACGATGATGTCTTCAGCGAAAGTGAGAC-BHQ2	

## 2.1.6 Adenovirale Konstrukte

**Tabelle 2–7: Adenovirale Konstrukte für Überexpressions- und Knockdownversuche in neonatalen Rattenkardiomyozyten**

Virusname	Abkürzung in Abbildungen	Beschreibung
Ad_CEFIP	CEFIP	CEFIP-Überexpressionskonstrukt
Ad_LacZ	LacZ/Kontrolle	$\beta$ -Galaktosidaseüberexpression, Kontrolle bei Überexpressionsversuche
Ad_miR-neg	miR-Ktr.	Scrambled miRNA, Kontrolle bei Infektion mit spezifischen miRNA
Ad_miR-CEFIP	miR-CEFIP	miRNA-Expressionskonstrukt gegen CEFIP
Ad_Renilla-Luc		Viruskonstrukt mit Renilla-Luciferase, endogene Kontrolle
Ad_NFAT-RE-Luc		NFAT-Viruskonstrukt mit Firefly Luciferase (luc2)
Ad_SRF-RE-Luc		SRF-Viruskonstrukt mit Firefly Luciferase (luc2)
Ad_ $\Delta$ CnA	CnA	Überexpressionskonstrukt konstitutiv aktiv
Ad_RhoA	RhoA	Überexpressionskonstrukt von RhoA
Ad_CEFIPmut211 ala/gln	mut211	Überexpressionskonstrukt CEFIP-Mutante
Ad_CEFIPmut1384 ala/gln	mut1384	Überexpressionskonstrukt CEFIP-Mutante
Ad_CEFIPmut211-1384 ala/gln	mut211-1384	Überexpressionskonstrukt CEFIP-Mutante

## 2.1.7 Vektoren und Plasmide

pDONR221	Thermo Fisher Scientific
pcDNA-DEST 40	Thermo Fisher Scientific
pcDNA3.1	Thermo Fisher Scientific
pcDNA6.2-GW/miR	Thermo Fisher Scientific
pAd/CMV/V5-DEST	Thermo Fisher Scientific

## 2.1.8 Silencer® siRNA

**Tabelle 2–8: Silencer™ Select Pre-Designed siRNA von Thermo Fisher Scientific**

Name	Katalognummer	Beschreibung
Negative Control No. 2 siRNA	4390846	Negativkontrolle
rno_Fhl2 siRNA IDs133583	4390771	siRNA gegen <i>Fhl2</i>

## 2.1.9 Antikörper

**Tabelle 2–9: Erstantikörper**

Liste der verwendeten Erstantikörper für Western Blot (WB) oder Immunfluoreszenz (IF).

Antikörper	Spezies	Klonalität	Verwendung	Hersteller
Alpha-Aktinin	Maus	Mono	IF	Sigma Aldrich
CEFIP	Kaninchen	Poly	IF, WB	Kooperation mit Zellbiologie Bonn
FHL2	Maus	Mono	IF	MBL
Alpha-Tubulin	Maus	Mono	WB	Sigma-Aldrich
Hexon-FITC	Ziege	Mono	IF	Dunn Labortechnik

**Tabelle 2–10: Zweitantikörper**

Liste der verwendeten Zweitantikörper für Western Blot (WB) oder Immunfluoreszenz (IF).

Antikörper	Spezies	TAG	Verwendung	Hersteller
Maus	Ziege	HRP	WB	SantaCruz
Kaninchen	Ziege	HRP	WB	SantaCruz
Maus	Esel	AF546	IF	Thermo Fisher Scientific
Kaninchen	Esel	AF488	IF	Thermo Fisher Scientific

## 2.1.10 Puffer und Lösungen

### ADS-Puffer (10x)

1,16 M	NaCl
197 mM	HEPES
94 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O
55,5 mM	Glukose
53,6 mM	KCl
8,3 mM	MgSO <sub>4</sub> , pH 7,4, sterilfiltriert

### Kernlysepuffer für Proteinextraktion

20 mM	Tris (pH 8)
12,5 % (v/v)	Glycerol
10 mM	DTT
1 % (v/v)	NP-40
500 mM	NaCl

Vor dem Gebrauch wurden folgende Enzyme hinzugegeben:

1 mL Puffer

40 µL	25x Protease-Inhibitor-Cocktail
10 µL	Phosphatase-Inhibitor 2
10 µL	Phosphatase-Inhibitor 3
1 µL	1 M DTT

### Laufpuffer, SDS-Gel (10x)

250 mM	Tris
1,9 M	Glycerin
1 % (w/v)	SDS

### PBS

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
4,3 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

### Laemmli-Puffer (4x)

250 mM	Tris (pH 6,8)
5 % (w/v)	SDS
40 % (v/v)	Glycerin
0,005 % (w/v)	Bromphenolblau
10 % (v/v)	2-Mercaptoethanol

**Sammelgelpuffer, SDS-Geld**

0,5 M Tris-Cl (pH 7,5)

**TAE-Puffer (50x)**

3 M Tris-Acetat

0,05 M EDTA (pH 8,3)

**TBS-Lösung**

100 mM Tris-Cl (pH 7,5)

0,9 % (w/v) NaCl

**TBST-Lösung**

TBS + 0,1 % Tween 20

**Transferpuffer, Western Blot**

20 % (v/v) Methanol

25 mM Tris

192 mM Glycin

0,037 % (w/v) SDS

**Trenngelpuffer, SDS-Gel**

1,5 M Tris (pH 8,8)

**Verdaulösung, NRVCM Isolation**

0,5 mg/mL Collagenase Typ 2

0,6 mg/mL Pankreatin

In 1x ADS-Puffer angesetzt und sterilfiltriert.

**2.1.11 Medien****2 YT Medium**

0,5 % (w/v) NaCl

1,6 % (w/v) Trypton

1,0 % (w/v) Hefeextrakt

pH 7,0

**LB-Medium (Luria-Bertani)**

1,0 % (w/v) NaCl

1,0 % (w/v) Trypton

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

pH 7,0

### **LB-Agar**

1,0 % (w/v)	NaCl
1,0 % (w/v)	Trypton
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
1,5 % (w/v)	Agar

pH 7,0

### **Medium für NRVCM und NMCM**

DMEM mit 4,5 g/L Glukose und 110 mg/L Natriumpyruvat

10 % (v/v)	FCS Gold
100 U/L	Penicillin G
100 µg/mL	Streptomycin
2 mM	L-Glutamin

Nach 24 h wird FCS-freies Medium verwendet.

### **Medium für HEK293-A Zellen**

DMEM Advanced mit 4,5 g/L Glukose und 110 mg/L Natriumpyruvat

4 % (v/v)	FCS
100 U/L	Penicillin G
100 µg/mL	Streptomycin
2 mM	L-Glutamin

## **2.1.12 Zelllinien**

### **HEK293-A Zellen**

HEK293-A Zellen sind eine permanente Linie von humanen embryonalen Nierenzellen transformiert mit DNA-Teilen des humanen Adenovirus Typ 5. Durch diese Transformation sind die Zellen leicht in der Lage Anteile des viralen Genoms aufzunehmen und sind somit fähig aus rekombinanten, adenoviralen Vektoren Adenoviren herzustellen. Bei den HEK293-A handelt es sich um eine stabile Zelllinie und ist dadurch einfach zu kultivieren und schnell verfügbar.

### **NRVCM/ NMCM**

Die Primärzellen der neonatalen Ratten- oder Mauskardiomyozyten werden aus 1-3 Tage alten Tieren isoliert und können für maximal eine Woche kultiviert werden.



### 2.1.13 Bakterien

Tabelle 2–11: *E. coli* Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Stamm	Hersteller	Genotyp
DH10B, elektrokompetent	Thermo Fisher Scientific	F- <i>endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL</i> <i>ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697</i> <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ-</i>
OneShot TOP10, elektrokompetent	Thermo Fisher Scientific	F- <i>mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZM15</i> <i>lacX74 recA1 araD139 (araleu) 7697 galU galK</i> <i>rpsL (StrR) endA1 nupG</i>

### 2.1.14 Versuchstiere

Die für die primäre Zellkultur verwendeten Tiere (Ratten vom Wistar-Stamm, Mäuse von C57BL/6N-Stamm) wurden in der „Zentralen Tierhaltung“ des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel gezüchtet. Hierfür wurden adulte männliche und weibliche Ratten/Mäuse der Firma Charles-River als Elterntiere eingesetzt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Elektrokompetente *E. coli* DH10B wurden für die Transformation von Plasmiden und deren anschließenden Vermehrung benötigt. Für die Anzucht der Bakterien wurde 50 mL LB-Medium mit *E. coli* DH10B angeimpft und über Nacht bei 37 °C bei 200 rpm im MaxQ8000 vorinkubiert. Anschließend wurde die Vorkultur in 1 L auf RT vorgewärmtes 2YT-Medium überführt und bis zu einer optischen Dichte ( $OD_{600nm}$ ) von 0,4-0,8 weiterhin bei 37 °C inkubiert. Bei Erreichen der OD wurden die Bakterienkulturen sofort für 10 min auf Eis gekühlt und anschließend bei 4 °C und 11000 x g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit eiskaltem, autoklaviertem ddH<sub>2</sub>O gewaschen, wobei das Pellet sorgfältig resuspendiert und erneut zentrifugiert wurde. Daraufhin folgte erneut ein Waschschriff mit 10 % Glycerin in ddH<sub>2</sub>O. Das gereinigte Bakterienpellet wurde in 1,5 mL 10 % Glycerin aufgenommen und aliquotiert. Die 50 µL Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

### **Elektroporation**

Bei der Elektroporation werden DNA-Plasmide mit Hilfe elektrischer Stromimpulse in Bakterien transformiert. Hierfür wurden elektrokompetente Bakterien 5 min auf Eis aufgetaut. 5 ng Plasmid-DNA wurde direkt zu den Bakterien hinzugefügt und diese Suspension vorsichtig durch auf- und abpipettieren durchmischt. Anschließend wurde die Suspension in eine bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt, welche in einem Elektroporator bei definierten Bedingungen ( $2,5\text{ kV}$ ,  $200\ \Omega$  und  $25\ \mu\text{F}$ ) einem Strompuls ausgesetzt wurde. Die transformierten Bakterien wurden mit  $1\text{ mL}$  LB-Medium aus der Küvette in ein steriles  $1,5\text{ mL}$  Reaktionsgefäß überführt und im Thermomixer bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $700\text{ rpm}$  für eine Stunde inkubiert. Die Bakteriensuspension konnte anschließend auf LB-Agar ausplattiert werden und so erfolgreich transformierte Bakterien durch spezifische Antibiotikaresistenz einzeln selektiert werden.

### **Herstellung von Selektivnährböden**

LB-Medium wurde mit  $1,5\%$  (v/v) Agar versetzt, autoklaviert, und nach Abkühlung im Kühlschrank bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Zur Herstellung von selektiven Agarplatten wurde der LB-Agar im Wasserbad auf  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  erwärmt und mit den entsprechenden Antibiotika versetzt. Ampicillin wurde durch das stabilere Carbenicillin substituiert und dieses in einer Konzentration von  $100\ \mu\text{g/mL}$  eingesetzt. Spectinomycin und Kanamycin wurden mit einer Konzentration von  $50\ \mu\text{g/mL}$  verwendet. Unter der Sterilwerkbank wurden  $10\text{ cm}$  Petrischalen mit entsprechender Menge des antibiotikahaltigem LB-Mediums befüllt und nach dem Abkühlen bis zum Gebrauch bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Kühlschrank aufbewahrt.

### **Aussaat von Bakterien auf Selektivnährböden**

Die transformierte Bakteriensuspension wurde auf die mit entsprechenden Antibiotika-versetzten Platten pipettiert und mit Hilfe von circa vier sterilen Glaskugeln gleichmäßig ausplattiert. Die Menge der Suspension ist von dem transformierten Plasmid abhängig und beträgt  $100\text{-}500\ \mu\text{L}$ . Nach einer Inkubationszeit von circa  $16\text{ h}$  in einem Inkubator bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , konnten einzelne Kolonien mit Hilfe einer Pipettenspitze geerntet und in Flüssigkultur vermehrt werden.

### **Anzucht einer Bakterienkultur**

LB-Medium wurde in einem geeigneten Kolben mit einem Antibiotikum, abhängig von der Resistenzkassette des zu amplifizierenden Plasmids, versetzt und mit einer einzelnen Bakterienkolonie oder etwas Bakteriensuspension angeimpft. Durch die Inkubation über Nacht bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $200\text{ rpm}$  konnten sich die Bakterien optimal vermehren.

## 2.2.2 Zellkulturmethoden

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter Sterilwerkbänken (Lamina-flow) durchgeführt, wobei für Kultivieren, Transfizieren und Infizieren von Zelllinien bzw. Primärzellen unterschiedliche Sterilwerkbänke verwendet wurden, um Kontaminationen zu vermeiden.

Die Zellen wurden in unterschiedlichen Inkubatoren bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### Kultivierung von Primären Zelllinien-NRVCM

Für die Isolierung primärer, ventrikulärer Rattenkardiomyozyten wurden Herzen aus ein bis drei Tagen alten Wistar-Ratten verwendet. Nach kurzem Eintauchen in eine 75 % (v/v) Ethanollösung, wurden die Ratten mit einer Schere dekapitiert, der Thorax durch einen Längsschnitt entlang des Sternums eröffnet und durch leichtes Drücken auf den Bauch das Herz freigelegt. Das Herz wurde entnommen und sofort in eiskaltem ADS-Puffer überführt. Die Herzen wurden von verbliebenen Gefäßen und Vorhöfen befreit und die verbliebenen Ventrikel stark zerkleinert. Pro T75-Kulturflasche wurden circa 30 zerkleinerte Herzen mit 30 mL einer 37 °C warmen Verdaulösung in einem Schüttelwasserbad 20 min mit 120 rpm bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Verdaulösung abgenommen, verworfen und durch frische Verdaulösung ersetzt. Nach erneuter 20 minütiger Inkubation im Wasserbad wurden die Gewebestücke in der Verdaulösung mit einer serologischen 25 mL Pipette auf- und abpipettiert umso die Zellen zu vereinzeln. Nach Absetzen des übrigen Gewebes wurde die Verdaulösung abgenommen und durch ein Zellsieb in ein 50 mL Röhrchen gegeben. Zum Blockieren der Enzyme wurde 10 mL NCS hinzugefügt und die Zellsuspension bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 mL NCS resuspendiert und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator gelagert. Mit dem restlichen Gewebe in der T75-Kulturflasche wurden die Verdauschritte so lange wiederholt bis das Gewebe vollständig dissoziiert war (3-4 Verdauschritte). Anschließend wurden die zusammengeführten Zell-NCS-Suspensionen erneut bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in 2 mL ADS-Puffer aufgenommen. Nun wurde die Zellsuspension über einen Percoll-Gradienten aufgereinigt, um isolierte Fibroblasten, Erythrozyten und Kardiomyozyten mittels ihrer Dichte aufzutrennen. Hierfür wurde eine Percoll-Stammlösung aus 27 mL Percoll und 3 mL 10x ADS-Puffer angesetzt. Aus 9 mL der Stammlösung wurde mit 11 mL ADS-Puffer ein Gemisch mit niedriger Dichte hergestellt, wovon 4 mL in je einem 15 mL Röhrchen vorgelegt wurde. Dieses wurde mit 3 mL eines Gemisches mit hoher Dichte, welches aus 13 mL der Percoll-Stammlösung und 7 mL ADS-Puffer zusammengesetzt war, vorsichtig unterschichtet. Das Gemisch mit der niedrigen Dichte wurde vorab mit Phenolrot versetzt, so dass eine deutliche Phasengrenze erkennbar war. Die 2 mL Zellsuspension wurde vorsichtig auf den Gradienten geschichtet und die 15 mL Röhrchen anschließend bei 2400 rpm für

30 min ohne Bremse bei 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugieren waren die drei Phasen weiterhin sichtbar und die Zellen hatten sich entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt. Die Erythrozyten lagern sich am Boden ab, die Fibroblasten zwischen den beiden oberen Schichten und die Kardiomyozyten zwischen den beiden unteren Schichten. Vorsichtig wurde die Schicht bis zu den Kardiomyozyten abgetragen und verworfen. Die Kardiomyozytenschicht wurde mit einer Pipette abgenommen, in ein 50 mL Röhrchen überführt und mit ADS-Puffer resuspendiert. Nach Zentrifugieren bei 1000 rpm für 5 min wurde das Zellpellet erneut in 50 mL ADS-Puffer aufgenommen, zentrifugiert und abschließend in 37 °C warmen Medium resuspendiert.

Die Zellzahl der Suspension wurde mit der Neubauer-Zählkammer ermittelt, wofür ein Gemisch von Kardiomyozytenlösung und Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:1 angesetzt wurde (200 µL). Entsprechend der Versuche und dafür nötigen Zellzahlen wurden die Kardiomyozyten auf vorab kollagenisierten Platten ausgesät (Tabelle 2-12). Beim Kollagenisieren wurde eine 10 % Kollagenlösung aus eine Kollagen-I-Stammlösung (3 mg/mL) in 0,01 N Salzsäure in PBS hergestellt und auf Zellkulturplatten verteilt, welche über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden. Die Zellkulturplatten wurden am darauffolgenden Tag mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und eine Stunde bei 37 °C getrocknet. Die Kardiomyozyten wurden in DMEM mit Antibiotika, L-Glutamin und 10 % FCS ausplattiert und 18-24 h später nach Waschen mit vorgewärmten PBS mit serumfreien Medium versetzt. Im selben Schritt erfolgte auch die Virusinfektion, während die Stimulation mit Phenylephrin erst 48 h nach Aussaat erfolgte.

**Tabelle 2–12: NRVCM-Verteilung nach Versuchsaufbau**

Versuchstyp	Zellkulturplatte	Zellen/Well	Mediumvolumen
Protein-Isolierung	6- Well	1 * 10 <sup>6</sup>	2,0 mL
RNA-Isolierung	6- Well	0,75 * 10 <sup>6</sup>	2,0 mL
Luciferase-Assay	12- Well	0,4 * 10 <sup>6</sup>	1,0 mL
Immunhistochemie	12- Well mit Coverslips	0,2 * 10 <sup>6</sup>	1,0 mL

### **Kultivierung von Primären Zelllinien-NMCM**

Zur Isolation von neonatalen Mauskardiomyozyten wurden drei Tage alte C57BL/6N- Mäuse verwendet. Nach dem Dekapitieren wurde der Thorax eröffnet, das Herz entnommen und in eiskaltem HBSS überführt. Das Herz wurde von Gefäßen und Vorhöfen befreit und grob zerteilt. Der Verdau wurde mit dem Enzymmix des MACS Dissociation Kit von Miltenyi Biotec GmbH nach Protokoll angesetzt. 10 mL des Enzymmix wurden zu den Herzen in einem

Nalgene Erlenmeyerkolben überführt und im Wasserbad bei 37 °C und 160 rpm für 45 min inkubiert. Zwischendurch wurde der Ansatz kräftig auf dem Vortexer durchmischt. Die Verdauungslösung wurde durch ein mit 5 mL FCS benetztes Zellsieb filtriert und das Zellsieb anschließend nochmals mit 10 mL FCS gespült. Die Zellsuspension wurde bei 600 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand in ein neues Röhrchen überführt, nochmals zentrifugiert und die Zellpellets vereint. Das Pellet wurde mit 12 mL Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche gegeben, welche für 3 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> zum Absetzen der Fibroblasten inkubiert wurde. Anschließend wurden die in Suspension befindlichen Kardiomyozyten in ein 50 mL Röhrchen überführt, die Zellkulturflasche erneut mit warmen DMEM ausgewaschen und beide Suspensionen vereint. Nach zweimaligem Zentrifugieren bei 600 rpm für 5 min wurden die Zellpellets in entsprechender Menge Medium aufgenommen und die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Zellen wurden analog zum NRVCM-Plan (Tabelle 2-12) auf vorkollagenisierten Platten verteilt.

### **Kultivierung immortalisierter Zelllinien-HEK293-A**

Die humane Zelllinie HEK293-A wächst adhärent in einer singulären Schicht (Monolayer) auf dem Boden von Zellkulturgefäßen an und wird bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator gehalten.

### **Auftauen von Zellen**

Kryokonservierte HEK-Zellen wurden in flüssigem Stickstoff Langzeit gelagert. Nachdem die Kryoröhrchen aus dem Stickstoffbehälter entnommen wurden, konnten sie sofort bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in ein 50 mL Röhrchen überführt werden. Anschließend wurde vorsichtig 10 mL Medium tropfenweise hinzugegeben und bei 500 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit frischem Medium versetzt und je nach Größe auf bis zu drei Zellkulturflaschen verteilt. Diese wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator gelagert.

### **Kultivierung**

Unter Idealbedingungen verdoppelt sich die Zellanzahl bei HEK293-A Zellen innerhalb von 36 h. Im Abstand von 3-4 Tagen bei einer Konfluenz von 70-90 % wurden die Zellen passagiert. Nach Absaugen des Mediums und Waschen mit 5 mL PBS, wurde 5 mL einer vorgewärmten 0,25 % (v/v) Trypsin-EDTA-Lösung auf dem Zellrasen verteilt und kurz bei RT inkubiert. Nach Abklopfen der Zellen wurde zum Abstoppen der Enzymreaktion FCS-haltiges Medium hinzugegeben und die Suspension in ein 50 mL Röhrchen überführt. Nach 5 min zentrifugieren bei 1000 rpm wurde das Pellet mit frischem Medium aufgenommen und neu auf Zellkulturflaschen verteilt (Verdünnung 1:6).

### **Kryokonservierung**

Die Zellen wurden wie beim Passagieren mit PBS gewaschen, mit Trypsin gelöst und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann jedoch in 10 %-igem DMSO in FCS resuspendiert und in Kryokonservierungsgefäße verteilt. Nach 24 h bei -80 °C in einer Kryobox wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

### **Transfektion von HEK293-A Zellen**

Zur Generierung von Adenoviren mussten Pac-I-Verdaute Konstrukte (in pAd/CMV/V5-Vektor) in HEK293-A Zellen eingeschleust werden. Hierfür wurde die Transfektionsmethode mittels Lipofektamin 2000 verwendet. Die HEK293-A Zellen wurden ohne Antibiotika auf einer 6-Well Zellkulturplatte ausgesät und bei einer Konfluenz von 70-90 % transfiziert. 1 µg Pac-I-verdaute Plasmid-DNA wurde mit 250 µL DMEM (ohne FCS und Antibiotika) vorinkubiert, während parallel 3 µL Lipofektamin 2000 in 250 µL inkubiert wurde. Nach 5 min wurde die DNA-Suspension in Lipofektamin-Suspension getropft, weitere 20 min inkubiert und im Anschluss tropfenweise in ein Well der Zellkulturplatte hinzugefügt. Die Platte wurde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein Medienwechsel auf DMEM mit FCS, Antibiotika und L-Glutamin.

### **Transfektion von NRVCM/NMCM**

Zur Genregulation in NRVCMs und NMCMs wurden Silencer™ Select Pre-Designed siRNA von Thermo Fisher Scientific transfiziert. Hierfür wurde Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent von Thermo Fisher Scientific als Transfektionsreagenz verwendet. 6 µL RNAiMAX bzw. 30 pmol siRNA wurden in je einem Tube mit 150 µL DMEM (ohne FCS und Antibiotika) angesetzt und nach 5 min zusammengeführt. Nach 15 min wurde der Ansatz auf die Zellen getropft, welche ebenfalls in antibiotikafreiem Medium kultiviert wurden.

## **2.2.3 Molekularbiologische und biochemische Methoden**

### **Plasmid-DNA-Extraktion aus Bakterienkultur (Mini)**

Für die Isolierung kleinerer Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien wurde am Vortag eine 6 mL Bakterienflüssigkultur mit LB-Medium und Antibiotika angesetzt. Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem NucleoSpin Mini-Präparation-Kit von Macherey-Nagel. Die gesättigte Bakterienkultur wurde bei 11.000 x g 30 sek runterzentrifugiert und das Pellet in 250 µL A1-Puffer (versetzt mit RNaseA) resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µL A2-Lysepuffer wurde die Suspension invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Mit Zugabe von 300 µL A3-Neutralisationspuffer wurde die Lysereaktion abgestoppt und anschließend die Suspension bei 11.000 x g 5 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde auf eine Säule mit Silikamembran überführt und für

eine Minute zentrifugiert. Hierbei verblieb die DNA in der Membran. Nach Waschen der Säule mit 500 µL AW-Puffer und 600 µL A4-Ethanolpuffer wurde die Säule 2 min trocken zentrifugiert. Die DNA konnte mit 22 µL vorgewärmtem AE-Puffer aus der Membran eluiert und mit einem frischen 1,5 mL Reagiergefäß aufgefangen werden.

### **Plasmid-DNA-Extraktion aus Bakterienkultur (Midi/Maxi)**

Für die Extraktion von größeren Mengen Plasmid-DNA wurde das Qiagen Plasmid Plus Purification Midi/Maxi-Kit verwendet. Hierfür wurde am Vortag eine 50-100 mL Bakterienflüssigkultur angesetzt und bei 37 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Die Kultur wurde bei 4 °C und 6.000 x g für 20 min abzentrifugiert und das Pellet mit 2 mL P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 2 mL P2-Puffer wurde das Röhrchen mehrmalig invertiert und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 2 mL S3-Puffer neutralisiert und nach mehrmaligem Invertieren komplett in ein QIAfilter *Cartridge* überführt und nochmals 10 min inkubiert. Mit Hilfe eines *Plungers* wurde die Suspension durch die *Cartridge* gepresst und die Lösung in einem frischen 50 mL Röhrchen aufgefangen. Nach der Zugabe von 2 mL BB-Puffer, wurde wieder mehrmals invertiert und die Lösung mit dem QIAvac24 Plus bei etwa -300 mbar durch eine Silikatsäule gesaugt. Die DNA blieb in der Membran und wurde mit 700 µL ETR-Puffer und 700 µL PE-Puffer gewaschen. Nach Trocknen der Säule durch Zentrifugation bei 10.000 xg für eine Minute, wurde die Säule auf ein neues 1,5 mL Reagiergefäß gesetzt und die DNA mit 200 µL EB-Puffer eluiert.

### **Klonierung von CEFIP-Überexpression- und Knockdownkonstrukten**

Der gesamte ORF von mmu + rno CEFIP wurde mit Hilfe des Gateway Systems aus cDNA aus Maus und Ratte kloniert und zu adenoviralen Konstrukten generiert. In den ORF-PCRs wurden attB-Sites (attenuation sites) generiert um über Gateway CEFIP zuerst in den pDONR221-Vektor und anschließend über Rekombination in den pAd/CMV/V5-Vektor zu shuffeln.

Für die synthetische anti-CEFIP miRNA wurde zuerst mit dem BLOCK-IT System und anschließend ebenfalls mit dem Gateway System gearbeitet.

### ***Open reading frame (ORF) PCR***

Für das CEFIP-Überexpressionskonstrukt musste zuerst mittels Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) das *Cefip* amplifiziert werden. Hierfür wurde die Pfu-Polymerase von Thermo Fisher Scientific verwendet, welche mit synthetischen Primern an der Template-DNA einen neuen DNA-Doppelstrang synthetisiert. Durch zyklische Wiederholung wurde die DNA-Sequenz zwischen den beiden spezifischen Primern exponentiell vervielfältigt. Das Temperaturprofil

wurde an die Temperaturen und den GC-Gehalt der Primer bzw. an die Länge des ORF und die Geschwindigkeit der Polymerase angepasst.

### **Tabelle 2–13: CEFIP-ORF-PCR mit der Pfu-Polymerase**

Die Primer (siehe Oligonukleotide für CEFIP) wurden 10  $\mu$ M eingesetzt und analog zur ORF-PCR wurde im Anschluss nach der Gelextraktion unter denselben Bedingungen mit attB-Adapterprimer eine erneute PCR durchgeführt.

<b>Reagenzien</b>	<b>Volumen (50,0 <math>\mu</math>L)</b>
dH <sub>2</sub> O	35,0 $\mu$ L
10x Pfu-Puffer	1,0 $\mu$ L
dNTP (2 mM)	5,0 $\mu$ L
Primer_F	1,5 $\mu$ L
Primer_R	1,5 $\mu$ L
Template	1,0 $\mu$ L

### **Tabelle 2–14: Temperaturprofil der ORF-PCR**

<b>Reaktion</b>	<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zyklusanzahl</b>
Denaturierung (initial)	5 min	95 °C	1 x
Denaturierung	30 sek	95 °C	40 x
Annealing	45 sek	54 °C	
Elongation	9 min	72 °C	
Elongation (final)	10 min	72 °C	1 x
Kühlung	$\infty$	4 °C	1 x

### **Agarose Gelectrophorese**

Die Ansätze der PCR wurden auf einem 1 % Agarosegel nach ihrer Konstruktgröße aufgetrennt. In diesem Verfahren werden in einem Spannungsfeld Molekülkonstrukte entsprechend ihrer elektrischen Ladung und Größe aufgeteilt, wodurch Aussagen über Reinheit und Größe der Konstrukte möglich sind. Hierfür wurde 1 % Agarose in TAE-Puffer in der Mikrowelle kurz erhitzt bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Bei einer Temperatur von circa 60 °C wurde 0,5  $\mu$ g/mL Ethidiumbromid hinzugesetzt, die Lösung in eine Gelkammer gegossen und mit Kämmen Taschen ausgespart. Die Proben wurden mit



Ladepuffer versehen, in die Taschen gefüllt und gegen einen spezifischen DNA-Marker (Gene Ruler 1kb Plus) im elektrischen Feld bei circa 100 V laufen gelassen. Unter UV-Licht wurden die Banden sichtbar gemacht.

### **DNA-Gelextraktion**

Um nur mit den reinen Konstrukten weiter zu arbeiten, wurde die entsprechende Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 2,0 mL Reagiergefäß überführt. Die Extraktion erfolgte mit dem QIAquick-Gel Extraktions-Kit. Hierfür wurde das Agarosestück mit der dreifachen Menge an GQ-Puffer versetzt und für 10 min bei 55 °C und 700 rpm verdaut. Die Lösung wurde über eine QIAquick-Silikamembransäule gegeben, wo sich die DNA anlagern konnte. Nachdem die gesamte Lösung bei 11.000 x g für eine Minute durch die Säule zentrifugiert wurde, wurde die Säule mit 750 µL PE-Puffer gewaschen und anschließend durch Zentrifugation für 2 min getrocknet. Die Säule wurde in ein neues 1,5 mL Reagiergefäß überführt und die gebundene DNA mit 22 µL EB-Puffer von der Membran gelöst.

### **DNA/RNA Messung Nanodrop**

Mit Hilfe eines Spektrophotometers (NanoDrop 2000) der Firma Peqlab konnte die Konzentration von RNA und DNA bestimmt werden. Die Bestimmung erfolgte durch die Messung der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm. Es erfolgte immer eine Doppelbestimmung und die Probenreinheit sollte zwischen einem A260/A280-Verhältnis von 1,6 und 2,0 liegen.

### **Klonierung (Gateway-System)**

Das Gateway-Klonierungssystem basiert auf dem Rekombinationssystem des Bakteriophagen  $\lambda$ , welches einfach enzymatisch DNA in das Genom der *E. coli* integrieren kann. Durch die spezifischen attB-Sites ist es schnell möglich DNA in Vektoren zu shuttle. Im Anschluss an die ORF-PCR wurde eine Adapter-PCR, welche die attB-Sequenz an der ORF-Sequenz vervollständigt, durchgeführt. In der BP-Reaktion werden diese Seiten ausgenutzt, um in einen Donor-Vektor (pDONR221) mittels BP-Clonase II und Rekombination zu integrieren, wobei die attB-Sites zu attL-Sites werden. Hierfür werden 150 ng des pDONR221-Vektor mit 50 ng des ORF/Adapter-Konstruktes und 2 µL BP-Clonase II über Nacht bei 25 °C inkubiert und im Anschluss mit 1 µL Proteinase K 10 min bei 37 °C zur Inaktivierung des Enzymes versetzt. Nach Transformation in DH10B *E. coli* wurde die Bakterienlösung auf Kanamycin-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Klone wurden in einer Flüssigkultur hochgezogen, die DNA durch Mini-Plasmid-Präparation isoliert und durch Eurofins MWG sequenziert. Bei erfolgreicher Sequenzierung konnte von dem Donor-Vektor in einen Expressionsvektor durch Rekombination überführt

werden (LR-Reaktion). Hierfür wurden die attL-Sites genutzt und in den adenoviralen pAd/CMV/V5-Vektor kloniert. 300 ng Vektor, 100 ng pDONR221\_ORF-Konstrukt und 2 µL LR Clonase II wurden bei 25 °C über Nacht inkubiert und die Reaktion im Anschluss mit 1 µL Proteinase K abgestoppt. Es folgte wieder die Transformation in DH10B *E. coli* mit anschließendem Ausstreichen auf eine Carbenicillin-Platte. Die sequenzierten Klone konnten erneut in einer Flüssigkultur zur Isolation (Midi) genutzt und zur Herstellung von Adenoviren verwendet werden.

### **Generierung adenoviraler miRNA Konstrukte (BLOCK-iT-System)**

Zur Klonierung synthetischer miRNA-Konstrukte gegen die CEFIP-Sequenz wurde das BLOCK-iT Pol II miR RNAi Expressions Vektor Kit von Thermo Fisher Scientific verwendet. Die spezifischen miRNAs sollen bei adenoviraler Überexpression zu einem „Knockdown“ *in vitro* führen und somit Versuche unter Abwesenheit von CEFIP ermöglichen. Zunächst wurden mit dem BLOCK-iT RNAi Designer Einzelstrang miRNA-Sequenzen mit 3´ und 5´ Überhängen und Hairpin-Loop-Struktur designed und die Oligonukleotide durch Eurofins MWG generiert. Die TOP- und BOTTOM-Oligonukleotide wurden 50 µM mit 10x Oligo-Annealing-Puffer bei 95 °C für 5 min inkubiert und langsam bei RT abgekühlt. Die auf 10 nM verdünnten Doppelstrang-Oligonukleotide wurden in den linearisierten pcDNA6.2-GW/miR-Vektor mittels T4 DNA Ligase (1 U/µL) ligiert. Das generierte Plasmid konnte daraufhin in *E. coli* OneShot TOP10 Bakterien transformiert, auf Spektinomycin selektiven Agarplatten ausplattiert und nach Inkubation über Nacht einzelne Klone hochgezogen werden. Nach erfolgreicher Sequenzierung konnten die Plasmide mittels Gateway Klonierungsstrategie in den pDONR221-Vektor und anschließend in den pAd/CMV/V5-Vektor geshuttelt werden und so miRNA-Adenoviren generiert werden.

### **Mutagenese**

Zur Herstellung von aktivierten und inaktivierten CEFIP-Mutanten mussten zwei potentielle Phosphorylierungsstellen im ORF von *Cefip* mutagenisiert werden. Dafür wurde das QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit von Agilent Technologies verwendet. Mit Hilfe dieser Methode wurde in der kodierenden Sequenz an zwei spezifischen Stellen Serin gegen Alanin oder Glutamin ausgetauscht. Hierdurch wurden entweder eine oder beide Stellen aktiviert oder deaktiviert. Mittels Gateway-Klonierungsstrategie wurden die Mutanten in den adenoviralen Expressionsvektor geshuttelt und konnten durch virale Infektion in NRVCM-Versuche eingesetzt werden.

Die Vektoren enthalten neben ihrer Antibiotikaresistenz, welche für die Selektierung der positiven Klone ausgenutzt wird, auch eine *ccdB*-Selbstmord-Kassette, welche nur durch die Rekombination mit einem Plasmid entfernt wird.

### ***Generierung von Adenoviren***

Sowohl das CEFIP-Überexpressions- als auch das Knockdownkonstrukt wurde mit Hilfe der Gateway-Klonierungsstrategie zuerst in den pDONR221-Vektor und anschließend in den pAd/CMV/V5-Vektor geschuttelt. Die pAd/CMV/V5-Konstrukte wurden via Midi-Präparation vermehrt und durch einen Pac-I-Restriktionsverdau linearisiert. Hierzu wurden 10 µg des Konstruktes mit 1 µL Pac-I-Enzym (10 U/µL) in CutSmart-Puffer über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Deaktivierung konnten die verdauten Plasmide in HEK293-A Zellen transfiziert werden um so Adenoviren zu prozessieren. HEK293-A Zellen wurden im 6-Well-Format antibiotikafrei ausplatiert und bei einer Konfluenz von mindestens 70 % mit 1 µg des Plasmides transfiziert. Nach 48 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> konnten die Zellen in T75-Zellkulturflaschen umgesetzt werden. Das Medium wurde circa alle zwei Tage durch frisches Medium ausgetauscht. Die Zellen wurden stetig unter dem Mikroskop auf morphologische Veränderungen begutachtet. War die Virenproduktion gestartet, zeigten die HEK293-A Zellen eine kugelige Form bis hin zum Absterben und der Medienwechsel wurde eingestellt. Die Lyse der HEK-Zellen setzte die Viren frei, welche die umliegenden HEK-Zellen infizieren konnten und so zur Vermehrung beitrugen. Waren fast alle Zellen von der T75-Zellkulturflasche abgelöst, wurden die letzten Zellen mit einer serologischen Stabpipette abgespült und alles in ein 50 mL Röhrchen überführt. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die meisten Viren im Überstand. Das Röhrchen wurde bei 1.000 x g für 10 min zentrifugiert, der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und das Zellpellet dreimal einem Einfrier-Auftau-Zyklus unterzogen. Dabei wurde das Zellpellet in ein 2 mL Reagiergefäß mit circa 1 mL PBS 15 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend circa 30 min bei 30 °C aufgetaut. Der Überstand wurde zu dem primären Lysat überführt. Für Produktion eines hochkonzentrierten Virenstocks wurden zwei T175-Zellkulturflaschen mit HEK293-A Zellen bei 70-90 % Konfluenz mit 1-5 mL des Lysates infiziert. Die Zellen zeigten nach 24-48 h eine kugelige Form und die ersten begannen sich vom Boden abzulösen. Die Viren sollten zu dem Zeitpunkt der Ernte noch in den HEK293-A Zellen sein und nicht schon eine Lyse hervorgerufen haben. Die T175-Zellkulturflaschen konnten durch mechanisches Ablösen geerntet werden und wieder in ein 50 mL Röhrchen überführt werden. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1,5 mL PBS resuspendiert. Es folgte wieder ein dreimaliger Auftau-Einfrier-Zyklus mit anschließender Zentrifugation bei 12.000 rpm für 20 min. Der Überstand wurde vorsichtig überführt, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Das Zellpellet wurde verworfen. Ein Aliquot wurde zur Analyse der infektiösen Einheit pro µL eingesetzt (Titerbestimmung).

### ***Titerbestimmung von Adenoviren***

Für die hergestellten Adenoviren musste der Titer als Maß der Infektiosität bestimmt werden. Dazu wurden HEK293-A Zellen in einem 24-Well Format ausgesät und mit unterschiedlichen

Konzentrationen an Virus infiziert. Pro Viruskonstrukt wurden 12 Wells mit je  $0,5 \cdot 10^5$  Zellen mit 50  $\mu\text{L}$  der von  $10^{-2}$  bis  $10^{-7}$  verdünnten (1:10) Viruslysaten im Duplikat infiziert. Als Kontrolle blieb ein Well ohne Virus. Die Platte wurde für 48 h bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 1 mL/Well kaltem Methanol bei  $-20^\circ\text{C}$  10 min fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1 % BSA in PBS, wurden die Zellen mit 100  $\mu\text{L}$  2 % FITC-gekoppelten Anti-Hexon-Antikörper für eine Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  im Dunkeln angefärbt. Anschließend wurde wieder dreimalig mit 1 % BSA in PBS gewaschen und abschließend die Zellen mit reinem PBS überschichtet. Die infizierten Zellen wurden so mit FITC gelabelt und konnten unterm Fluoreszenzmikroskop ausgezählt werden. Pro Gesichtsfeld sollten 10 bis 50 Zellen erkennbar sein und es wurden mindestens 10 Felder pro Well ausgezählt.

$$\text{ifu/mL} = \frac{\text{Infizierte Zellen/Gesichtsfeld} \times \text{Gesichtsfelder/Well}}{\text{Virusvolumen [ml]} \times \text{Verdünnungsfaktor}}$$

Der Mittelwert der Zellzahl pro Gesichtsfeld wurde mit der Anzahl der zu Verfügung stehenden Gesichtsfelder multipliziert und diese Zahl durch dem Produkt aus Verdünnungsfaktor und Virusvolumen geteilt. Der Titer wurde somit in infektiöse Einheiten pro  $\mu\text{L}$  angegeben.

## RNA

### **RNA-Isolierung aus Zellen**

Die Isolierung von RNA erfolgte mit Hilfe des QIAzol-Reagenz von Qiagen. Hierfür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in jeder Well einer 6-Well-Zellkulturplatte 1 mL QIAzol-Reagenz pipettiert. Durch mehrmaliges Spülen wurden die Zellen vom Plattenboden gelöst und die Suspension in ein 1,5 mL Reagiergefäß überführt. Anschließend erfolgte die RNA-Isolierung. Hierfür wurden 200  $\mu\text{L}$  Chloroform zu der Zellsuspension hinzugefügt und durch Inversion gemischt. Nach Zentrifugieren bei  $12.000 \times g$  für 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  hatten sich die Phasen entsprechend getrennt und es konnte die obere wässrige, RNA-enthaltende Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 mL Reagiergefäß überführt werden. Durch Zugabe von 500  $\mu\text{L}$  Isopropanol wurde die RNA 40 min bei  $-20^\circ\text{C}$  wieder gefällt und anschließend bei  $12.000 \times g$  15 min zentrifugiert. Das Isopropanol wurde vorsichtig entfernt und das Pellet mit 1 mL 75 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde auch das Ethanol entfernt und das Pellet 5-10 min getrocknet. Die RNA wurde in RNase-freiem Wasser resuspendiert und die Konzentration mit dem NanoDrop Spektrophotometer ermittelt. 5  $\mu\text{g}$  RNA wurde zum DNaseI-Verdau eingesetzt um eventuell vorhandene DNA abzubauen. 5  $\mu\text{L}$  10x DNase-Puffer, 5  $\mu\text{L}$  DNase und 5  $\mu\text{g}$  RNA wurden in einem 50  $\mu\text{L}$  Ansatz 15 min bei

RT inkubiert, auf 100  $\mu\text{L}$  mit Wasser aufgefüllt und mit 100  $\mu\text{L}$  Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) vermischt. Nach 15 min Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C wurde erneut die obere Phase abgenommen, in ein neues 1,5 mL Reagiergefäß überführt und die RNA je mit einer Mischung aus 300  $\mu\text{L}$  99,99 % Ethanol und 10  $\mu\text{L}$  3 M Natriumacetatlösung bei -20 °C über Nacht gefällt. Am folgenden Tag wurde der Ansatz 1 h bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, das Pellet erneut mit 500  $\mu\text{L}$  75 % Ethanol gewaschen und das Pellet bei 14.000 rpm für 10 min runterzentrifugiert. Das Ethanol wurde vorsichtig abdekantiert und das Pellet 5 min bei RT getrocknet. Das Pellet wurde in 12  $\mu\text{L}$  RNasefreiem Wasser resuspendiert und die Konzentration mittels Nanodrop-Spektrophotometer bestimmt.

### ***RNA-Isolierung aus Gewebe***

Um RNA aus ganzen Gewebestücken zu isolieren wurde ein Teil des Gewebes entnommen, mit PBS gewaschen und in Kryoröhrchen bei -80 °C gelagert. Anschließend wurden sie mit Hilfe des Precellyse 24 homogenisiert. Hierzu wurden die Gewebestücke in einem speziellen 2 mL Röhrchen zusammen mit 1 mL QIAzol und ein paar Keramikkügelchen überführt und im Precellys Homogenisator 2 x 20 sek bei je 6500 rpm bis zur vollständigen Auflösung des Gewebes homogenisiert. Anschließend wurde das Röhrchen einmalig bei 12.000 x g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein 1,5 mL Reagiergefäß überführt. Die RNA-Isolierung erfolgt dann analog zur Isolation aus Zellen.

### ***cDNA-Synthese***

Die isolierte RNA wurde im Anschluss mit dem Superscript III First Strand Kit in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden zu einem Ansatz mit genau 1000 ng RNA in 12  $\mu\text{L}$  RNase/DNase-freiem Wasser 1  $\mu\text{L}$  dNTPs (10 mM) und 0,5  $\mu\text{L}$  Random Hexamer Primer (250 ng/ $\mu\text{L}$ ) hinzugefügt und 5 min bei 65 °C denaturiert. Nachdem der Ansatz 1 min auf Eis abgekühlt war, wurde 4  $\mu\text{L}$  5x First Strand Puffer, 1  $\mu\text{L}$  DTT (0,1 M), 1  $\mu\text{L}$  RNaseOUT und 0,5  $\mu\text{L}$  SuperScript III RT (200 U/ $\mu\text{L}$ ) dazupipettiert und vorsichtig durch auf- und abpipettieren gemischt. Im Thermocycler wurde zuerst bei 25 °C 10 min inkubiert. Danach folgte je ein Zyklus für 60 min bei 50 °C und für 15 min bei 70 °C um danach auf 4 °C runterzukühlen. Die cDNA-Konzentration wurde auf 5 oder 10 ng/ $\mu\text{L}$  mit RNase/DNase-freiem Wasser eingestellt und war so direkt zum Einsatz für Real-Time-Analysen bereit.

### ***Quantitative Real-Time PCR***

Zur Quantifizierung unterschiedlicher Gene mittels PCR wurde Express SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal verwendet. Hierbei bindet der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green an die durch spezifische Primer generierte doppelsträngige DNA und erhöht somit mit ihrer weiteren Generierung proportional seine Intensität. Als interner Standard zur relativen Quantifizierung wurde Rpl32 (Ribosomales Protein L32), welches nicht durch die Versuche

beeinflusst wird, gemessen. Die Messung erfolgte mit dem CFX96 Real-Time PCR Detections System von BioRad Laboratories und die Auswertung der Daten mit der entsprechenden Software.

**Tabelle 2–15: Reaktionsansatz für Real-Time PCR**

Reagenzien	Volumen (20 µL)
SYBR GreenEr Mastermix	10,0 µL
ddH <sub>2</sub> O	7,2 µL
Primer_F (10 µM)	0,4 µL
Primer_R (10 µM)	0,4 µL
cDNA	2,0 µL

**Tabelle 2–16: Temperaturprofil der Real-Time PCR**

Reaktion	Zeit	Temperatur	Zyklusanzahl
UDG Inkubation	2 min	50 °C	1 x
Denaturierung (initial)	30 sek	95 °C	1 x
Denaturierung	5 sek	95 °C	40 x
Annealing /Elongation	30 sek	60 °C	
Schmelzkurve	10 sek	95 °C	Zunahme von 0,5 °C/Zyklus
Messung	5 sek	60-95 °C	

Pro Zyklus wurde die gesamte Platte vermessen und die Werte in relative Fluoreszenzeinheiten angegeben. Zur Quantifizierung wurde das Prinzip des Threshold-Cycle (Ct, Schwellenwert) angewandt, wobei der Wert verwendet wurde, bei dem sich die Intensität signifikant von der Hintergrundfluoreszenz abhebt und im exponentiellen Bereich lag. Die Auswertung erfolgte nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Dabei wurde die Expression des zu untersuchenden Gens gegen die Expression eines nicht regulierten Gens (Rpl32) normalisiert.

Für die Analyse des hypertrophen Genprogramms wurde die Multiplex-PCR-Methode angewandt. Hierbei konnten bis zu vier Gene gleichzeitig in einer Probe durch Verwendung unterschiedlicher Sonden gemessen werden (*Nppa*, *Nppb*, *Rcan1.4* und das Kontrollgen

Rpl32). Für jedes Gen wurde ein Mix aus Primer\_F (10 µM), Primer\_R (10 µM) und entsprechender Sonde (10 µM) im Verhältnis 1:1:2 vorbereitet und lichtgeschützt verwendet.

**Tabelle 2–17: Reaktionsansatz für Multiplex Real-Time PCR**

Reagenzien	Volumen (20 µL)
iQ-PowerMix	10,0 µL
ddH <sub>2</sub> O	6,0 µL
Nppa-Mix (FAM)	0,5 µL
Nppb-Mix (HEX)	0,5 µL
Rcan1.4-Mix (Cy5-Maus, Cy5.5-Ratte)	0,5 µL
Rpl32-Mix (Texas Red)	0,5 µL
cDNA	2,0 µL

**Tabelle 2–18: Temperaturprofil der Real-Time PCR**

Reaktion	Zeit	Temperatur	Zyklusanzahl
Denaturierung (initial)	2 min	95 °C	1 x
Denaturierung	15 sek	95 °C	40 x
Annealing /Elongation	45 sek	60 °C	

## Protein

### ***Protein-Extraktion aus Zellen***

Zur Extraktion von Protein aus Zellen wurde das vorhandene Medium abgenommen und die Zellkulturplatten zweimal mit PBS gewaschen. Pro Well wurden 150 µL Kernlysepuffer, welcher vorab mit Protease- und Phosphatase-Inhibitor-Cocktails versetzt wurde, direkt in das Well gegeben und die Platte aus Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zelle mit Hilfe eines Zellschabers von dem Plattenboden abgelöst und die Zell-Puffer-Suspension in ein 1,5 mL Reagiergefäß überführt. Um das Protein aus den Zellen zu isolieren wurden drei Einfrier-Auftau-Zyklen mit jeweils 15 min in flüssigem Stickstoff und 30 min bei 30 °C durchlaufen. Die Zellreste wurden 20 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf Eis oder bei -80 °C gelagert. Die Konzentration wurde mittels Bradford bestimmt.

### ***Protein aus Gewebe***

Die Proteinextraktion aus Gewebe erfolgte mit Hilfe des Precellys 24 Homogenisator. Das Gewebe wurde zusammen mit 1 mL KernlysePuffer und einigen Keramikugeln in ein spezielles 2 mL Röhrcchen zusammengefügt und 2 x 20 sek bei 5000 rpm homogenisiert. Das Röhrcchen wurde im Anschluss bei 14.000 rpm und 4 °C für 20 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 mL Reagiergefäß überführt. Die Konzentration wurde mittels Bradford bestimmt.

### ***Bradford-Proteinbestimmung***

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford angewandt. Es wurde mittels BSA-Standards eine Standardreihe erstellt, wobei Konzentrationen von 2,56 µg/µL, 1,28 µg/µL, 0,64 µg/µL und 0,32 µg/µL verwendet wurden. Es wurde auf ddH<sub>2</sub>O normalisiert. Die Messung der Standardreihe und der Proben erfolgte im Triplikat. Es wurden jeweils 2 µL des Standards bzw. der Probe pro Well einer 96-Well Platte pipettiert, mit 200 µL filtrierten Bradford-Protein-Assay-Reagenz überschichtet und auf einem Schüttler vermischt. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 595 nm in einem Spektrophotometer (Tecan infinite M200 Pro). Anhand der Absorption der Standardreihe konnte die Konzentration der Proben ermittelt werden.

### ***SDS Page***

Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach ihrer Größe durch die Elektrophorese in einem SDS-Polyacrylamid-Gel. SDS lagert sich an die Proteine an, denaturiert und schirmt ihre eigentliche Ladung ab, sodass sie alle eine negative Ladung erhalten und sich im elektrischen Feld von der Kathode in Richtung Anode bewegen. Die verwendeten Polyacrylamid-Gele teilen sich auf ein Sammelgel, welches das obere Viertel einnimmt und das Proteingemisch aufkonzentriert, und auf ein Trenngel, welches für die Auftrennung verantwortlich ist.

**Tabelle 2–19: Herstellung der Polyacrylamidgele**

<b>Reagenzien</b>	<b>Trenngel 6 %</b>	<b>Sammelgel</b>
30 % Acrylamid	2,0 mL	0,8 mL
Trenngel-Puffer	2,6 mL	-
Sammelgel-Puffer	-	1,4 mL
ddH <sub>2</sub> O	5,2 mL	2,9 mL
TEMED	30 µL	15 µL
10 % APS	60 µL	30 µL



Für die Elektrophorese wurde das Mini-Protean-Tetra-Elektrophorese-System verwendet. Die Glasplatten wurden gereinigt, in den Rahmen eingesetzt und die Trenngellösung direkt nach Zugabe von APS und TEMED zwischen den Platten bis zu einer  $\frac{3}{4}$  Höhe der Platten gegossen. Die Phasengrenze wurde durch Überschichtung der Lösung mit Isopropanol geglättet. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, konnte das Isopropanol abgegossen werden. Zur Sammelgellösung wurde das APS und TEMED hinzugegeben und anschließend sofort auf das Trenngel gegossen. Während die obere Phase noch flüssig war, wurde ein entsprechender Kamm zur Aussparung der Taschen zwischen die Glasplatten gesteckt. Nach Auspolymerisieren des Sammelgels konnte vorsichtig der Kamm gezogen werden, das Gel in die Elektrophoresekammer gespannt werden und mit dem Laufpuffer vorab die Kammern gespült werden. Die Proteinproben wurden vorbereitet indem eine bestimmte Proteinmenge mit 4x Laemmli-Probenpuffer versetzt wurde und 5 min bei 95 °C im Thermomixer denaturiert wurde. Nun konnten sie in die Geltaschen pipettiert werden. Ein Marker dient zur Orientierung und als Größenstandard. Eine Stromspannung von 100 V wurde angelegt und die Proteine wurden so lange im Gel wandern gelassen bis das gewünschte Protein circa in der Hälfte des Geles lag.

### **Western Blot**

Beim Western Blot wurden die Proteine elektrophoretisch aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran überführt. Dafür wurde ein Tank-Transfer-System verwendet. Das SDS-Gel wurde auf eine PVDF-Membran gelegt und mit Filterpapier und Schwämmen von beiden Seiten umgeben. Dieses „Sandwich“ wurde in eine Kassette geklemmt und in den Blotting-Tank gesetzt. Wichtig ist es vorher luftblasenfrei zu arbeiten und die Kassette so einzusetzen, dass die Proteine auf die Membran transferiert werden. Der Tank wurde mit Transfer-Puffer aufgefüllt und ständig gekühlt. Bei einer Stromstärke von 340 mA wurden die Proteine innerhalb 110 min auf die Membran überführt. Die Membran wurde 3 h bei RT in 5 % Milchpulver in TBST-Lösung geblockt.

Anschließend wurde die Membran über Nacht mit dem spezifischen Antikörper in 5 % Milch bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal 15 min mit TBST-Lösung gewaschen und mit einem HRP-gekoppelten spezienspezifischen Sekundärantikörper für 3 h bei RT inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Membran erneut dreimal 15 min mit TBST gewaschen.

Die Entwicklung wurde mittels Enhanced-Chemiluminescence (ECL)-Advance-Detection-Kit durchgeführt. Diese nicht-radioaktive Methode macht sich die Oxidation von Luminol durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit dem Katalysator der Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) und der resultierende Lichtemission bei 425 nm zu Nutze. Dafür wurden die beiden Detektionslösungen zu gleichen Teilen vermengt und für 3 min auf die Membran gegeben. Die Lichtemission wurde mit der Alpha Innotech Multiimage III Dokumentationsanlage und

der AlphaView Software detektiert und konnte anschließend dargestellt bzw. densitometrisch vermessen werden.

### **Luciferase-Assay**

Für die Analyse der Aktivierung unterschiedlicher Signalwege wurden Luciferase-Reporter-Experimente durchgeführt. Das System basiert auf Plasmide, welche verschiedene Luciferasen kodieren, um die Aktivität eines an die Luciferase-gekoppelten Promotors zu bestimmen. Die Firefly-Luciferase stammt aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* und katalysiert die Oxidation von Luciferin zu OxyLuciferin, was bei 550-570 nm emittiert. Die Renilla-Luciferase stammt aus eine Seefederart (*Renilla reniformis*) und katalysiert die Reaktion von Coelenterazin zu Coenteramid, wobei Licht bei 480 nm emittiert. Durch das Dual-Luciferase Reporter Assay System von Promega ist die Messung beider Reaktionen in einem Well mit derselben Probe möglich.

Die im 12-Well-Format ausplattierten NRVCM wurden mit Adenoviren, welche ein NFAT-Firefly-Luciferase-Reporter bzw. Renilla-Luciferase-Reporter besaß, co-infiziert. Dadurch wurde bei Aktivierung von NFAT die NFAT-Bindungsstellen am Reporter besetzt und die Expression des Luciferaseenzym ausgelöst. Je höher die Intensität der NFAT-Aktivierung ausfällt desto stärker ist die Firefly-Lumineszenz. Renilla wurde analog zur Normalisierung der Transfektionseffizienz eingesetzt. Neben den NFAT/Renilla-luc-Viren wurden CEFIP-Überexpressions- oder Knockdownkonstrukte eingesetzt bzw. Transfektion von siFHL2 durchgeführt. Nach 72 h wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen und mit 100 µL Passive Lysis Puffer (Promega) versetzt. Nach kurzen Einfrier-Auftau-Zyklen wurden die Platten 15 min auf einem Schüttler bei RT inkubiert. 20 µL des Zelllysates wurden in ein Well einer 96-Well-Lumineszenzplatte pipettiert. Die Chemilumineszenz-Lösungen LAR II und Stop&Glo wurden durch das Tecan infinite m200 PRO System automatisch nacheinander injiziert und bei entsprechender Wellenlänge vermessen. Die relative Luciferase-Aktivität (RLA) wurde als Quotient aus den Lumineszenzmesswerten der Firefly- und der Renilla-Luciferase berechnet. Die Versuche wurden in Quadruplikaten durchgeführt und mindestens drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt.

### **Histologie**

#### ***Immunzytochemie***

Für Immunzytochemie wurden  $0,18 \cdot 10^6$  NRVCM/NMCM per Well in 12-Well Zellkulturplatten mit Coverslips (Deckgläser) ausplattiert. Nach 48 h wurde die Platte mit PBS gewaschen und die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Nach 10 min wurden die fixierten Zellen nochmals mit PBS gewaschen und mit 2,5 % BSA und 0,1 % Triton X-100 in PBS eine

Stunde permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Coverslips in eine feuchte Kammer überführt. Die gegen die nachzuweisenden Proteine gerichteten Antikörper wurden in 2,5 % BSA in PBS verdünnt und auf die Coverslips pipettiert. Nach mindestens einstündiger Inkubation wurden die Zellen mit DAPI und mit Fluoreszenz-getaggte Zweitantikörper überschichtet. Die Coverslips wurden anschließend dreimalig mit PBS und H<sub>2</sub>O gewaschen und mit den Zellen nach unten auf Objektträger fixiert.

Mit dem Keyence BZ-9000 Fluoreszenzmikroskop wurden die Immunfluoreszenzbilder aufgenommen.

Für Herzgewebeschnitte wurden die Herzen post mortem entnommen, mit PBS gewaschen und in Kryomolds mit Tissue-TEK eingebettet. Am Kryostaten wurden 5 µm dicke Schnitte auf Objektträger fixiert und bei -80 °C gelagert. Die Objektträger wurden im Inkubator kurz aufgetaut und in Methanol fixiert. Die Gewebeschnitte wurden mit einem Fettstift umrandet, analog zum Zellprotokoll mit spezifischen Antikörpern gefärbt und abschließend mit einem Deckgläschen versiegelt.

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) dient zur Anfärbung unterschiedlicher Strukturen im feingeweblichen Schnitt. Hierbei werden basophile Strukturen durch das Hämatoxylin blau und eosinophile Strukturen durch das Eosin rot angefärbt. Die Durchführung erfolgte routinemäßig in der Dermatologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel.

### ***Zellgrößenbestimmung***

Für die Bestimmung der Zellgröße wurden mit dem Keyence BZ-9000 (BZII Analyser-Software) bei einer 20-fachen Vergrößerung Oberflächenbilder (fullfocus und z-Stack) von NRVCM, welche nur mit α-Aktinin und DAPI angefärbt wurden, aufgenommen. Für die Vermessung wurde die HybridCellCount-Software vom Keyence verwendet. Hierbei legt die α-Aktininfärbung das zu vermessene Gebiet fest, während die DAPI-Färbung für die Anzahl der Zellkerne pro Zelle genutzt wurde. Es wurden für die Berechnung nur Zellen mit einem Zellkern vermessen, um aneinander gelagerte Zellen auszuschließen.

### **FRAP (Flouescence Recovery After Photobleaching)**

Für die FRAP-Versuche wurde ein CEFIP-EGFP-Konstrukt generiert und C2C12-Myotuben transfiziert. FRAP-Experimente wurden wie bereits beschrieben (Molt, Buhrdel et al. 2014; Leber, Ruparella et al. 2016) an einem Spinning Disk Confocal Microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) mit einem 473 nm Laser durchgeführt und mittels Zen 2012 Software (Carl Zeiss) ausgewertet. Es wurden acht unabhängige Versuche durchgeführt, wobei immer eine einzelne Z-Scheibe mit dem Laser bei 100 % Intensität für 1 ms mit acht Wiederholungen

bestrahlt wurde. Die Durchführung der FRAP-Experimente erfolgte in Kooperation mit der Zellbiologie Bonn.

## 2.2.4 Tierversuche

### Zucht und Haltung der Tiere

Die Tiere waren in der „Zentralen Tierhaltung“ des Universitätsklinikums Schleswig Holstein, Campus Kiel untergebracht. Dabei wurden die Tiere in Käfigen mit bis zu 6 Tieren mit freiem Zugang zu Trinkwasser und standardisiertem Trockenfutter untergebracht. In den Räumen wurde ein Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h eingehalten und eine konstante RT von 24 °C ( $\pm 1$  °C) gewährleistet.

Alle Tierversuchsvorhaben wurden durch das Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigt. Die einzelnen Versuche, Untersuchungen und Analysen an lebenden Tieren wurden durch den Tierschutz Kiel bewilligt, geprüft und unter strikter Berücksichtigung der ethischen Tierschutzlinien durchgeführt.

### Genotypisierung

Die Isolierung von DNA aus Mausschwanzspitzenbiopsien erfolgte mit dem Quick Extract DNA Extraction Solution von Biozym. Hierzu wurden 25  $\mu$ L Quick Extract Solution zu der Biopsie hinzugefügt, 15 sek auf dem Vortexer bearbeitet und 30 min bei 65 °C bei 700 rpm im Thermomixer inkubiert. Die Reaktion wurde durch anschließendes Aufheizen auf 98 °C für 5 min abgestoppt.

Um den Genotyp der CEFIP-Knockout Mäuse zu bestimmen waren zwei PCR nötig, für die Genotypisierung der CnA-Transgenen Tiere eine PCR bei welcher die hGH-Poly-A-Tail Kasette letztendlich bestimmt wurde (Tabelle 2-20). Die PCRs wurden nach folgendem Schema pipettiert (Tabelle 2-21).

**Tabelle 2–20: Bandengröße**

PCR für Genotyp	Primer	Bandengröße
Wildtyp-PCR	Primer 3360_33_F	320 bp
	Primer 3358_34_R	
Knockout-PCR	Primer 1260_1_F	550 bp
	Primer 1260_2_R	

Fortsetzung Tabelle 2-20

PCR für Genotyp	Primer	Bandengröße
Knockout-PCR	Primer 3360_33_F	350 bp
	Primer 3360_38_R	
Transgen-PCR	Primer 18Sm/r_122_F	122 bp
	Primer 18Sm/r_122_R	
	Primer hGHpolyA5'	419 bp
	Primer hGHpolyA3'	

Tabelle 2–21: PCR-Ansatz für Genotypisierung

Reagenzien	Volumen
10x DreamTaq Green Buffer	5,00 µL
dNTPs (10 mM)	1,00 µL
Primer_F (5 µM)	1,00 µL
Primer_R (5 µM)	1,00 µL
DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,25 µL
ddH <sub>2</sub> O	ad 48,00 µL

Tabelle 2–22: Temperaturprofil Genotypisierung

Reaktion	Zeit	Temperatur	Zyklusanzahl
Denaturierung (initial)	5 min	95 °C	1 x
Denaturierung	30 sek	95 °C	30 x
Annealing	30 sek	60 °C	
Elongation	1 min	72 °C	
Elongation (final)	10 min	72 °C	1 x
Kühlung	∞	4 °C	1 x

### **Echokardiographie**

Die Mäuse wurden mit 4 % (v/v) Isofluran (inhalativ) sediert und auf einem Wärmetisch mit Temperatursonde gelagert. Zur Untersuchung der Herzdaten wurde das Vevo 1100 Ultraschallgerät verwendet und die kardiographischen Parameter wie der linksventrikuläre Durchmesser (Left Ventrikular Internal Diameter, LVID), die Wandstärke des Septums (Interventrikular Septum, IVS) und die Stärke der Hinterwand (Left Ventrikular Posterior Wall, LVPW) ermittelt. Des Weiteren konnte aus den Parametern die Herzfrequenz, die Auswurfraction (Ejection Fraction, EF) und die systolische Verkürzungsfraction (Fractional Shortening, FS) mittels der Software Vevo LabWorkstation (VisualSonics) bestimmt werden.

### **Konstriktion der Aorta transversa**

Die aortale Konstriktion wurde im Bereich des Aortenbogens zwischen dem Truncus brachiocephalicus und der A. carotis communis sinistra durchgeführt. Das Tier erhielt initial eine Analgesie mit 0,1 mg/kg KG Buprenorphin subcutan. Danach wurde die Narkose mit 4 % (v/v) Isofluran über eine Maske eingeleitet. Um die Operation am offenen Thorax durchführen zu können, wurde eine Intubation mit einem flexiblen Tubus von 22 G notwendig. Hierfür wurde ein Venenverweilkatheter verwendet. Die Beatmung erfolgte mit einem Tidalvolumen von 200  $\mu$ L und einer Atemfrequenz von 120-130 Atemzüge/min. Aufrechterhalten wurde die Anästhesie mit Isofluran (3 % v/v). Das Fell im Bereich des linken Hemithorax wurde mit einem Einmal-Rasierer entfernt. Der Hautschnitt erfolgte transversal im Bereich des 2. Interkostalraums mit einer Breite von circa 5 mm. Links lateral des Sternums wurde mit Pinzetten stumpf der Thorax im Bereich des 2. Interkostalraums eröffnet. Die Öffnung betrug 2-3 mm. Unter einem Operationsmikroskop wurde mit zwei anatomischen Pinzetten der Aortenbogen frei präpariert. Ein 6.0 Prolene-Faden wurde unter dem Aortenbogen hindurchgezogen und eine 27 G-Nadel auf den Aortenbogen platziert. Es folgte eine Ligatur um die 27 G-Nadel und den Aortenbogen. Daraufhin wurde die 27 G-Nadel rasch entfernt. Der Durchmesser der Aorta betrug nun an dieser Stelle 27 G. Die Öffnung des Thorax verschloss sich spontan durch die Muskulatur, da diese nicht durchtrennt wurde. Die Hautnaht wurde mit 5.0 Vicryl rapid (Ethicon) durchgeführt. Die gesamte Operationsdauer betrug circa 10-15 min.

Während der gesamten operativen und postoperativen Dauer wurde unter fortlaufender rektaler Temperaturkontrolle durch einen wärmbaren Operationstisch und durch Wärmestrahler für eine ausreichende Temperierung der Maus gesorgt (automatische Feedbackregulation). Postoperativ wurden die Tiere analgetisch mit Buprenorphin (3x täglich, 0,1 mg/kg KG) versorgt. Während der Aufwachphase wurden die Mäuse isoliert im Käfig gehalten, um eine ungestörte Rekonvaleszenz zu gewährleisten.

### **Subkutane Implantation von osmotischen Pumpen (Alzet 1002) zur Isoproterenol-Infusion**

Die Tiere erhielten eine Analgesie mit 0,1 mg/kg KG Buprenorphin subcutan. Danach wurde die Narkose mit 4 % (v/v) Isofluran über eine Maske eingeleitet und mit 3 % aufrechterhalten. Da die Pumpen am Rücken der Tiere implantiert werden sollten, wurde der Rücken im Bereich der Scapulae rasiert und mit Povidon-Jod desinfiziert. Mit einer Schere wurde der Hautschnitt etwas kaudal der Scapula gesetzt. Durch stumpfe Präparation durch Öffnen und Schließen einer Schere wurde eine subkutane Tasche für die Minipumpe geformt. Sie war circa 0,5-1 cm größer als die 1,5 cm lange Minipumpe (Diameter 0,6 cm). Nach dem Einsetzen wurde die Haut durch eine Hautnaht verschlossen.

Als osmotische Minipumpen wurde das Modell 1002 der Firma Alzet verwendet, die über einen Zeitraum von 14 Tagen kontinuierlich 0,25 µL/h abgaben. Gefüllt wurden die Pumpen mit Isoproterenol in 0,9 % Kochsalzlösung oder Kochsalzlösung allein. Die Dosis betrug 18,67 µg/kg KG/min (28 mg/mL pro 25 g KG). Die Pumpen wurden mit 100 µL steriler Lösung gefüllt.

### **2.2.5 Statistische Auswertung**

Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte mit dazugehörigem Standardfehler angegeben. Die Errechnung der Mittelwerte, Standardfehler, Standardabweichungen sowie Signifikanzen wurden mit SigmaPlot 13.0 ermittelt. Statistische Auswertungen erfolgten unter Verwendung des t-Test (Studentische t-Verteilung, Zweistichprobentest) bei zwei Gruppen, oder bei mehreren Gruppen der One-Way/Two-Way ANOVA-Test gefolgt vom Student-Newman-Keul Post-hoc-Test. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.





## 3 Ergebnisse

### 3.1 Systematische Suche nach unbekanntem kardialen Genen und deren Bestätigung

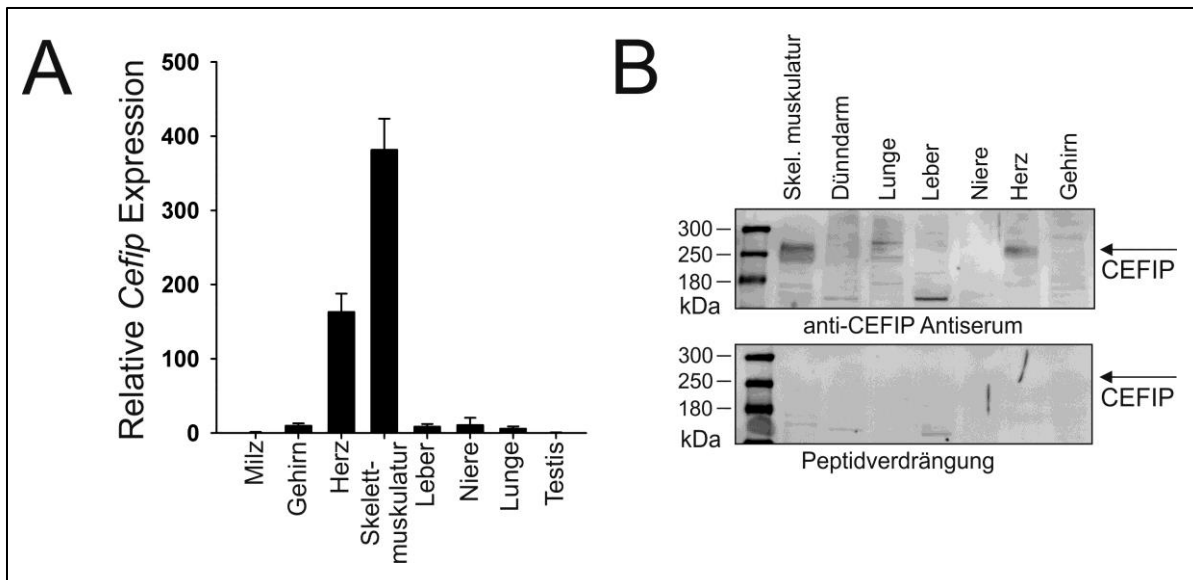
Die Z-Scheibe im Sarkomer gilt als Knotenpunkt unterschiedlichster myokardialer Signalwege. Neben ihrer rein mechanischen Funktion spielt sie eine zentrale Rolle in der Entstehung von Herz- und Skelettmuskulaturerkrankungen. Auf der Suche nach neuen, noch zu charakterisierenden Z-Scheibenproteinen wurde ein „*in silico*“ Screen für herzspezifische cDNAs durchgeführt. Hierbei wurden mehrere ESTs gefunden, deren Sequenzen mit einem bisher nicht beschriebenen Gen übereinstimmten. Dieses Gen kodiert ein 1435 aa großes Protein, welches die Bezeichnung CEFIP (Cardiac Enriched FHL2 Interacting Protein) erhielt.

#### 3.1.1 CEFIP ist ein herz- und skelettmuskel-spezifisches Protein

Nachdem die spezifische Expression von CEFIP in der Herz- und Skelettmuskulatur in humanem und murinem Gewebe via Northern Blot (Abbildung 1-7) bestätigt worden war, erfolgte die weitere Charakterisierung von CEFIP. Für ein genaueres Expressionsprofil wurde RNA aus unterschiedlichen Mausgeweben (N=6) isoliert und mit Hilfe quantitativer Real-Time PCR ausgewertet. Im Vergleich zum Kontrollgewebe Milz zeigt sich im Herzgewebe eine 163-fache Induktion und in der Skelettmuskulatur eine 384-fache Erhöhung der *Cefip*-Expression (Abbildung 3-1 A). In weiteren Organen wie Gehirn, Leber, Lunge und Niere fällt die Expression der *Cefip*-mRNA im Vergleich zur Milz gering aus.

Da es sich bei CEFIP noch um ein unbekanntes Protein handelt, sind keine Antikörper gegen CEFIP kommerziell erhältlich. Somit wurde ein Antikörper speziell für diese Versuche generiert (Kooperation mit Zellbiologie Bonn, FOR1352). Hierfür wurde ein 354 aa großes Fragment aus dem Bereich des N-Terminus des murinen CEFIP als Immunogen verwendet. Der Antikörper detektierte eine Bande bei 250 kDa, deren Signal dem Protein CEFIP zugeordnet wurde. Um sicherzustellen, dass dieses Signal tatsächlich dem Protein CEFIP entspricht, wurden Western Blot Analysen mit Peptidverdrängung durchgeführt. Bei der Peptidverdrängung wurde der Antikörper vorher mit dem CEFIP-Peptid, welches zur Antikörpergenerierung verwendet worden war, inkubiert. Dadurch ist die entsprechende CEFIP Bande nicht mehr zu detektieren (Abbildung 3-1 B). Auf den Western Blots mit unterschiedlichen Mausgeweben sind somit die spezifischen CEFIP-Banden in Herz- und Skelettmuskulatur nicht mehr vorhanden. Die Laufhöhe der Bande mit circa 250 kDa weicht etwas von der vorhergesagten Größe des Proteins ab, was wahrscheinlich auf eine komplexe Sekundär- und Tertiärstruktur zurückzuführen ist, sowie posttranslationale Modifikationen.

Auf Proteinebene zeigt sich nur eine Expression von CEFIP in Skelettmuskulatur, Lunge, Herz und Gehirn, wobei auch hier Herz- und Skelettmuskulatur stark überwiegen.



**Abbildung 3–1: Expression von CEFIP in Herz- und Skelettmuskulatur**

CEFIP ist in Herz- und Skelettmuskulatur stark exprimiert. A, Validierung des Expressionsprofils von *Cefip* in murinem Gewebe mit Hilfe quantitativer Real Time PCR zeigt eine 163-fache Induktion in Herz und eine 384-fache Induktion in Skelettmuskulatur (auf Milz als Kontrolle normalisiert). B, Die Western Blot Analyse bestätigt das Vorkommen in Herz- und Skelettmuskulatur. Die Spezifität des Antikörpers wurde durch Vorinkubation mit dem Immunogenpeptid bewiesen.

Der Vergleich von CEFIP Proteinsequenzen in unterschiedlichen Spezies wie *homo sapiens* (Mensch), *mus musculus* (Hausmaus), *rattus norvegicus* (Wanderratte), *macaca mulatta* (Rhesusaffe), *canis lupus* (Wolf) und *bos taurus* (Rind) zeigt eine hohe evolutionäre Konservierung zwischen den Spezies (Abbildung 3-2 A). Die größte Identität der Proteinsequenzen untereinander zeigen *homo sapiens* und *macaca mulatta* mit 92,4 %. Den größten Unterschied weisen *bos taurus* und *mus musculus* mit 64,5 % auf (Abbildung 3-2 B).

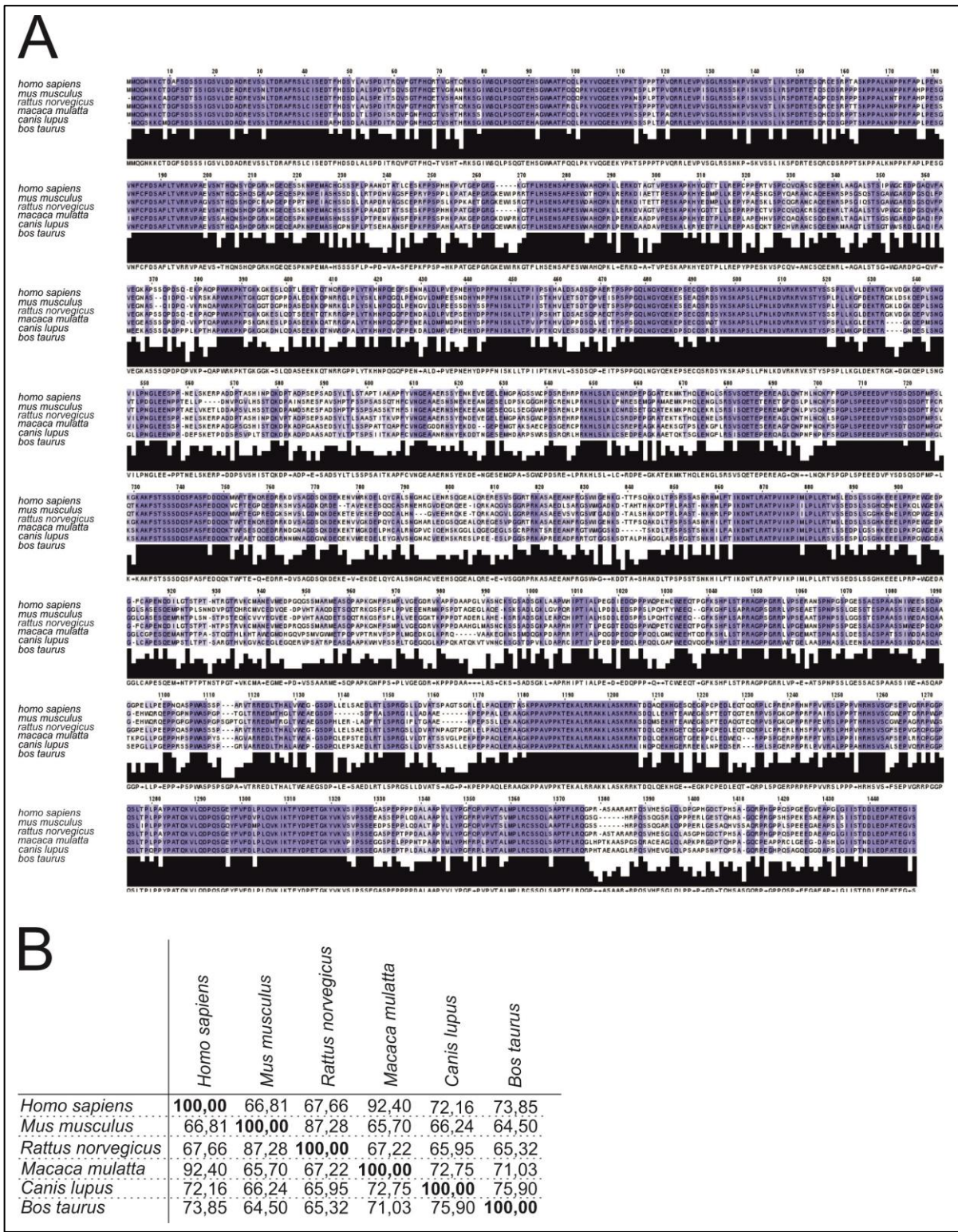
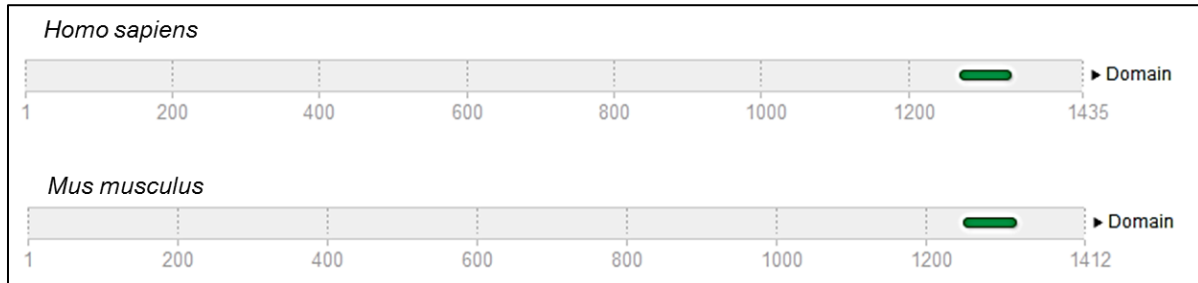


Abbildung 3–2: Evolutionäre Konservierung von CEFIP

A, Der Vergleich der Proteinsequenzen zwischen unterschiedlichen Spezies zeigt eine hohe Konservierung (dargestellt durch blaue Schattierung und graphisch schwarze Balken). B, Die Höhe der Konservierung zwischen den Spezies prozentual dargestellt.

Um Hinweise auf die Funktion von CEFIP zu erhalten, wurde nach potentiellen Bindungsdomänen und Bindungspartnern gesucht. Obwohl CEFIP mit circa 230 kDa zu den

größeren Molekülen zählt, konnten computerbasiert keine bekannten Proteinbindungsdomänen ausfindig gemacht werden. Die einzige bekannte Domäne ist eine „domain of unknown function“ (DUF4585, pfam15232; Abbildung 3-3), welche ebenfalls im prolin-rich basic protein 1 (PROB1) vorkommt, aber bisher keine bekannte Funktion zeigt.

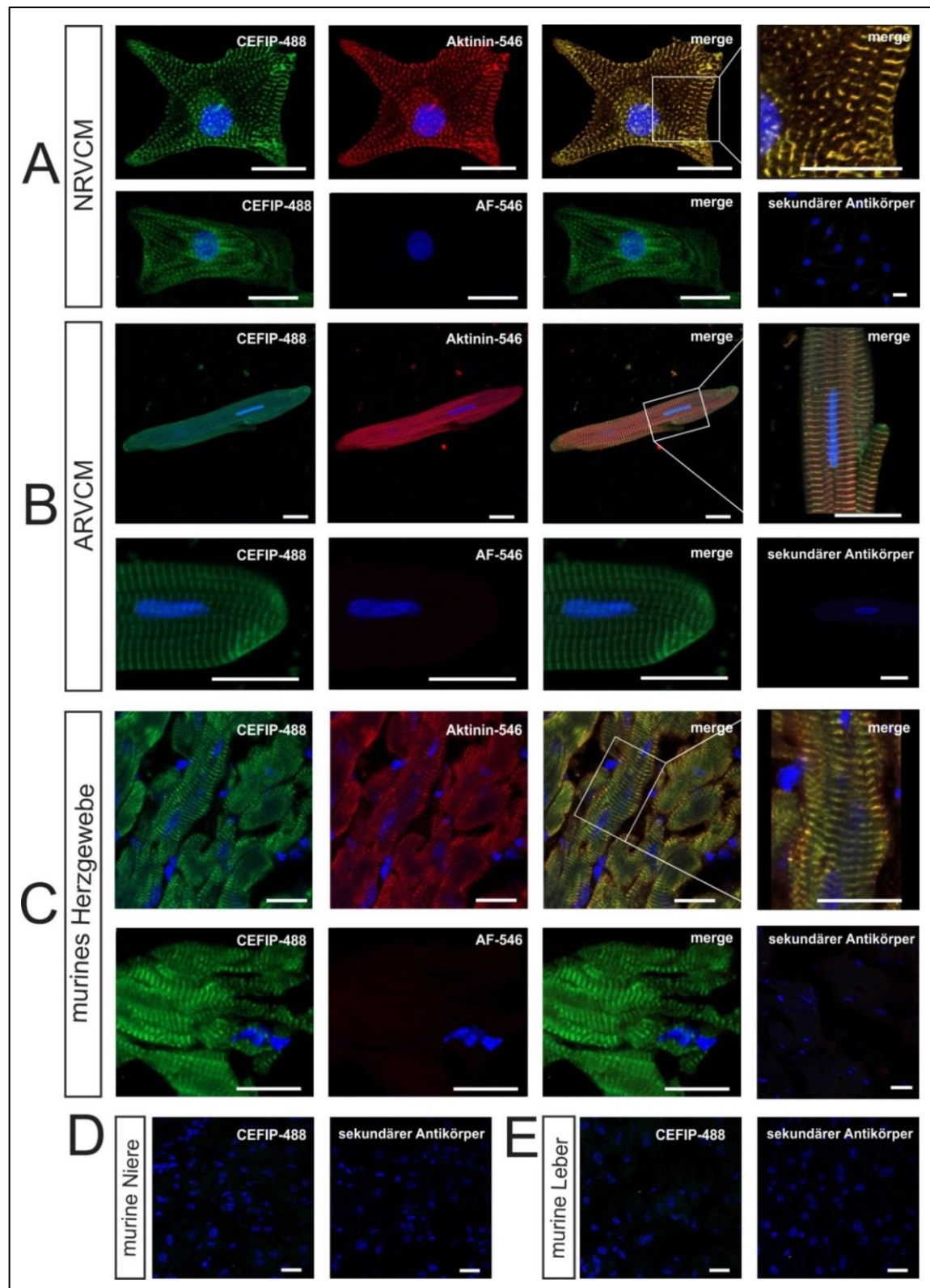


**Abbildung 3–3: Computerbasierte Suche nach bekannten Domänen**

Mit Hilfe des Online-Programms InterPro (EMBL-EBI) konnten die Aminosäuresequenzen von humanen und murinen CEFIP auf bereits bekannte Domänen untersucht werden. Die DUF4585 (grün) ist die einzige bekannte Proteinbindungsdomäne in beiden Sequenzen.

Ein weiterer Schritt war die genaue Lokalisation von CEFIP in Kardiomyozyten. Hierfür wurde der eigens generierte Antikörper verwendet und die Kardiomyozyten zusammen mit einem Antikörper gegen das bekannte Z-Scheibenständige  $\alpha$ -Aktinin gefärbt (Abbildung 3-4). In der Immunzytochemie zeigt die Färbung des endogenen CEFIP sowohl in isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten (A) und adulten Rattenkardiomyozyten (B) als auch in murinen Herzgewebeschnitten (C) ein eindeutiges Signal, welches mit  $\alpha$ -Aktinin eine überlappende Struktur an der Z-Scheibe aufweist. Färbungen in Kryoschnitten von anderem murinen Gewebe wie Leber (E) und Niere (D) zeigten kein Signal und keine Struktur bei der Färbung mit dem CEFIP-Antikörper.





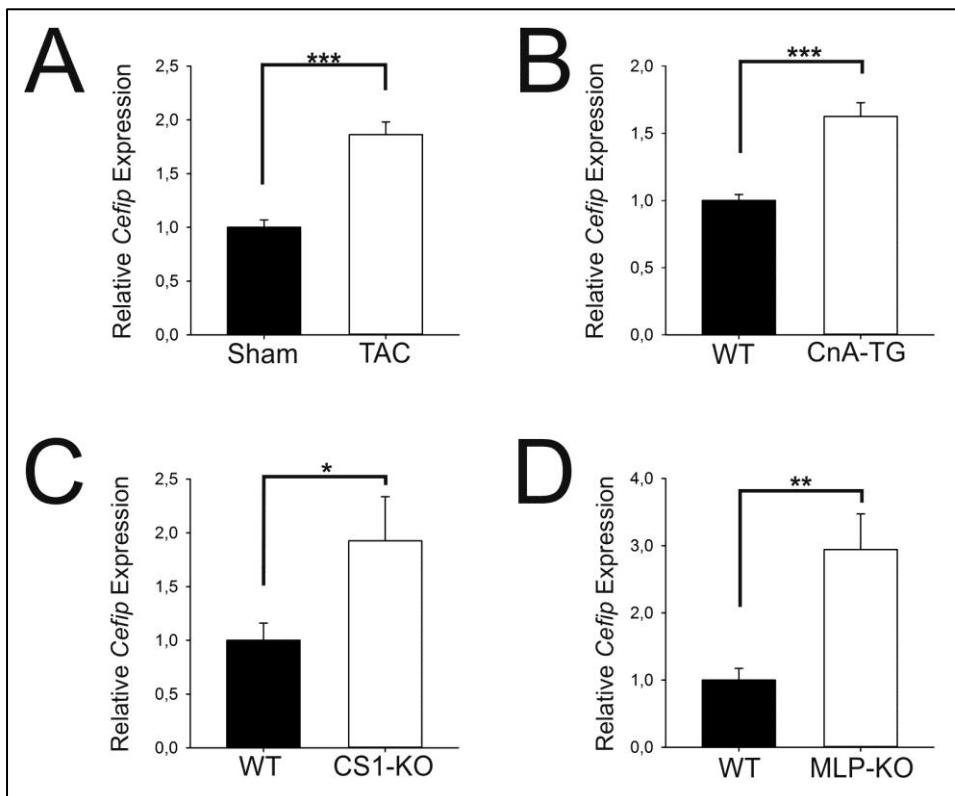
**Abbildung 3–4: Subzelluläre Lokalisation von CEFIP in NRVCN, ARVCN und murinem Gewebe**

Die Färbung von NRVCNs (A), ARVCNs (B) und murinem Herzgewebe (C) mit einem spezifischen CEFIP-Antikörper zeigt ein Signal, das mit Aktinin an der Z-Scheibe co-lokalisiert. In muriner Niere (D) und Leber (E) führt die Färbung mit dem CEFIP Antikörper zu keinem Signal. (Maßstabsbalken 20 µm; Färbung mit DAPI und sekundärem Antikörper als Negativkontrolle mitgeführt.).

## 3.2 Die Untersuchung des kardialen CEFIP in der pathologischen Hypertrophie

### 3.2.1 CEFIP ist in *in vivo* Modellen der Hypertrophie reguliert

Um einen ersten Eindruck zu bekommen, welche pathophysiologische Funktion CEFIP im Herzen besitzen könnte, wurde die Expression von CEFIP in etablierten murinen Modellen der kardialen Hypertrophie und Herzinsuffizienz mittels quantitativer Real Time PCR bestimmt. Experimentell kann Hypertrophie durch Erhöhung der Nachlast durch eine operative Konstriktion der Aorta transversa (TAC) in Mäusen ausgelöst werden. Je nach Ausprägung der Konstriktion führt die TAC über kurz oder lang zu einer Herzinsuffizienz. Transgene Mäuse, die ein konstitutiv aktives Calcineurin überexprimieren (CnA-TG), entwickeln ebenfalls eine ausgeprägte Hypertrophie, welche mit fortschreitendem Alter zum Herzversagen führen kann. CEFIP ist sowohl in diesen bekannten Hypertrophie-Modellen als auch in Modellen der dilatativen Kardiomyopathie wie Muscle-LIM-Protein-Knockout (MLP-KO) und Calsarcin-1 defizienten Mäuse (CS1-KO) signifikant hochreguliert (Abbildung 3-5 A-D).



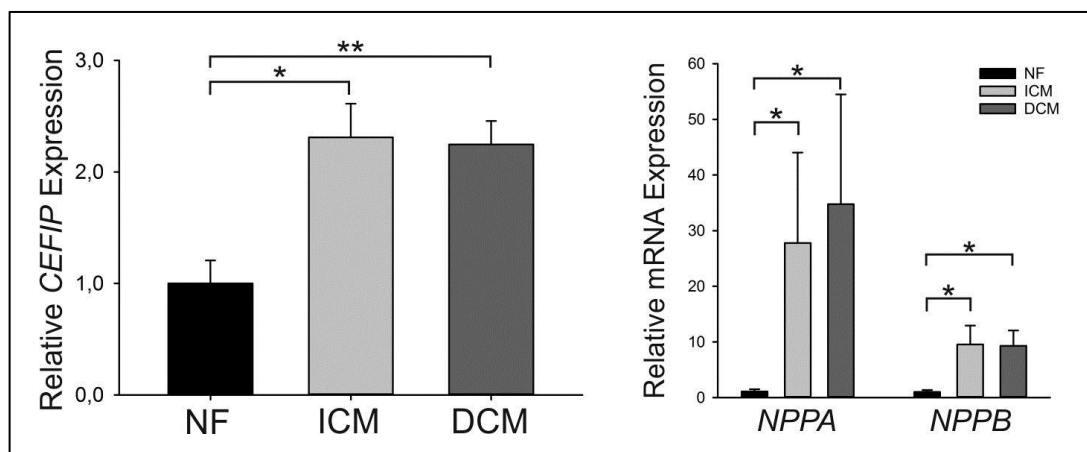
**Abbildung 3–5: Regulation von *Cefip* in Modellen der myokardialen Hypertrophie**

Die Expression von *Cefip* wurde in unterschiedlichen Modellen der Hypertrophie und Herzinsuffizienz ermittelt. A, *Cefip* mRNA-Level in TAC-operierten Mäusen ist im Vergleich zu schein-operierten Tieren erhöht ( $1,86 \pm 0,1$ -fach;  $p < 0,001$ ;  $n = 6$  pro Gruppe). B-D, Gleichfalls ist die *Cefip* Expression in

transgenen Mäusen, welche konstitutiv aktives Calcineurin (CnA) im Herzen überexprimieren, hochreguliert ( $1,63 \pm 0,1$ -fach;  $p < 0,001$ ;  $n=12$  pro Gruppe), wie auch in Calsarcin-1-Knockout (CS1) Mäusen ( $1,93 \pm 0,4$ -fach;  $p < 0,001$ ;  $n=11$  pro Gruppe), und in Muscle-LIM-Protein-Knockout (MLP) Mäusen ( $2,94 \pm 0,5$ -fach;  $p < 0,05$ ;  $n=6$  pro Gruppe) ( $\pm$  SEM; Signifikanzniveaus: \*  $\triangleq$   $p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq$   $p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq$   $p < 0,001$ ).

### 3.2.2 Humane DCM-Proben zeigen erhöhte *CEFIP* Spiegel

In humanen Gewebeproben aus Herzen von Patienten mit einer nachgewiesenen ischämischen oder dilatativen Kardiomyopathie konnte im Vergleich zu Herzproben von Gesunden ohne Herzerkrankung ein signifikant erhöhter Spiegel von *CEFIP* auf RNA-Ebene bestätigt werden (Abbildung 3-6).



**Abbildung 3–6: Regulation von *CEFIP* in ICM und DCM**

*CEFIP* mRNA-Spiegel sind in humanen Herzgewebeproben von Patienten mit einer ischämischen oder dilatativen Kardiomyopathie stark erhöht (ICM:  $2,3 \pm 0,3$ -fach;  $p < 0,001$ ;  $n=6$  NF/ 10 ICM; DCM:  $2,25 \pm 0,2$ -fach;  $p < 0,001$ ;  $n=6$  NF/ 10 DCM), wie auch die hypertrophen Genmarker *NPPA* (ICM:  $27,78 \pm 16,3$ -fach;  $p < 0,05$ ;  $n=6$  NF/ 10 ICM; DCM:  $34,76 \pm 19,7$ -fach;  $p < 0,05$ ;  $n=6$  NF/ 10 DCM) und *NPPB* (ICM:  $9,55 \pm 3,37$ -fach;  $p < 0,05$ ;  $n=6$  NF/ 10 ICM; DCM:  $9,3 \pm 2,76$ -fach;  $p < 0,05$ ;  $n=6$  NF/ 10 DCM) ( $\pm$  SEM; Signifikanzniveaus: \*  $\triangleq$   $p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq$   $p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq$   $p < 0,001$ ).

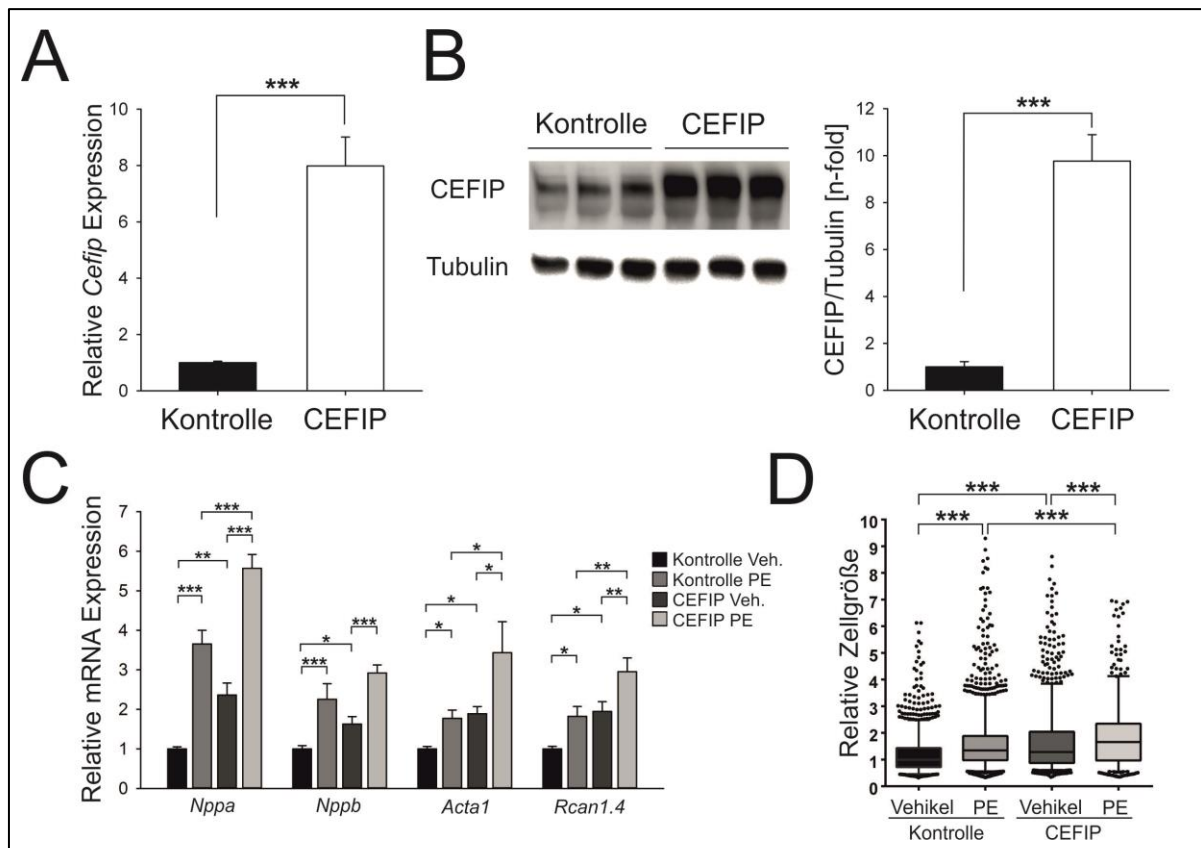
### 3.3 Einfluss von CEFIP auf die Hypertrophie *in vitro*

#### 3.3.1 Adenovirale CEFIP-Überexpression führt zu Hypertrophie

Da die Induktion von *Cefip* in Maus-Modellen der Hypertrophie eine Rolle von CEFIP in der Pathogenese der Hypertrophie nahelegt, wurde in Kardiomyozyten die Folge einer Überexpression oder Suppression von *Cefip* untersucht. Dazu wurden adenovirale Konstrukte generiert, die CEFIP überexprimieren, und eine synthetische miRNA, welche gegen die CEFIP-Sequenz gerichtet ist und damit das Protein herunterreguliert. Dadurch sind funktionelle Analysen in An- und Abwesenheit von CEFIP möglich.

Das 6000 bp große murine CEFIP wurde erfolgreich in den pAd/CMV/V5-Vektor zur Generierung von Adenoviren kloniert und die entstandenen Viren in neonatalen Rattenkardiomyozyten funktionell getestet. Durch die Größe von CEFIP ist eine Überexpression von *Cefip* auf mRNA-Ebene maximal 8-fach, auf Proteinebene maximal 12-fach möglich und kann nicht durch eine weitere Steigerung der Viruslast verstärkt werden (Abbildung 3-7 A-B). Die Überexpression von *Cefip* führt zur Induktion der typischen hypertrophen Gene wie ANF (Atrial Natriuretic Factor, Transkript *Nppa*), BNP (Brain Natriuretic Peptide, Transkript *Nppb*) und Skelettmuskel-Alpha-Aktin (*Acta1*) (Abbildung 3-7 C). Ebenfalls wurde *Rcan1.4*, ein NFAT-sensitives Gen, durch CEFIP hochreguliert. Dies weist erstmals auf eine Rolle von CEFIP im Calcineurin-NFAT Signalweg hin. Die adenovirale Überexpression von CEFIP führt zu einer signifikanten Vergrößerung der Zellfläche verglichen mit LacZ-Kontrollvirus infizierten Zellen (Abbildung 3-7 D). Dieser Effekt konnte durch Stimulation der Zellen mit Phenylephrin nochmals verstärkt werden. Die Zellgröße wurde halbautomatisch vermessen. Hierbei wurden Bilder von mit  $\alpha$ -Aktinin gefärbten Zellen aus verschiedenen Arealen aufgenommen und mit Hilfe einer computerbasierten und validierten Methode vermessen. Ausgewertet wurden nur Zellen, die einen einzelnen Kern aufweisen und nicht mit anderen Zellen in Zell-Zell-Kontakt stehen bzw. eine Größe von 200  $\mu\text{m}^2$  überschreiten.

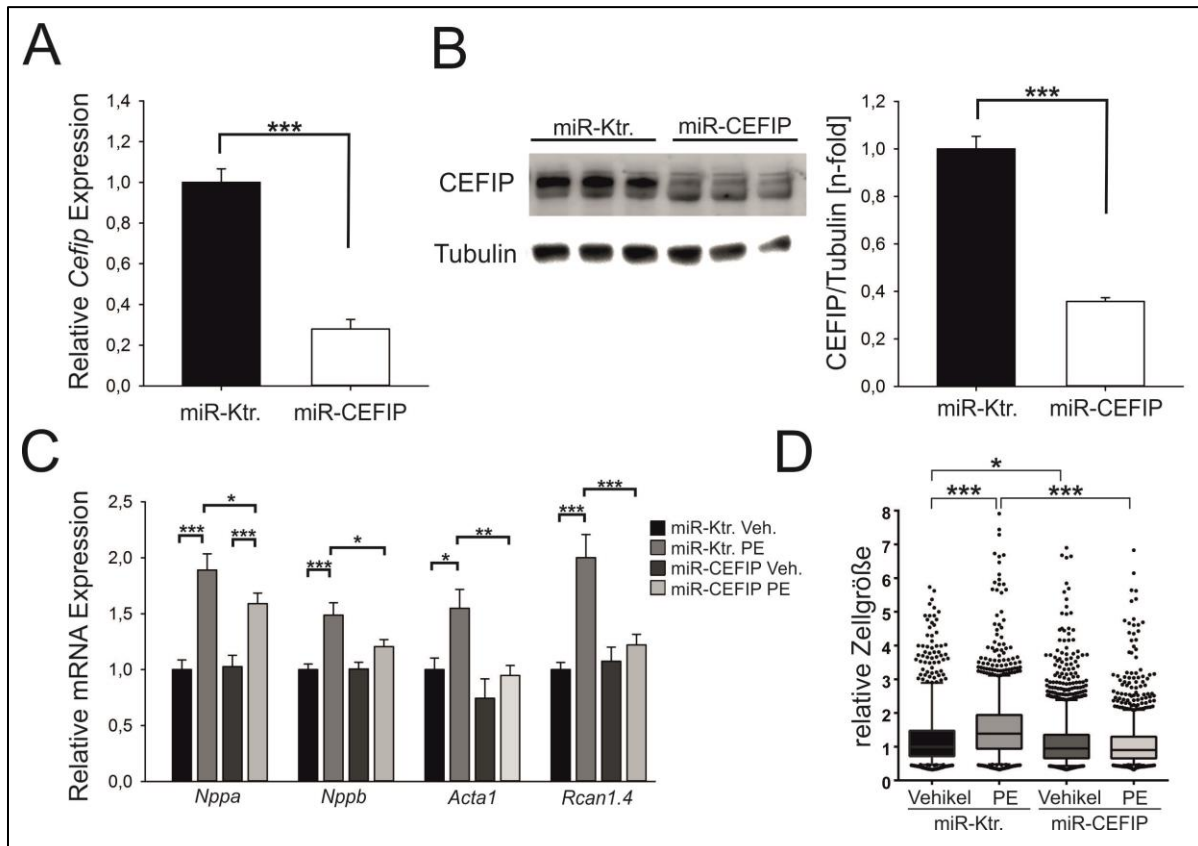




### Abbildung 3–7: Auswirkung der adenoviralen Überexpression von CEFIP in NRVCMs

CEFIP-Überexpression führt in Kardiomyozyten zu Hypertrophie. A und B, adenoviraler Gentransfer führt zu einer  $8,0 \pm 0,2$ -fachen Überexpression von *Cefip* auf mRNA-Ebene ( $p < 0,001$ ;  $n=9$ ), und zu einer  $9,8 \pm 0,4$ -fachen Überexpression des Proteins ( $p < 0,001$ ;  $n=9$ ). C, qPCR zeigt eine Induktion der hypertrophen Markergene *Nppa*, *Nppb*, *Acta1* und *Rcan1.4* durch den Einfluss von CEFIP-Überexpression (*Nppa*:  $2,36 \pm 0,3$ -fach,  $p < 0,01$ ; *Nppb*:  $1,63 \pm 0,2$ -fach,  $p < 0,05$ ; *Acta1*:  $1,9 \pm 0,2$ -fach,  $p < 0,05$ ; *Rcan1.4*:  $1,95 \pm 0,3$ -fach,  $p < 0,05$ ;  $n=12$ ). Stimulation mit Phenylephrin verstärkt den hypertrophen Effekt. D, Folglich, vergrößert der Überschuss an CEFIP auch die Zellgröße von NRVCMs signifikant ( $1,39 \pm 0,02$ -fach;  $p < 0,001$ ;  $n=1000$ ) ( $\pm$  SEM; Signifikanzniveaus: \*  $\triangleq$   $p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq$   $p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq$   $p < 0,001$ ).

Die verstärkte Anwesenheit von CEFIP führt zu einer hypertrophen Antwort. Um den Effekt der Abwesenheit von CEFIP zu überprüfen, wurde eine synthetische miRNA gegen CEFIP in den adenoviralen Vektor kloniert. Durch diese synthetische miRNA konnte CEFIP maximal um 80 % herunterreguliert werden (Abbildung 3-8 A-B). Dieser Effekt konnte auch nicht durch Dosissteigerung weder auf RNA noch auf Proteinlevel verstärkt werden. Bei Abwesenheit von *Cefip* in neonatalen Rattenkardiomyozyten normalisierte sich die Expression der fetalen Genmarker wie *Nppa*, *Nppb* und *Acta1*. Nach Stimulation mit Phenylephrin scheint ein niedriger CEFIP-Spiegel sogar antihypertroph zu wirken. Auch die Größe der Zellen ist nicht verändert im Vergleich zur Kontrolle und kann auch mit Phenylephrin nicht steigen (Abbildung 3-8 C-D).



**Abbildung 3–8: Auswirkung des „Knockdowns“ von CEFIP in NRVCMs**

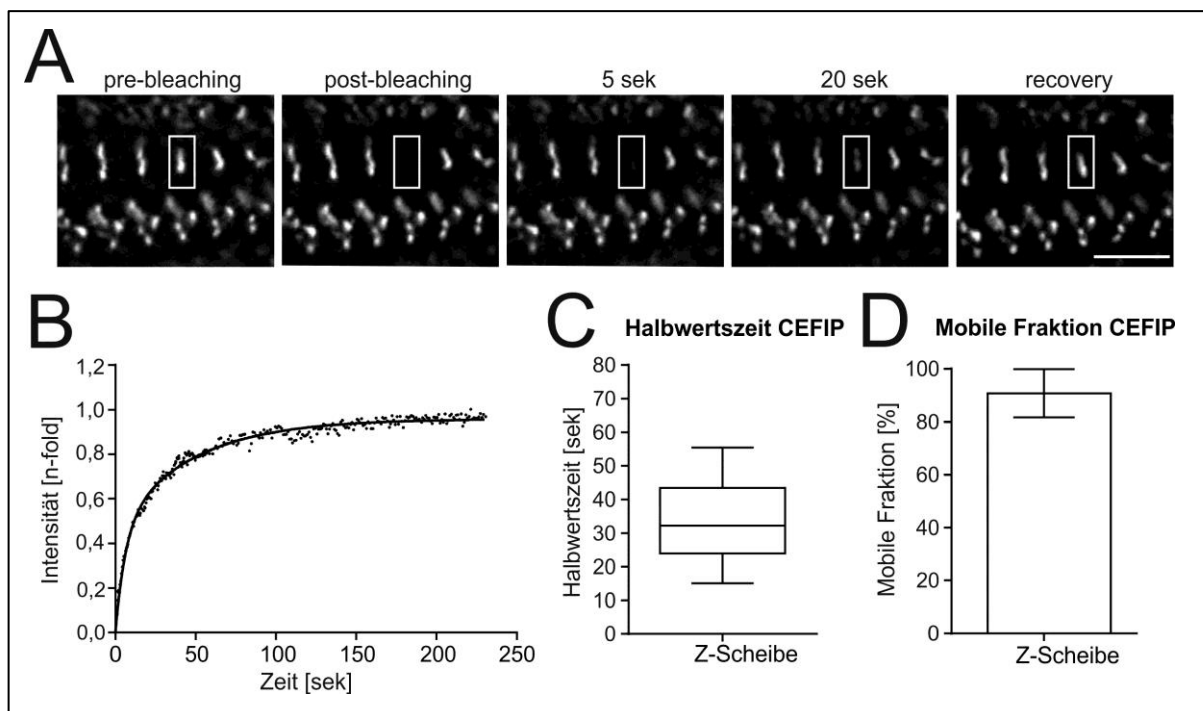
A und B, „Knockdown“ von *Cefip* mittels synthetischer miRNA führt zu einer  $72 \pm 5$  %-igen Herabregulation von *Cefip* auf mRNA-Ebene ( $p < 0,001$ ,  $n = 9$ ) und einer  $64,2 \pm 1,6$  %-igen auf Proteinebene ( $p < 0,001$ ,  $n = 9$ ). C, Expressionsanalysen mittels qPCR zeigen durch die Stimulation mit Phenylephrin (PE) eine Induktion der hypertrophen Genmarker *Nppa*, *Nppb*, *Acta1* und *Rcan1.4* in Kontroll-Zellen. In Kardiomyozyten mit einem *Cefip*- „Knockdown“ bleibt diese Induktion vollständig aus. D, Herabregulation von CEFIP verhindert die zelluläre Hypertrophie durch Phenylephrin, gemessen als Vergrößerung der Zelloberfläche ( $\pm$  SEM; Signifikanzniveaus: \*  $\triangleq p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq p < 0,001$ ).

### 3.3.2 CEFIP ist ein hochdynamisches Protein

Durch die Immunzytochemie konnte gezeigt werden, dass CEFIP an der Z-Scheibe lokalisiert ist. Um genauere Vorstellungen über die Funktion dieses unbekanntes Proteins zu bekommen, wurden erste kinetische Experimente durchgeführt. Die Z-Scheibe ist ein Komplex aus diversen Struktur- und Funktionsproteinen. Durch FRAP (*Fluorescence-Recovery-after-Photobleach*) Experimente kann das dynamische Verhalten von Proteinen untersucht werden und mit diesen Informationen statische Strukturproteine von dynamischen Proteinen unterschieden werden. Die Versuche wurden in Kooperation mit der Zellbiologie Bonn (FOR1352) durchgeführt.

Dabei wurde kultivierten murinen Myotuben aus immortalisierten Mausmyoblasten mit EGFP-gekoppeltes CEFIP infiziert und dessen Fluoreszenzintensität lokal an einer einzelnen Z-Scheibe bestimmt (*pre-bleach*). Mit Hilfe eines Spinning Disc Mikroskopes konnte durch kurze Laserimpulse diese Fluoreszenz des EGFP an der Z-Scheibe irreversibel beschädigt werden (*bleach*). Es wurde die Zeit gemessen, die bis zum vollständigen Austausch durch andere fluoreszenzmarkierte Moleküle aus der Umgebung an dieser *Bleach*-Stelle gebraucht wurde (*recovery*) (Abbildung 3-9 A).

Die Zeit bis zur Wiederherstellung von 50 % des Signals an der gebleichten Stelle (Halbwertszeit) betrug 32,5 sek und es wurden 91,3 % der mobilen Fraktion gemessen (Abbildung 3-9 B-D). Das schnelle dynamische Verhalten im Vergleich zu anderen Proteinen (Tabelle 3-1) und die hohe Mobilität sprechen für eine hohe Löslichkeit und Mobilität von CEFIP und somit einer potentiellen Rolle in Signalübertragung oder Remodeling.



**Abbildung 3–9: Analyse der Mobilität von CEFIP in Myotuben**

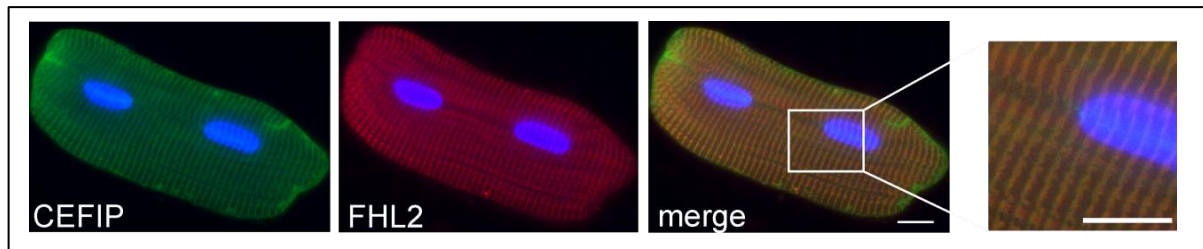
CEFIP ist ein dynamisches Protein. A-D, FRAP Analyse der CEFIP-Dynamik in der Z-Scheibe in kultivierten Myotuben mittels EGFP-gekoppeltem CEFIP. A, CEFIP ist an der Z-Scheibe lokalisiert. Das EGFP-Signal von CEFIP an einer einzelnen Z-Scheibe wurde gebleicht und über die Zeit die Wiederherstellung des Signals beobachtet. Zeitpunkte vor und direkt nach dem Bleichen bzw. 5 sek, 20 sek danach und nach vollständiger Signalerholung wurden dokumentiert. B, Die Wiederherstellung der Intensität über die Zeit von CEFIP an der Z-Scheibe. C, Die Halbwertszeit von CEFIP beträgt 32,2 sek. D, 91 % des Proteins befindet sich in der mobilen Fraktion (n=8) (Maßstabsbalken 5 µm).

**Tabelle 3–1: Übersicht von Halbwertszeiten und mobilen Fraktionen von bekannten herzspezifischen Proteinen**

Protein	$t_{1/2}$	Mobile Fraktion (%)	Referenz
Filamin C	18 ± 5 sek	81 ± 8	(Leber, Ruparelia et al. 2016)
CEFIP	32 ± 5 sek	91 ± 3	(Dierck, Kuhn et al. 2017)
Aciculin/PGM5	55,6 sek	93 ± 4	(Molt, Buhrdel et al. 2014)
$\alpha$ -Aktinin2	176 ± 68 sek	87 ± 10	(Leber, Ruparelia et al. 2016)
Titin	2,1 ± 0,4 h	49 ± 4	(da Silva Lopes, Pietas et al. 2011)

### 3.4 CEFIP interagiert mit FHL2 und induziert eine Calcineurin abhängige Hypertrophie

Die Z-Scheibe ist ein großer Komplex unterschiedlichster Proteine, welche ständig miteinander interagieren. Um die exakte Funktion des noch unbekanntes CEFIP zu erforschen, wurde mit Hilfe eines Yeast 2-Hybrid Experimentes potentielle Bindungs- und Interaktionspartner gesucht. Aufgrund der Größe und Autoaktivität des vollständigen CEFIP mussten mehrere Versuche mit Fragmenten von CEFIP durchgeführt werden. Drei Fragmente (A1289-966, A1966-2160, A12160-3168) wurden für jeweils eine Yeast 2-Hybrid Analyse verwendet. In allen drei Screens wurden typische Herz- und Skelettmuskel-Proteine, wie z. B.  $\alpha$ -Aktinin (Tabelle 1-2), detektiert. Interessanterweise wurden bei den Screens mit A1966-2160 und A12160-3168 diverse Klone für das bereits bekannte und gut erforschte Protein FHL2 gefunden. Diese Interaktion wurde mit Hilfe einer Co-Immunopräzipitation (Abbildung 1-9) bestätigt. Dabei wurde HA-gekoppeltes FHL2 mit MYC-gekoppelten CEFIP oder einem Leervektor als Kontrolle in HEK293-T Zellen co-transfiziert. In der IP wurde keine Bande mit dem Leervektor, jedoch mit CEFIP und FHL2 detektiert. FHL2 ist als herzspezifisches Protein bekannt und ist ebenfalls an der Z-Scheibe lokalisiert. In adulten ventrikulären Rattenkardiomyozyten konnte die Co-Lokalisation zwischen FHL2 und CEFIP bestätigt werden (Abbildung 3-10).



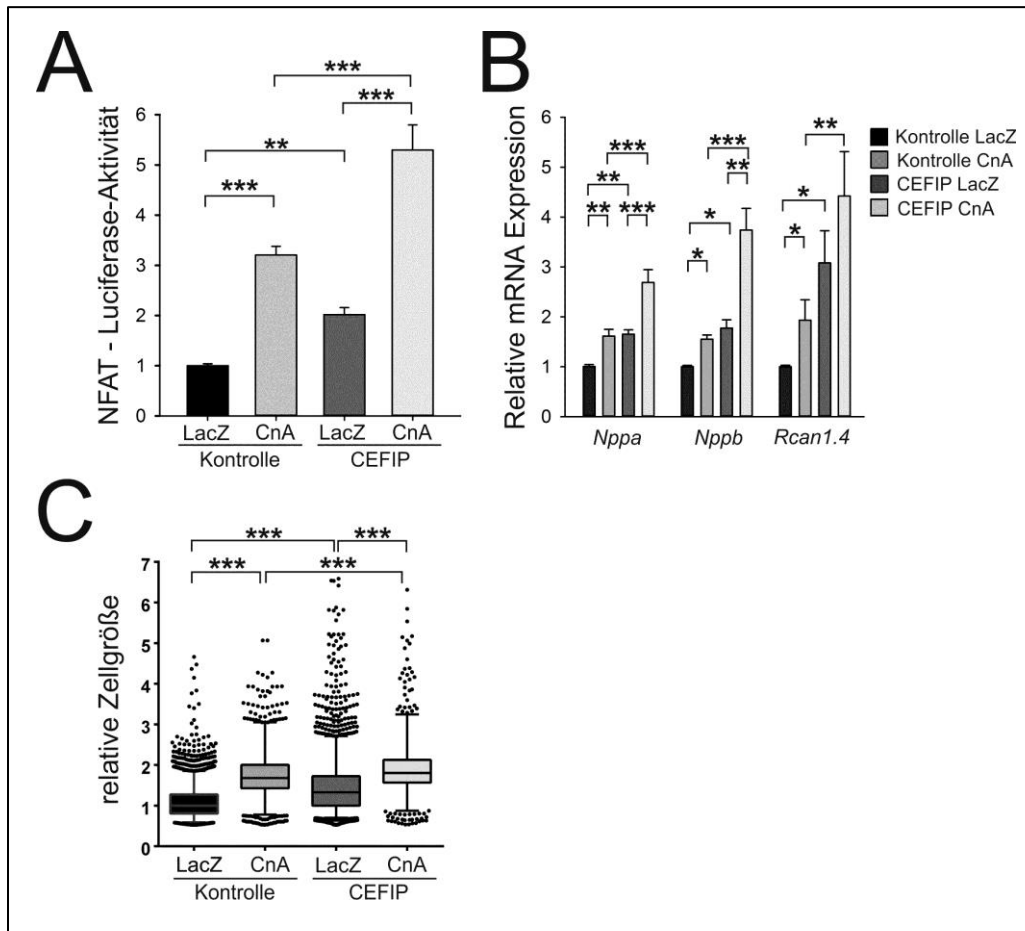
**Abbildung 3–10: Bestätigung des identifizierten Interaktionspartner FHL2 mittels Co-Lokalisation**

Co-Immunfärbung von adulten Rattenkardiomyozyten bestätigen die Co-Lokalisation von CEFIP und FHL2 an der Z-Scheibe (Maßstabsbalken 10  $\mu\text{m}$ ).

### 3.4.1 CEFIP aktiviert den Calcineurin-NFAT Signalweg in NRVCMS

FHL2 wurde bereits als Protein im Herzen beschrieben, welches durch seine direkte Bindung an Calcineurin das pathologische Herzwachstum hemmt. Mit diesem Hintergrund und dem Wissen, dass auch CEFIP direkt mit FHL2 interagiert, wurde der Einfluss von CEFIP auf den Calcineurin-NFAT Signalweg und seine Rolle als dynamisches Protein analysiert.

Hierfür wurde untersucht, wie die Überexpression von CEFIP in NRVCMS den Calcineurin-NFAT Signalweg beeinflusst. Parallel zur adenoviralen Überexpression von CEFIP wurden die Zellen mit einem Reporter-Adenovirus, welches unter Einfluss eines NFAT-Promotors Luciferase exprimiert (AdNFAT-luc), und einem Virus für die Normalisierung mit Renilla (AdRenilla) infiziert. Bei Überexpression von CEFIP steigt die NFAT-Luciferase-Aktivität unter Normalbedingungen signifikant an. Durch Zugabe von konstitutiv aktivem Calcineurin (Ad $\Delta$ CnA) wird die NFAT-Luciferase-Aktivität ebenfalls gesteigert. Bei paralleler CEFIP- und Calcineurin-Überexpression wird dieser Effekt noch weiter gesteigert (Abbildung 3-11 A). Dies spiegelt sich in der Induktion der fetalen Genmarker wieder, wobei besonders der von Calcineurin-NFAT Signalweg abhängige *Rcan1.4* dabei ansteigt (Abbildung 3-11 B). Auch die Zellgröße wird durch Calcineurin-Überexpression signifikant gesteigert (Abbildung 3-11 C).



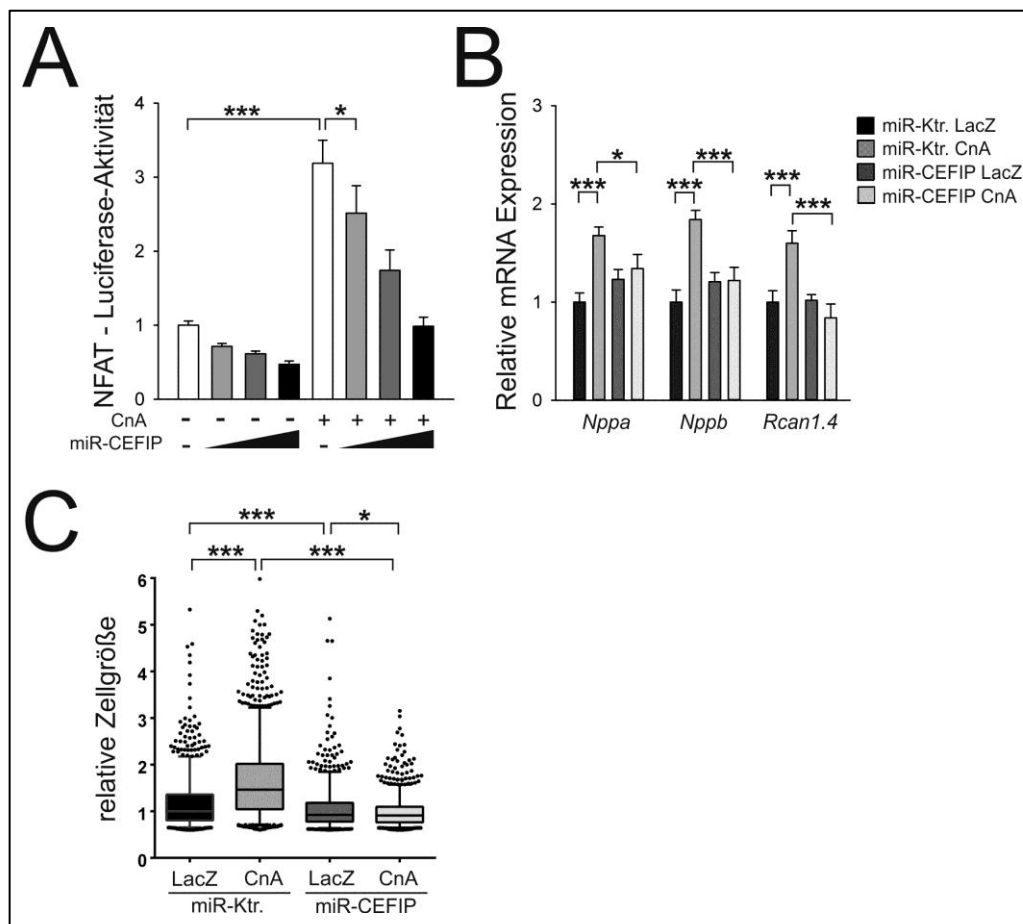
**Abbildung 3–11: Modulation der NFAT-Luciferase-Aktivität in NRVCMs nach CEFIP Überexpression**

CEFIP-Überexpression steigert die NFAT-Luciferase-Aktivität. A, Für Luciferase-Reporter-Assays wurden NRVCMs co-infiziert mit Adenoviren, die Firefly-NFAT-Luciferase, Renilla-Luciferase, konstitutiv aktives Calcineurin neben CEFIP oder  $\beta$ -Galactosidase überexprimieren. Renilla-Luciferase-Aktivität wurde für die Normalisierung verwendet. Die Überexpression von CEFIP steigert die NFAT-Luciferase-Aktivität  $2,02 \pm 0,1$ -fach ( $p < 0,001$ ,  $n=9$ ). B, Die Überexpression von konstitutiv aktivem Calcineurin fördert die Induktion der hypertrophen Genmarker (*Nppa*, *Nppb* und *Rcan1.4*). Wenn zur gleichen Zeit CEFIP überexprimiert wird, steigert sich dieser Effekt (*Nppa*:  $1,66 \pm 0,1$ -fach,  $p < 0,01$ ,  $n=9$ ; *Nppb*:  $1,77 \pm 0,2$ -fach,  $p < 0,05$ ,  $n=9$ ; *Rcan1.4*:  $3,1 \pm 0,6$ -fach,  $p < 0,05$ ,  $n=9$ ). C, Die Überexpression von Calcineurin vergrößert die Zelloberfläche von NRVCMs, welches durch CEFIP-Überexpression noch verstärkt wird ( $1,2 \pm 0,02$ ,  $p < 0,001$ ,  $n=2800$ ) ( $\pm$  SEM; Signifikanzniveaus: \*  $\triangleq p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq p < 0,001$ ).

### 3.4.2 „Knockdown“ von CEFIP blockiert den Calcineurin-NFAT Signalweg in NRVCMs

Mittels synthetischer miRNA gegen CEFIP wurde die Proteinexpression von endogenem CEFIP in NRVCMs stark reduziert. Untersucht wurde der dosisabhängige Effekt dieser

Herabregulation von CEFIP auf die NFAT-Luciferase-Aktivität bei gleichzeitiger Infektion mit dem NFAT-luc-Reportervirus und Renilla-luc-virus. Die Suppression von CEFIP zeigt eine dosisabhängige Reduktion der NFAT-Luciferase-Aktivität (Abbildung 3-12 A). Dies spiegelt sich auch in den Messungen der hypertrophen Genmarker und der Zellgröße wieder. Die Induktion der NFAT-Luciferase-Aktivität durch konstitutiv aktives Calcineurin konnte durch Reduktion von endogenem CEFIP abgeschwächt oder sogar komplett aufgehoben werden. Dies gilt auch für die Induktion der hypertrophen Genmarker und die Zellgröße (Abbildung 3-12 B-C).



**Abbildung 3–12: Modulation der NFAT-Luciferase-Aktivität in NRVCMs nach CEFIP „Knockdown“**

„Knockdown“ von CEFIP verhindert Calcineurin induzierte Hypertrophie. A, Infektion von NRVCMs mit verschiedenen Mengen der synthetischen miRNA, welche CEFIP herunterreguliert (12,5, 25 und 50 moi) senken dosisabhängig die NFAT-Luciferase-Aktivität bis zu  $30,96 \pm 4,5\%$  ( $p < 0,001$ ,  $n=9$ ). B, Adenoviraler „Knockdown“ von *Cefip* schwächte die durch konstitutiv aktives Calcineurin hervorgerufene Induktion von *Nppa*, *Nppb* und *Rcan1.4*. C, Ebenso verhindert das Herunterregulieren von CEFIP das durch Calcineurin verursachte Zellwachstum in neonatalen Kardiomyozyten ( $\pm$  SEM; Signifikanzniveaus: \*  $\triangleq p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq p < 0,001$ ).

### **3.4.3 Die Induktion der NFAT-Luciferase-Aktivität durch CEFIP ist nicht FHL2-abhängig**

FHL2 spielt im Calcineurin-NFAT Signalweg eine wichtige Rolle. FHL2 bindet direkt an Calcineurin und kann so die Hypertrophieinduktion verhindern. Da sowohl FHL2 und CEFIP als auch FHL2 und Calcineurin miteinander interagieren, ist ein Komplex aus diesen drei Proteinen wahrscheinlich und es stellt sich die Frage, ob die Aktivierung des Calcineurin-Signalweges durch CEFIP über FHL2 reguliert wird.

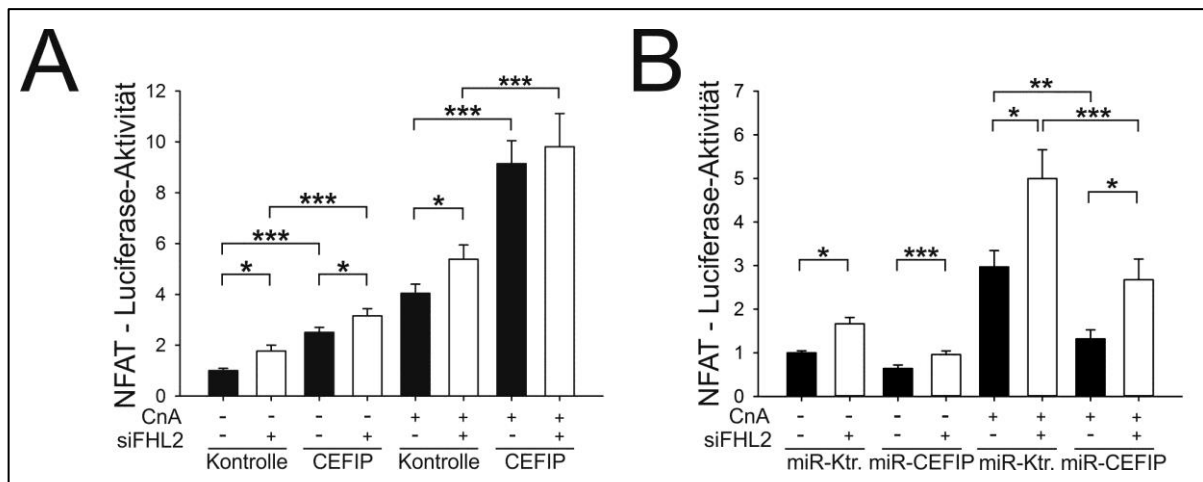
Um die Auswirkung der Interaktion zwischen CEFIP und FHL2 zu bewerten, wurden die Versuche unter Abwesenheit von FHL2 durch Transfektion einer siRNA gegen FHL2 wiederholt. Unter Ausgangsbedingungen führt die Abwesenheit von FHL2 zu einer Steigerung der NFAT-Luciferase-Aktivität. Die gleichzeitige Überexpression von CEFIP und Herunterregulation von FHL2 zeigt jedoch nur einen leichten additiven Effekt auf den Anstieg der Luciferase-Aktivität (Abbildung 3-13 A).

Ein „Knockdown“ von CEFIP schwächt den hypertrophen Effekt auch unter FHL2-Abwesenheit ab. Dennoch konnte die Induktion der NFAT-Luciferase-Aktivität, welche durch Herunterregulation von FHL2 hervorgerufen wurde, durch Deletion von CEFIP nicht verhindert werden (Abbildung 3-13 B).

Die Überexpression von sowohl konstitutiv aktivem Calcineurin als auch CEFIP in Abwesenheit FHL2 verändert die NFAT-Luciferase-Aktivität nicht signifikant im Vergleich zur Überexpression von Calcineurin und CEFIP in Anwesenheit von FHL2 (Abbildung 3-13 A). Das Expressionsniveau von FHL2 scheint also für die Effekte von CEFIP irrelevant zu sein. Andererseits verhindert der „Knockdown“ von CEFIP nicht komplett die Aktivierung der NFAT-Luciferase-Aktivität in Abwesenheit von FHL2 und bei gleichzeitiger Überexpression von Calcineurin (Abbildung 3-13 B).

Die vorherigen Ergebnisse zeigen, dass CEFIP eine wichtige Rolle im Calcineurin-NFAT Signalweg zu haben scheint, aber nicht linear mit FHL2 interagiert. Stattdessen könnte CEFIP eine eigene Rolle im Calcineurin-NFAT Signalweg in Kardiomyozyten haben.





**Abbildung 3–13: Untersuchung eines additiven Effekts von FHL2 und CEFIP auf die NFAT-Luciferase-Aktivität**

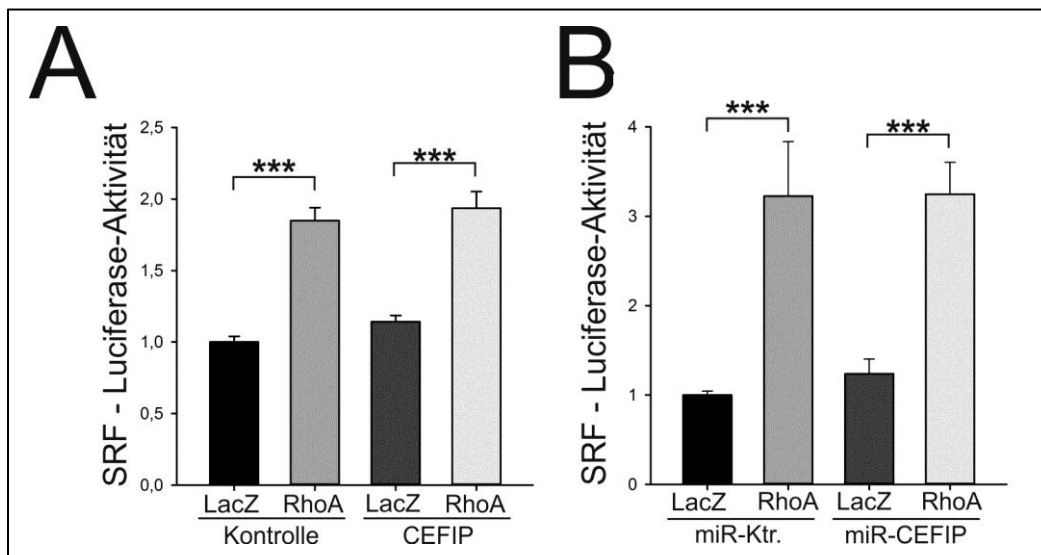
A, Die durch konstitutiv aktives Calcineurin ausgelöste Luciferase-Aktivität wird durch die Überexpression von CEFIP verstärkt ( $9,14 \pm 0,9$ -fach,  $p < 0,001$ ,  $n=14$ ). Diese Induktion wird nicht durch den siRNA-vermittelten „Knockdown“ von FHL2 erhöht. B, Die Induktion der durch Calcineurin ausgelösten Luciferase-Aktivität durch die Abwesenheit von FHL2 kann nicht durch den gleichzeitigen „Knockdown“ von CEFIP abgeschwächt werden ( $\pm$  SEM; Signifikanzniveaus: \*  $\triangleq p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq p < 0,001$ ).

### 3.4.4 CEFIP reguliert nicht den SRF-Signalweg

Ein weiterer im Herzen bekannter hypertrophie-induzierender Signalweg steht unter Kontrolle des multifunktionalen Transkriptionsfaktors SRF (Serum Response Factor). SRF ist Mitglied der MADS-Box-Familie von Transkriptionsfaktoren, welche durch Bindung einer spezifischen Promotorsequenz (CArG Box) die Expression einer Vielzahl von Genen reguliert (Shore & Sharrocks 1995; Miano 2010; Kuwahara & Nakao 2011). Die Expression vieler kardialer Gene wird durch SRF moduliert. Zum Beispiel führt die Überexpression von SRF postnatal zu einer hypertrophen Kardiomyopathie (Zhang, Azhar et al. 2001; Zhang, Chai et al. 2001). Die Aktivierung der SRF-vermittelten Transkription kann über zwei unterschiedliche Mechanismen erfolgen. Der „Ternary-Complex-Factor“- (TCF)- abhängige Signalweg findet über die Ras-Raf-MAPK-Erk-Signalkaskade statt, während in dem TCF-unabhängigen Signalweg die Rho-Familie der GTPasen involviert ist (Johansen & Prywes 1994; Hill, Wynne et al. 1995). RhoA ist eine GTPase, welche durch G-Proteine aktiviert und mit Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts einhergeht. RhoA induziert die Aktin-Polymerisation und führt zur zytoplasmatischen Freisetzung mit nachfolgender nukleären Translokation des MAL (MKL1) Proteins, welches wiederum im Zellkern mit SRF interagiert und Zielgene transkriptionell stimuliert.

Da FHL2 mit SRF direkt interagiert, scheint eine Beteiligung von CEFIP an diesem Signalweg ebenfalls möglich. Neben dem Calcineurin-NFAT Signalweg spielt der RhoA-vermittelte SRF-Signalweg eine wichtige Rolle. Hierzu wurden die Luciferase-Versuche in NRVCs mittels SRF-RE (Serum Response Factor-Response Element) wiederholt. Unter adenoviraler Überexpression von CEFIP und gleichzeitiger Infektion des SRF-RE-Reporters wurde die Luciferase-Aktivität nicht induziert (Abbildung 3-14 A). Auch eine Steigerung der Aktivität mittels zusätzlich hinzugefügtem RhoA führte unter CEFIP-Überexpression nicht zur Veränderung des Signals im Vergleich zur RhoA-induzierten Kontrolle.

Auch die Herunterregulation mittels synthetischer miRNA gegen CEFIP veränderte die SRF-RE-Luciferase-Reporteraktivität nicht (Abbildung 3-14 B). Zusätzlich konnte die Induktion durch ein RhoA-Überexpressionsvirus durch CEFIP-Abwesenheit nicht verstärkt werden.



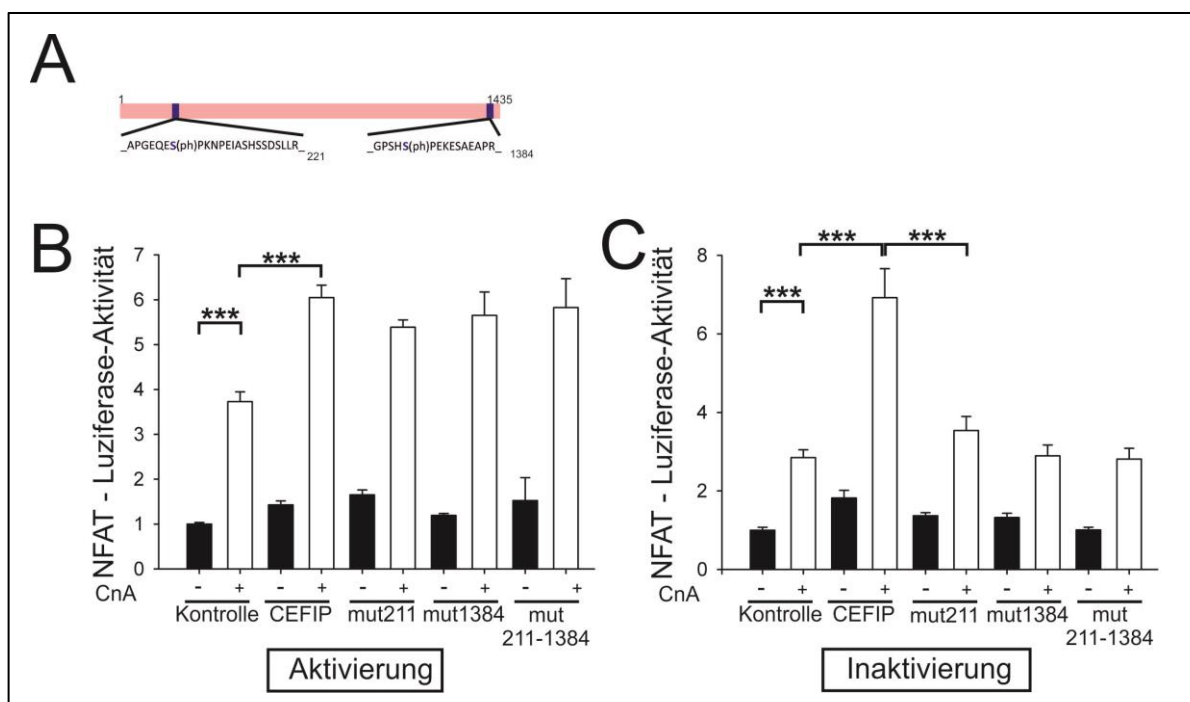
**Abbildung 3–14: Einfluss von CEFIP auf die RhoA vermittelte SRF-Induktion**

A, Für Luciferase-Reporterassays wurden NRVCs mit SRF-RE-Luciferaseviren infiziert und gleichzeitig adenoviral  $\beta$ -Galactosidase oder CEFIP überexprimiert. Überexprimiertes CEFIP führte zu keiner Veränderung in der Luciferase-Aktivität. B, „Knockdown“ von CEFIP via synthetischer miRNA bewirkt ebenfalls keinen Unterschied zur Kontrolle ( $\pm$  SEM; Signifikanzniveaus: \*  $\triangleq$   $p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq$   $p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq$   $p < 0,001$ ).

### 3.4.5 CEFIP besitzt zwei Phosphorylierungsstellen

Für eine weitere Charakterisierung von CEFIP wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Warscheid (Freiburg, FOR1352) nach potentiellen Phosphorylierungsstellen gesucht. Im Rahmen der Phosphoproteom-Studie mit ausdifferenzierten, kontrahierenden C2C12-Myotuben konnten zwei potentielle Phosphorylierungsstellen in CEFIP gefunden werden (Abbildung 3-15 A).

Um der Fragestellung nachzugehen, ob diese potentiellen Phosphorylierungsstellen für die Funktion von CEFIP von Relevanz sind, wurden die entsprechenden Stellen mutiert. Hierzu wurde das entsprechende Serin (S221 und S1384) für die Aktivierung gegen ein Alanin oder zur Inaktivierung gegen ein Glutamin ausgetauscht. Dabei wurden jeweils nur eine Phosphorylierungsstelle oder beide mutiert (211Ala, 211Gln, 1384Ala, 1384Gln, 211-1384Ala, 211-1384Gln). Mit diesen mutierten CEFIP-Konstrukten wurden adenovirale Infektionen von NRVCMs und die entsprechenden Luciferase-Versuche durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Aktivierung der NFAT-Luciferase bei Anwesenheit von konstitutiv aktivem Calcineurin mit überexprimierten, nicht mutiertem CEFIP vergleichbar zu mutiertem CEFIP ist, unabhängig davon ob eine oder beide der vorhergesagten Phosphorylierungsstellen mittels Alaninmutation aktiviert wurden (Abbildung 3-15 B). Im Gegensatz dazu konnte die NFAT-Luciferase-Aktivität durch konstitutiv aktives Calcineurin nicht erhöht werden, wenn eine oder beide Stellen mittels Glutaminmutation inaktiviert wurden. Bei Inaktivierung der Phosphorylierungsstellen zeigte sich derselbe Effekt wie mit Kontrollviren behandelten Zellen (Abbildung 3-15C).



**Abbildung 3–15: Identifizierung möglicher Phosphorylierungsstellen mittels Phosphoproteom-Studie**

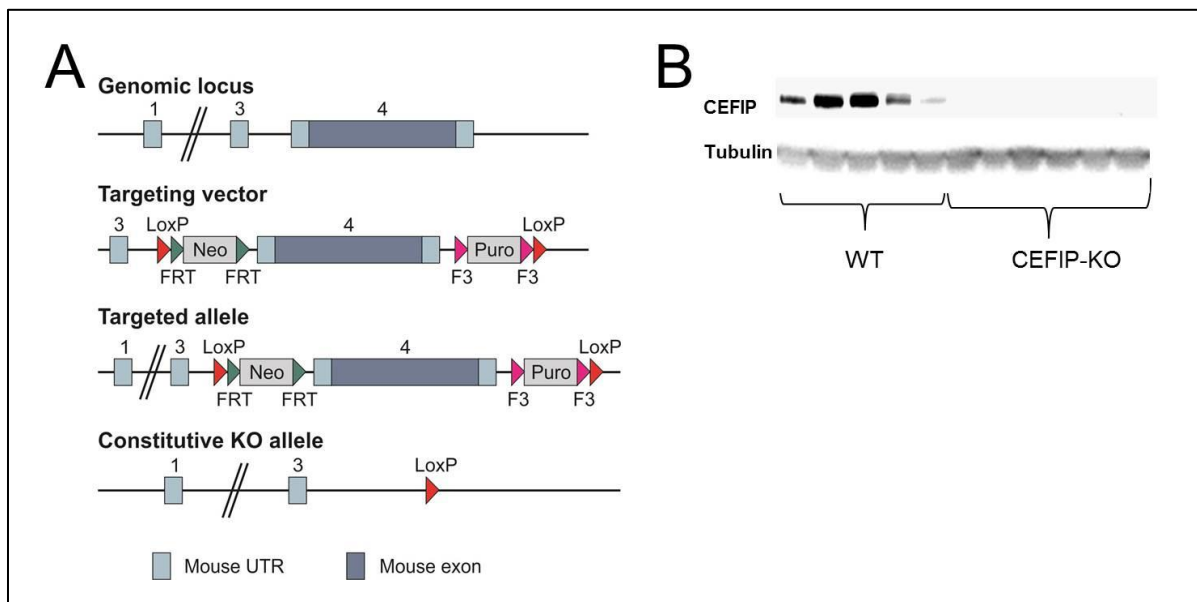
Phosphoproteom-Studie zeigen zwei potentielle Phosphorylierungsstellen in CEFIP. A, Die Aminosäuren an den Positionen 221 und 1384 in CEFIP wurde als potentielle Serin-Phosphorylierungsstellen identifiziert. B-C, Mutation dieser mit Alanin (Aktivierung) oder Glutamin (Inaktivierung) an einer oder beiden Stellen und anschließenden NFAT-Luciferase-Assay zeigen, dass mindestens eine oder beide aktiv sein müssen, um die Luciferase-Aktivität zu steigern ( $\pm$  SEM; Signifikanzniveaus: \*  $\triangleq$   $p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq$   $p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq$   $p < 0,001$ ).

### 3.5 Charakterisierung CEFIP-defizienter Mäuse

CEFIP führt *in vitro* zu einer Steigerung der Hypertrophie via Aktivierung des Calcineurin-Signalweges. Um diese ersten Ergebnisse zu bestätigen und die Rolle von CEFIP im gesamten Organismus zu betrachten, wurde in Zusammenarbeit mit Taconic Artemis ein konstitutives Knockout Mausmodell generiert. Die Klonierungsstrategie wurde auf Basis der NCBI Annotation geplant und das Exon 4, welches den gesamten open reading frame (ORF) enthält, „gefloxed“. Durch den Einbau von sowohl FRT als auch loxP-Schnittstellen, wurde die Möglichkeit einer konstitutiven als auch einer konditionellen CEFIP-Knockout Maus (Abbildung 3-16 A) offen gehalten.

Nach der Injektion in C57BL/6N-Blastozyten, welche anschließend in BALB/c- Mäuse transplantiert wurden, konnten chimäre Tiere erzeugt werden. Durch Verpaarung mit „Cre-deleter“ Mäusen, welche mittels Rekombinasen an den LoxP-Schnittstellen schneiden, wurde das CEFIP-kodierende Exon 4 deletiert und somit Mäuse, welche für CEFIP-Knockout heterozygot sind, produziert. Wurden zwei für CEFIP-heterozygote Mäuse miteinander verpaart, wurden u.a. homozygote CEFIP-Knockout Mäuse geboren, welche überlebens- und fortpflanzungsfähig waren.

Der Erfolg der Generierung der kompletten Deletion von CEFIP *in vivo* wurde mittels Western Blot bestätigt. Hierbei konnte das Protein CEFIP in den Herzproben aus CEFIP-Knockout Mäusen mittels Western Blot nicht mehr nachgewiesen werden (Abbildung 3-16 B).

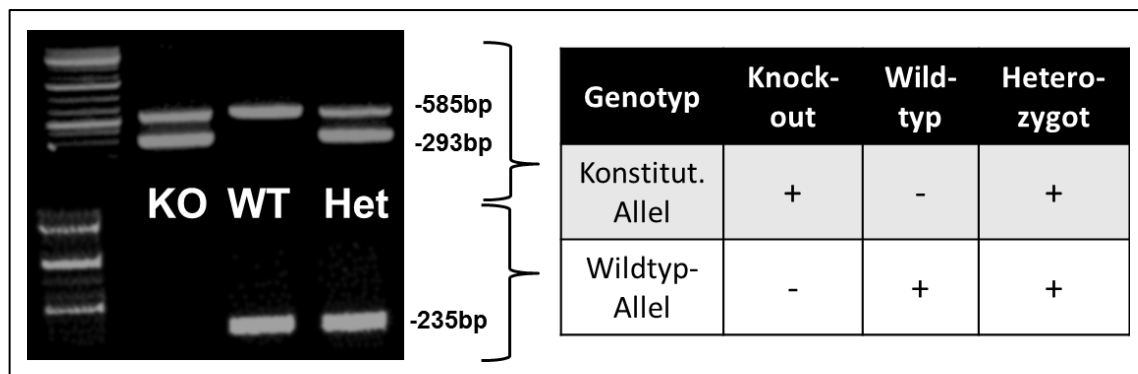


**Abbildung 3–16: Generierung der konstitutiven CEFIP-Knockout Maus**

A, Schematische Darstellung der Generierung des CEFIP-Knockout-Konstruktes und anschließendem Einschleusen in das Zielallel. B, Bestätigung der Deletion von CEFIP durch Western Blot Analyse aus Herzgewebe mittels CEFIP-spezifischen Antikörpers.

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte durch PCR-Analyse, wobei DNA aus der Mausschwanzspitze genutzt wurde. Für ein eindeutiges Ergebnis musste sowohl eine Wildtyp- als auch Knockout-PCR pro Tier durchgeführt werden (Abbildung 3-17) und anschließend durch Gelanalyse ausgewertet werden.

Die Tiere wurden 10 Generationen auf den C57BL/6N Hintergrund zurückgekreuzt, um einen Effekt auf die erhobenen Daten durch einen nicht identischen genetischen Hintergrund prinzipiell auszuschließen.



**Abbildung 3–17: Genotypisierung der CEFIP-Knockout Maus**

Die PCR für das konstitutive Allel zeigt bei mindestens einem CEFIP-defizienten Allel eine Bande bei 293 bp, während in einer zweiten PCR die Bande bei 235 bp für mindestens ein Wildtypallel angezeigt wird. Für die Kontrollbande (585 bp) werden Primer außerhalb der Zielregion verwendet.

### 3.5.1 CEFIP-Knockout Mäuse weisen erhöhte Spiegel bekannter Hypertrophiemarker auf

Da die Auswirkungen der kompletten Deletion von CEFIP nicht vorhergesagt werden konnten, wurden die Tiere nach der Rückkreuzung grundlegend analysiert. Die Tiere zeigten sowohl im Aussehen als auch im Verhalten keinen Unterschied zu gleichaltrigen Wildtyptieren. Daraufhin wurden sie im Alter von 7 Wochen morphometrisch und echokardiographisch untersucht. Hierfür wurden sechs männliche CEFIP-Knockout Mäuse und sieben männliche Wildtypmäuse, welche als Kontrollgruppe dienten, nach durchgeführter Echokardiographie getötet und ihre Körper-, Herz-, LV- und Lungengewichte verglichen (Tabelle 3-2). Zur Normalisierung wurde neben dem Körpergewicht auch die Tibialänge bestimmt, welche nicht durch zum Beispiel Ödeme im Rahmen der Herzinsuffizienz beeinflusst wird.

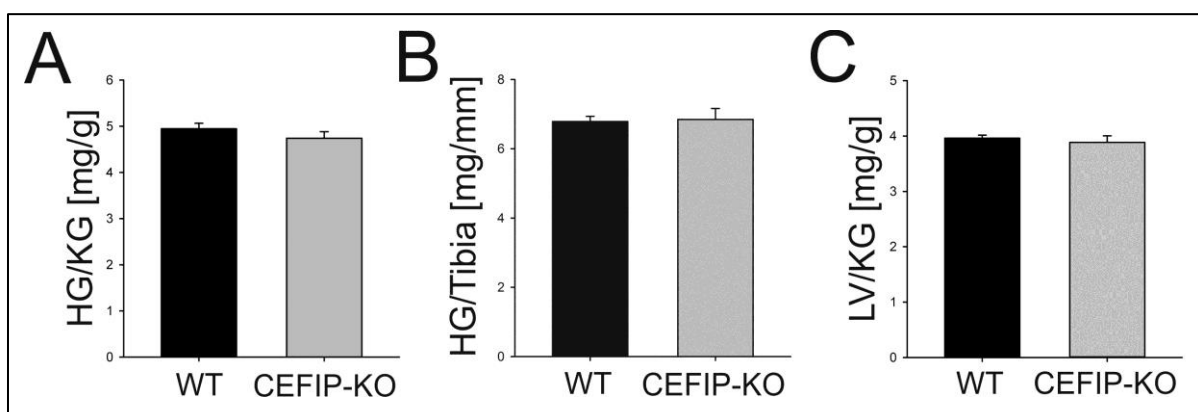
**Tabelle 3–2: Morphometrische Daten von CEFIP-KO im Vergleich zu Wildtypen im Alter von 7 Wochen**

	Alter [d]	KG [g]	HG [mg]	LV [mg]	Tibia-länge [mm]	HG/KG [mg/g]	HG/Tibia-länge [mg/mm]	LV/KG [mg/g]	LV/Tibia-länge [mg/mm]	Lungengewicht [mg]
<b>WT</b>	51,1	21,8	107,7	86,5	15,90	4,9	6,79	3,96	5,45	142,6
N=7	± 2,4	± 0,4	± 2,4	± 2,4	± 0,04	± 0,1	± 0,15	± 0,05	± 0,14	± 4,5
<b>CEFIP-KO</b>	46,7	22,8	108,0	88,3	15,80	4,8	6,8	3,90	5,60	145,4
N=6	± 1,0	± 0,9	± 6,0	± 4,4	± 0,08	± 0,2	± 0,37	± 0,13	± 0,28	± 2,3
<b>Signifikanz-niveau</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Signifikanzniveaus wurden unter Verwendung des t-Test (studentische t-Verteilung) ermittelt (n.s.  $\triangleq$  nicht signifikant, \*  $\triangleq$   $p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq$   $p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq$   $p < 0,001$ ).

Aus diesen Parametern wurde der Quotient aus Herzgewicht zu Körpergewicht (HG/KG), Herzgewicht zu Tibialänge (HG/Tibia) und Gewicht des linken Ventrikels sowohl zum Körpergewicht (LV/KG) als auch zur Tibia (LV/Tibia) gebildet.

Unter Basisbedingungen zeigten die CEFIP-Knockout Tiere morphometrisch keine Unterschiede im Vergleich zu C57BL/6N-Wildtypen. Die Quotienten des Herzgewichtes sowohl zum Körpergewicht (Abbildung 3-18 A) als auch zur Tibialänge (Abbildung 3-18 B) waren nahezu gleich. Auch bei dem Gewicht des linken Ventrikels zum Körpergewicht (Abbildung 3-18 C) unterschieden sich die beiden Gruppen nicht signifikant.

**Abbildung 3–18: Morphometrische Analyse 7 Wochen alter CEFIP-Knockout Mäuse**

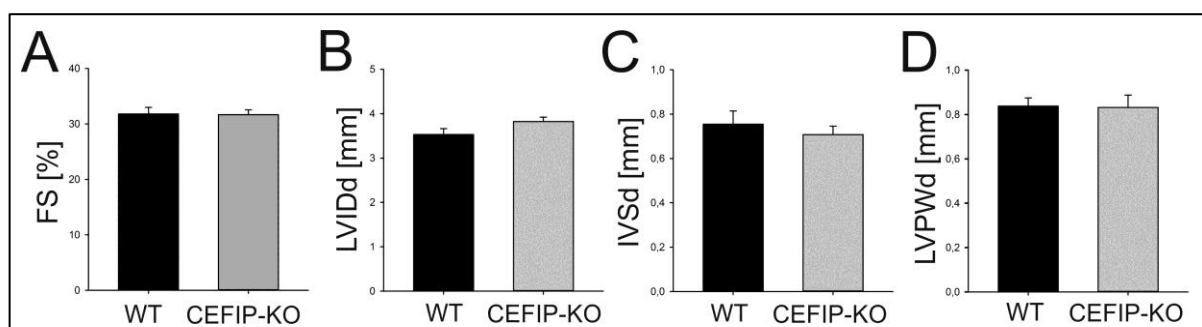
A-C, Sowohl der Quotient aus Herzgewicht und Körpergewicht (A) bzw. Tibia (B) als auch der linke Ventrikel (LV) zum Körpergewicht zeigt keine Differenz zu gleichaltrigen Wildtyp-Geschwistertieren.

Vorab wurden sowohl die CEFIP-Knockout Mäuse als auch die Wildtypen echokardiographisch untersucht. Um die Myokardfunktion zu bewerten, wurden sowohl in der Systole (s) als auch in der Diastole (d) folgende Parameter bestimmt: der linksventrikulärer Diameter (Left Ventricular Internal Diameter, LVID), die Wandstärke des Septums (Interventricular Septum, IVS) und die Stärke der Hinterwand (Left Ventricular Posterior Wall, LVPW) (Tabelle 3-3). Des Weiteren konnte aus den Parametern die Herzfrequenz, die Auswurfraction (Ejection Fraction, EF) und die systolische Verkürzungsfraktion (Fractional Shortening, FS) ermittelt werden (Tabelle 3-3).

**Tabelle 3–3: Echokardiographische Daten von CEFIP-Knockout Mäuse im Vergleich zu Wildtypen im Alter von 7 Wochen**

	Herzfrequenz [bpm]	FS [%]	EF [%]	LVIDd [mm]	LVIDs [mm]	IVSd [mm]	IVSs [mm]	LVPWd [mm]	LVPWs [mm]
<b>WT</b>	450,02	31,80	62,94	3,53	2,48	0,75	1,11	0,84	1,14
N=7	± 14,4	± 1,18	± 2,1	± 0,13	± 0,17	± 0,06	± 0,08	± 0,04	± 0,06
<b>CEFIP-KO</b>	444,57	31,67	66,26	3,82	2,73	0,71	1,11	0,83	1,10
N=6	± 23,7	± 1,01	± 2,8	± 0,12	± 0,11	± 0,04	± 0,07	± 0,07	± 0,07
<b>Signifikanz- niveau</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Die systolische linksventrikuläre Pumpfunktion (FS) war bei beiden Gruppen bei 31 % (WT: 31,8 ± 1,18 %; KO: 31,67 ± 1,01 %; Abbildung 3-19 A). Auch die Parameter LVID, IVS und LVPW waren sowohl in der Diastole (Abbildung 3-19 B-D) als auch in der Systole nicht signifikant unterschiedlich.

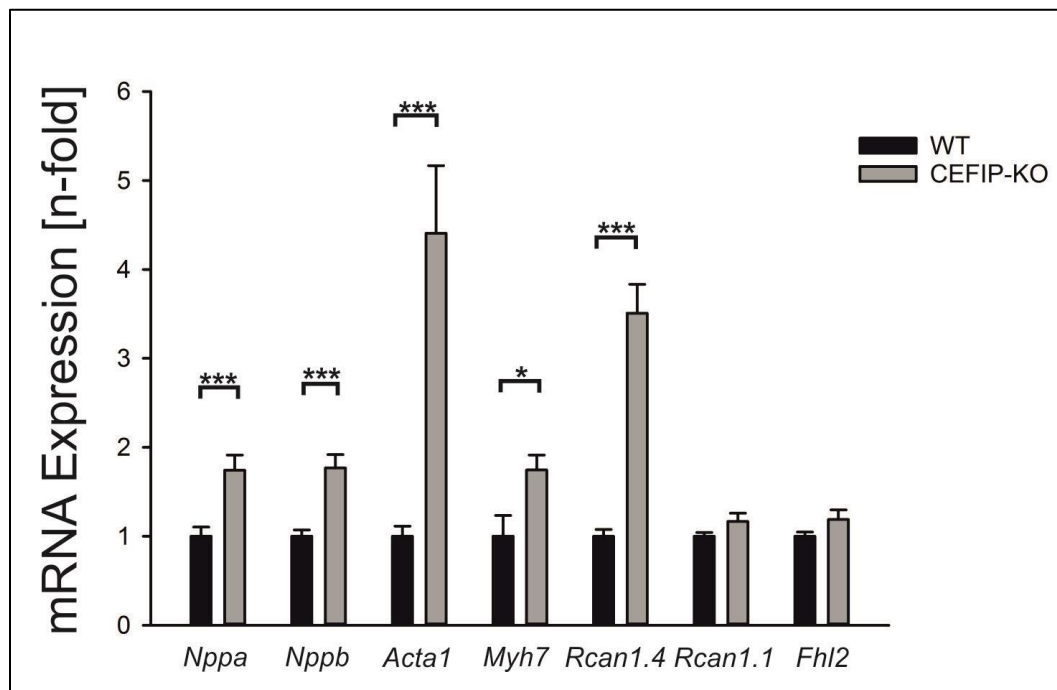


**Abbildung 3–19: Echokardiographische Analyse 7 Wochen alter CEFIP-Knockout Mäuse**

A-D, Die echokardiographisch-ermittelten Parameter FS (A), LVID (B), IVSd (C) und LVPW (D) in der Diastole der CEFIP-KO Mäuse (N=6) zeigen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Kontrolltieren (N=7).

Sowohl die morphometrischen als auch echokardiographischen Daten zeigen, dass die Deletion von CEFIP keine grundlegenden Effekte auf die Entwicklung oder Herzfunktion hat. Um die Basischarakterisierung auch auf molekularer Ebene zu vervollständigen, wurden aus dem gewonnenen Herzen RNA isoliert und mittels quantitativer PCR auf Gene von Interesse ausgewertet.

Da die *in vitro* Versuche einen Hinweis auf FHL2 als Interaktionspartner gegeben haben, wurde dessen Expression ebenfalls kontrolliert. Die *Fhl2*-mRNA-Spiegel sind in CEFIP-Knockout Mäusen nicht anders als in Wildtypieren (Abbildung 3-20). Interessanterweise zeigte die Untersuchung der typischen hypertrophen Marker wie ANF (Atrial Natriuretic Factor, Transkript *Nppa*), BNP (Brain Natriuretic Peptide, Transkript *Nppb*),  $\beta$ -Myosin Heavy Chain (*Myh7*) und Skelettmuskel-Alpha-Aktin (*Acta1*) einen signifikanten Anstieg. Auch der Calcineurin-abhängige Marker *Rcan1.4* war signifikant erhöht, während sich *Rcan1.1* im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe nicht unterschied (Abbildung 3-20).



**Abbildung 3–20: Quantitative Untersuchung des hypertrophen Genprogramms in 7 Wochen alten CEFIP-Knockout Mäusen**

In CEFIP-defizienten Tieren das hypertrophe Genprogramm aktiviert. Während die *Fhl2*-Expression in CEFIP-defizienten Mäusen (N=6) nicht signifikant hochreguliert ist, zeigen unter Basisbedingungen die hypertrophen Genmarker eine signifikante Induktion auf mRNA-Ebene im Vergleich zu Wildtypmäusen (N=7) ( $\pm$  SEM; Signifikanzniveaus: \*  $\triangleq$   $p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq$   $p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq$   $p < 0,001$ ).



### 3.5.2 Auch einjährige CEFIP-defiziente Tiere zeigen keinen kardialen Phänotyp

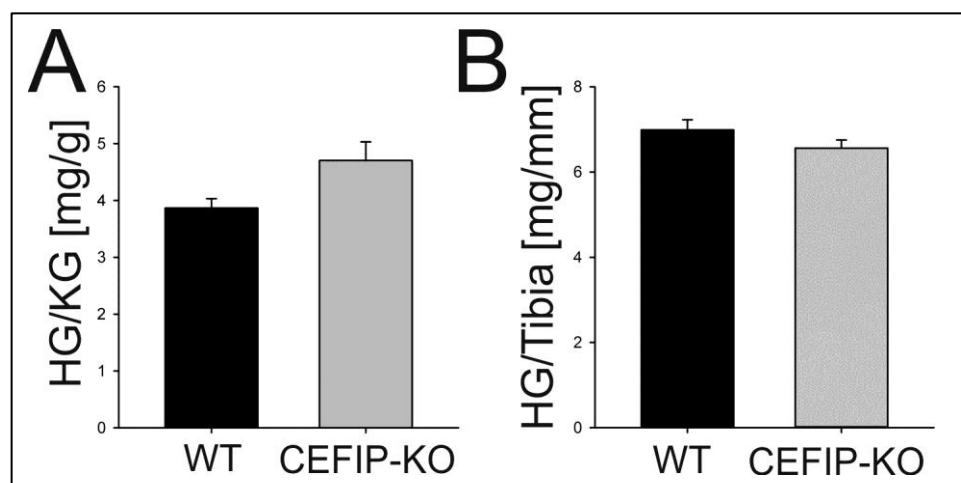
Um nur langsame Veränderungen, Erkrankungen oder späte Effekte am Herzen durch die Deletion von CEFIP auszuschließen, wurden ebenfalls 1,5 Jahre alte Mäuse analog zur 7-Wochen Basischarakterisierung untersucht.

Es wurden die morphometrischen Daten von sechs männlichen CEFIP-Knockout Mäusen und fünf gleichaltrigen, männlichen Wildtypgeschwistertieren dokumentiert. Hier zeigten sich wie auch schon bei den Jüngeren keine signifikanten Unterschiede bezüglich einer kardialen Hypertrophie (Tabelle 3-4).

**Tabelle 3–4: Morphometrische Daten von CEFIP-Knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtypen im Alter von 1,5 Jahren**

	Alter [d]	KG [g]	HG [mg]	Tibiallänge [mm]	HG/KG [mg/g]	HG/Tibiallänge [mg/mm]	Lungengewicht [mg]
<b>WT</b>	501,2	33,7	129,7	18,60	3,87	6,99	199,52
N=5	± 5,4	± 1,5	± 4,3	± 0,10	± 0,17	± 0,24	± 14,53
<b>CEFIP-KO</b>	477,5	26,5	121,6	18,50	4,70	6,56	179,18
N=6	± 11,1	± 1,9	± 3,9	± 0,11	± 0,33	± 0,2	± 7,91
<b>Signifikanzniveau</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Die Quotienten des Herzgewichtes sowohl zum Körpergewicht (Abbildung 3-21 A) als auch zur Tibiallänge (Abbildung 3-21 B) waren nahezu gleich.



**Abbildung 3–21: Morphometrische Analyse 1,5 Jahre alter CEFIP-Knockout Mäuse**

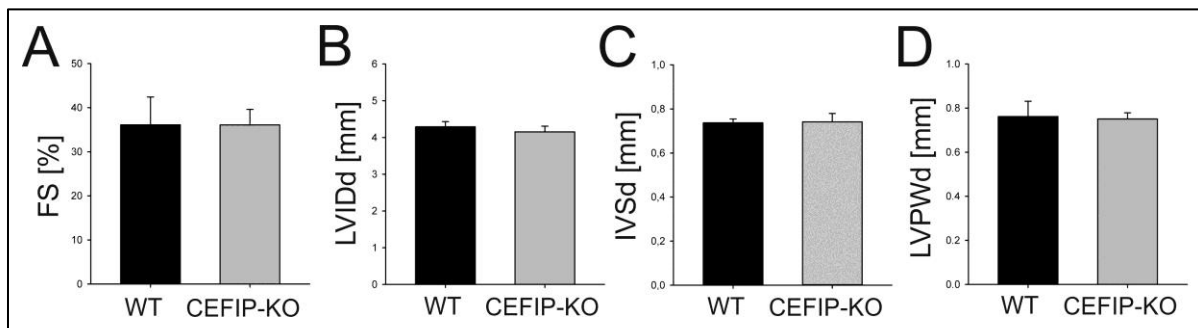
Die morphometrischen Daten zeigen keinen Unterschied im Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht (A) oder Tibiallänge (B) zwischen CEFIP-Knockout Mäusen und Wildtypmäusen.

Sowohl die CEFIP-Knockout Mäuse als auch die Wildtypmäuse wurden mit 1,5 Jahren mittels Echokardiographie untersucht und die Parameter LVID, IVS und LVPW in der Diastole und Systole, aber auch die Herzfrequenz, EF und FS analysiert.

**Tabelle 3–5: Echokardiographische Daten von CEFIP-Knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtypen im Alter von 1,5 Jahren**

	Herzfrequenz [bpm]	FS [%]	EF [%]	LVIDd [mm]	LVIDs [mm]	IVSd [mm]	IVSs [mm]	LVPWd [mm]	LVPWs [mm]
<b>WT</b> N=5	543,4 ± 40,8	36,10 ± 6,32	69,00 ± 8,74	4,29 ± 0,14	2,77 ± 0,36	0,74 ± 0,02	1,34 ± 0,11	0,76 ± 0,07	1,25 ± 0,15
<b>CEFIP-KO</b> N=6	481,17 ± 29,5	36,08 ± 3,52	70,92 ± 3,99	4,15 ± 0,16	2,69 ± 0,23	0,74 ± 0,04	1,34 ± 0,07	0,75 ± 0,03	1,20 ± 0,08
<b>Signifikanz- niveau</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

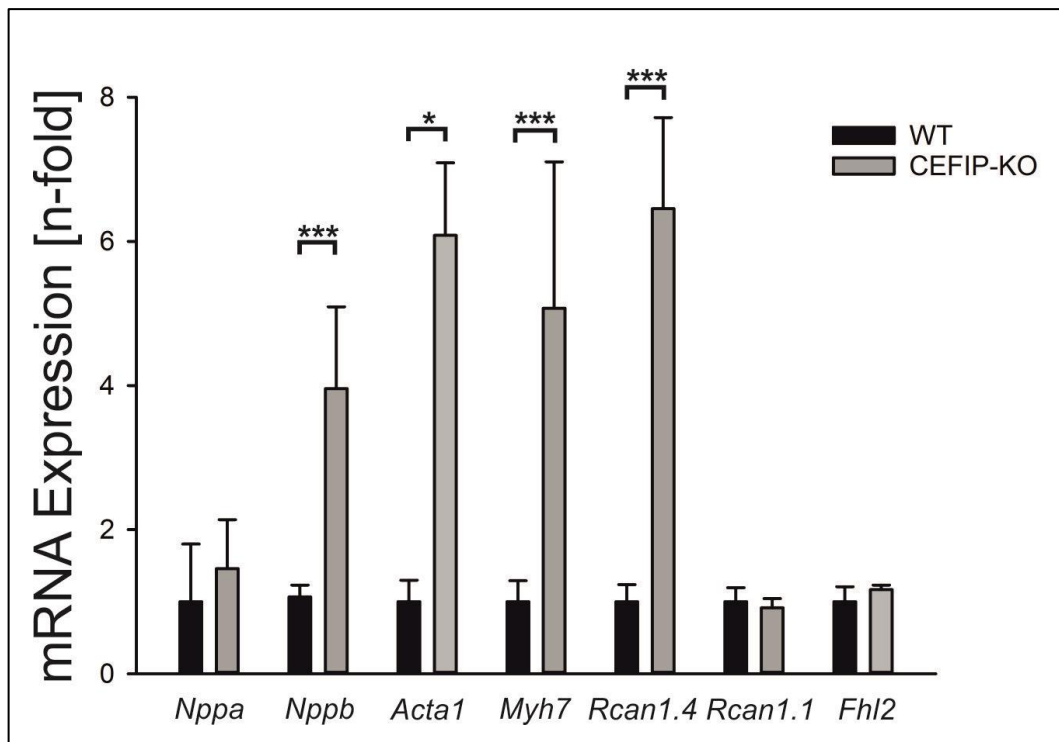
Die systolische linksventrikuläre Pumpfunktion (FS) war bei beiden Gruppen bei circa 36 % (Abbildung 3-22 A). Auch die Parameter LVID, IVS und LVPW waren sowohl in der Diastole (Abbildung 3-22 B-D) als auch in der Systole nicht signifikant unterschiedlich.



**Abbildung 3–22: Echokardiographische Analyse 1,5 Jahre alter CEFIP-Knockout Mäuse**

A-D, CEFIP-defiziente (N=6) Tiere zeigen auch im Alter keine Veränderungen in den kardialen Parametern im Vergleich zu Wildtypmäusen (N=5).

Auch hier wurden die Herzen molekularbiologisch untersucht. Die *Fhl2*-Expression zeigt auf mRNA-Ebene in den CEFIP-Knockout Mäusen im Vergleich zu C57BL/6N Wildtypmäusen keinen signifikanten Unterschied, während die hypertrophen Marker *Nppb*, *Acta1* und *Myh7* signifikant hochreguliert waren (Abbildung 3-23). Auch der für den Calcineurin-NFAT Signalweg bekannte Marker *Rcan1.4* war in den CEFIP-Knockout Mäusen wieder stark aktiviert.



**Abbildung 3–23: Quantitative Untersuchung des hypertrophen Genprogramms 1,5 Jahre alter CEFIP-Knockout Mäuse**

Auf mRNA-Ebene verändern sich die *Fhl2*-Spiegel in CEFIP-Knockout Mäusen nicht mit dem Alter, während in CEFIP-defizienten Tieren die fetalen Hypertrophiemarker weiterhin im Verhältnis zu Wildtypmäusen stark aktiviert sind ( $\pm$  SEM; Signifikanzniveaus: \*  $\triangleq$   $p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq$   $p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq$   $p < 0,001$ ).

### 3.6 Einfluss verschiedener Hypertrophie-Stimuli auf CEFIP-defiziente Tiere

Die Abwesenheit von CEFIP zeigt *in vitro* eine Reduktion der Hypertrophie und eine Hemmung des Calcineurin-NFAT Signalweges. Dies wurde zuvor ebenfalls bei FHL2 festgestellt. FHL2-Knockout Mäuse sind ebenfalls lebensfähig und fertil und zeigen unter Basisbedingungen keine Auffälligkeiten. Versuche mit unterschiedlichen Hypertrophie-Stimuli wurden durchgeführt, um zu zeigen ob FHL2-Knockout Tiere einen Nachteil zu Wildtyp Mäusen besitzen. Die Erhöhung der Nachlast durch eine Konstriktion der Aorta transversa (TAC) führte bei FHL2-Knockout Tieren zu keinem Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe, während osmotische Minipumpen mit Isoproterenol zu einer starken Vergrößerung des Herzens und einer Steigerung der hypertrophen Faktoren führte. Da CEFIP ein Interaktionspartner von FHL2 ist, wurden diese Versuche ebenfalls bei den CEFIP-Knockout Tieren durchgeführt.

### 3.6.1 CEFIP-Knockout Mäuse entwickeln unter Konstriktion der Aorta transversa eine kardiale Dysfunktion

Durch transthorakale Konstriktion der Aorta transversa (TAC) wird die Nachlast erhöht und innerhalb von 14 Tagen sowohl eine kardiale Hypertrophie als auch Herzinsuffizienz induziert. Hierfür wurde an männlichen CEFIP-Knockout Mäusen (N=9) und männlichen C57BL/6N Mäusen (N=8) diese Konstriktion durchgeführt (TAC-Gruppe). Bei den Kontrollgruppen, welche ebenfalls aus männlichen CEFIP-KO (N=8) und männlichen C57BL/6N Mäusen (N=7) bestanden, wurden bis auf die Konstriktion der Aorta alle nötigen Operationsschritte ebenfalls ausgeführt (Scheinoperation/SHAM-Gruppe).

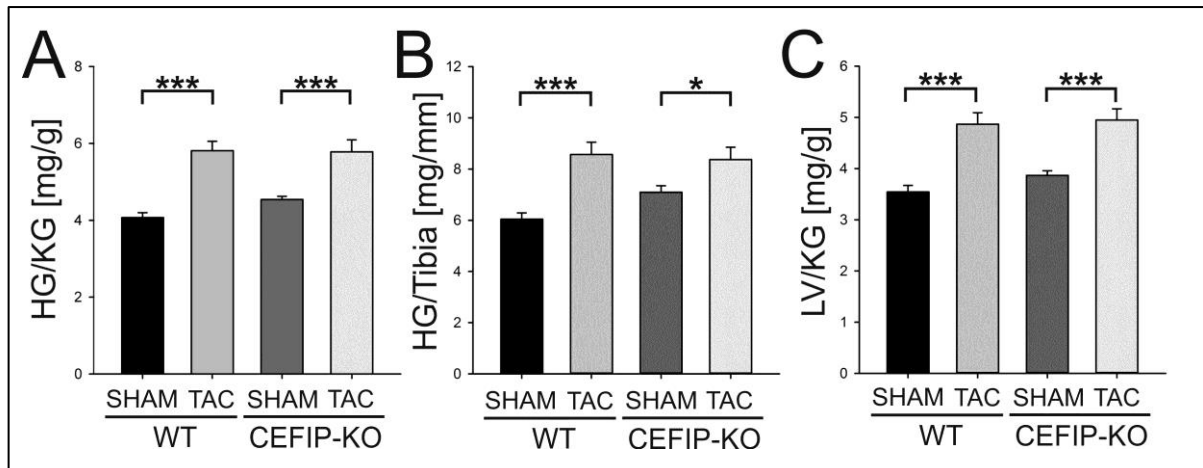
Nach einer 14-tägigen Konstriktion der Aorta wurden die Tiere echokardiographisch untersucht und ebenfalls die morphometrischen Parameter bestimmt (Tabelle 3-6).

**Tabelle 3–6: Morphometrische Daten von CEFIP-Knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtypen unter transversaler Aortenkonstriktion**

	Alter [d]	KG [g]	HG [mg]	LV [mg]	Tibia- länge [mm]	HG/KG [mg/g]	HG/Tibia- länge [mg/mm]	LV/KG [mg/g]	LV/Tibia- länge [mg/mm]	Lungen- gewicht [mg]
<b>WT SHAM</b> N=8	83,1 ± 1,6	24,5 ± 0,8	99,8 ± 4,2	86,6 ± 3,2	16,50 ± 0,08	4,07 ± 0,13	6,05 ± 0,24	3,54 ± 0,13	5,25 ± 0,18	134,3 ± 4,7
<b>WT TAC</b> N=7	84,7 ± 1,9	24,6 ± 1,1	143 ± 8,9	119,8 ± 8,3	16,70 ± 0,16	5,81 ± 0,25	8,57 ± 0,49	4,87 ± 0,23	7,18 ± 0,46	166,7 ± 23,1
<b>CEFIP-KO SHAM</b> N=8	86,6 ± 3,9	26,6 ± 0,9	120,6 ± 4,7	102,6 ± 3,8	16,90 ± 0,17	4,54 ± 0,09	7,10 ± 0,25	3,87 ± 0,09	6,04 ± 0,19	136,3 ± 4,9
<b>CEFIP-KO TAC</b> N=9	83,5 ± 1,9	24,1 ± 0,6	139,1 ± 8,1	118,9 ± 5,9	16,60 ± 0,13	5,78 ± 0,31	8,37 ± 0,48	4,95 ± 0,22	7,16 ± 0,35	160,2 ± 13,2
<b>Signifikanz- niveau</b>	n.s.	n.s.	a*** c*	a*** b* c*	n.s.	a*** b***	a*** b*	a*** b***	a*** b*	n.s.

Signifikanzniveaus wurden durch Two-Way ANOVA-Test gefolgt vom Student-Newman-Keul Post-hoc-Test ermittelt. n.s.  $\triangleq$  nicht signifikant, \*  $\triangleq$   $p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq$   $p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq$   $p < 0,001$ . Vergleich für: a  $\triangleq$  TAC vs. SHAM innerhalb der WT-Gruppe, b  $\triangleq$  TAC vs. SHAM innerhalb der CEFIP-KO-Gruppe, c  $\triangleq$  CEFIP-KO vs. WT innerhalb der SHAM-Gruppe, d  $\triangleq$  CEFIP-KO vs. WT innerhalb der TAC-Gruppe.

Der Quotient aus Herzgewicht zu Körpergewicht war bei den TAC-operierten Wildtypmäusen um das 1,4-fache erhöht. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei den CEFIP-Knockout Mäusen, jedoch war zwischen den TAC-operierten CEFIP-Knockout Mäusen und den Kontrolltieren kein Unterschied messbar (Abbildung 3-24 A). In beiden Gruppen wurde durch die TAC-Operation eine gleich schwere Hypertrophie ausgelöst. Dies bestätigen auch die Quotienten aus Herzgewicht zu Tibialänge (Abbildung 3-24 B) und linker Ventrikel zu Körpergewicht (Abbildung 3-24 C).



**Abbildung 3–24: Morphometrische Analyse von CEFIP-Knockout Mäusen nach transversalen Aortenkonstriktion**

Nach transversaler Aortenkonstriktion zeigen CEFIP-Knockout Mäuse die gleichen morphometrischen Veränderungen wie Wildtypmäuse. CEFIP-defiziente Mäuse (N=8-9) nach 14-tägiger Konstriktion zeigen hinsichtlich des Quotienten von Herzgewicht zu Körpergewicht (A) bzw. zu Tibia (B), und dem Quotienten des linken Ventrikels zum Körpergewicht (C) keinen Unterschied zu gleich behandelten Wildtypmäusen ( $\pm$  SEM; Signifikanzniveaus: \*  $\triangleq$   $p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq$   $p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq$   $p < 0,001$ ).

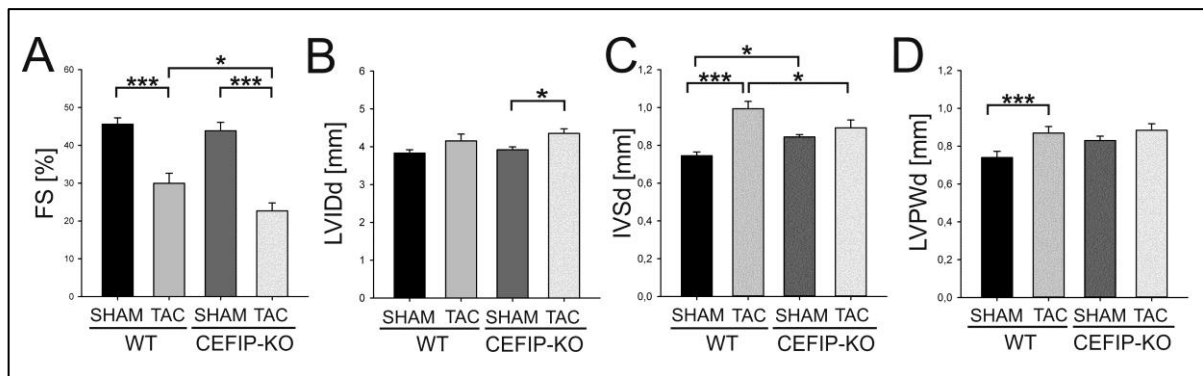
Die TAC- oder schein-operierten Tiere wurden 14 Tage nach der OP echokardiographisch untersucht und Parameter LVID, IVS und LVPW in der Diastole und Systole, sowie die Herzfrequenz, EF und FS analysiert (Tabelle 3-7). Hierdurch konnte nicht-invasiv der Erfolg der Operation hinsichtlich der Hypertrophie bestätigt werden.

**Tabelle 3–7: Echokardiographische Daten von CEFIP-Knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtypen unter transversaler Aortenkonstriktion**

	Herzfrequenz [bpm]	FS [%]	EF [%]	LVIDd [mm]	LVIDs [mm]	IVSd [mm]	IVSs [mm]	LVPWd [mm]	LVPWs [mm]
<b>WT SHAM</b> N=8	572,42 ± 22,9	45,58 ± 1,67	82,29 ± 1,53	3,83 ± 0,09	2,09 ± 0,09	0,75 ± 0,02	1,51 ± 0,06	0,74 ± 0,03	1,36 ± 0,07
<b>WT TAC</b> N=7	574,10 ± 35,5	29,95 ± 2,7	58,10 ± 6,44	4,16 ± 0,18	3,17 ± 0,27	0,99 ± 0,04	1,55 ± 0,05	0,87 ± 0,03	1,28 ± 0,07
<b>CEFIP-KO SHAM</b> N=8	565,29 ± 19,3	43,83 ± 2,24	80,21 ± 2,36	3,92 ± 0,08	2,22 ± 0,13	0,85 ± 0,01	1,55 ± 0,04	0,83 ± 0,02	1,49 ± 0,06
<b>CEFIP-KO TAC</b> N=9	544,59 ± 16,6	22,67 ± 2,08	51,04 ± 3,67	4,35 ± 0,12	3,39 ± 0,17	0,89 ± 0,04	1,34 ± 0,03	0,88 ± 0,03	1,19 ± 0,04
<b>Signifikanz- niveau</b>	n.s.	a*** b*** d*	a*** b***	b*	a*** b***	a*** c* d*	b** d**	a**	b***

Signifikanzniveaus wurden durch Two-Way ANOVA-Test gefolgt vom Student-Newman-Keul Post-hoc-Test ermittelt. n.s.  $\triangleq$  nicht signifikant, \*  $\triangleq$   $p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq$   $p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq$   $p < 0,001$ . Vergleich für: a  $\triangleq$  TAC vs. SHAM innerhalb der WT-Gruppe, b  $\triangleq$  TAC vs. SHAM innerhalb der CEFIP-KO-Gruppe, c  $\triangleq$  CEFIP-KO vs. WT innerhalb der SHAM-Gruppe, d  $\triangleq$  CEFIP-KO vs. WT innerhalb der TAC-Gruppe.

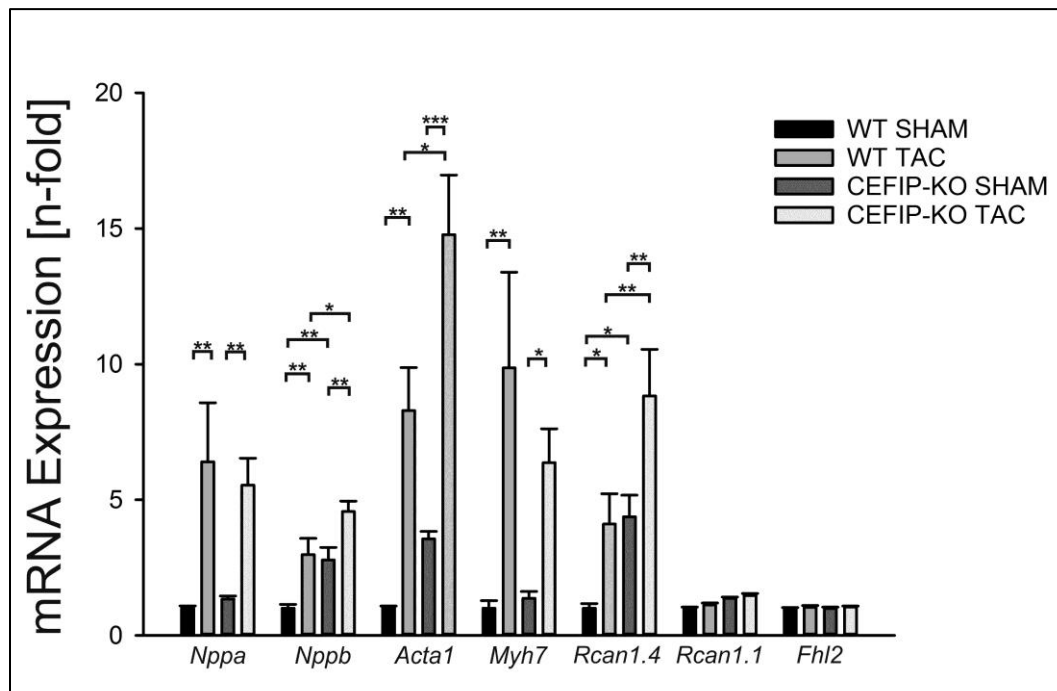
Das Fractional Shortening war in den TAC-Wildtypmäusen im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren signifikant reduziert. Dieser Effekt war auch bei den CEFIP-Knockout Mäusen zu beobachten, wobei innerhalb der TAC-operierten Mäuse die CEFIP-KO ein signifikant schlechteres FS zeigten (Abbildung 3-25 A). Der LVID war in der Diastole nur innerhalb der CEFIP-Knockout Gruppe signifikant erhöht (Abbildung 3-25 B). Bei den gemessenen Parametern IVSd und LVPWd konnte nur in der Wildtypgruppe ein signifikanter Unterschied nach TAC berechnet werden (Abbildung 3-25 C-D). Die Wandstärke des Septums (IVSd) ist bei den CEFIP-KO SHAM bereits signifikant verstärkt und wird durch TAC nicht weiter gesteigert. Die Wildtypgruppe entwickelte nach TAC eine relevante Hypertrophie der Ventrikelwände, während sich bei den CEFIP-Knockout Tieren die Wandstärken durch TAC nicht weiter verdickten. Dieser Effekt ist auch auf die im Vergleich zu Wildtypmäusen bereits leichte Zunahme der Wanddicken zurückzuführen. Bei den CEFIP-Knockout Mäusen verschlechterte sich das FS durch die TAC erheblich und es kam es zu einer linksventrikulären Dilatation.



**Abbildung 3–25: Echokardiographische Analyse von CEFIP-Knockout Mäusen nach transversaler Aortenkonstriktion**

Die echokardiographische Analyse der CEFIP-Knockout Mäuse erfolgt 14 Tage nach TAC-SHAM-Operation im M-Mode in der longitudinalen Achse. Sowohl CEFIP-Knockout als auch die Kontrolltiere zeigen eine Reduktion im Fractional Shortening (A), wobei diese bei den CEFIP-Knockout Mäusen stärker ausfällt. Der linksventrikuläre Durchmesser ist in den CEFIP-Knockout durch die TAC signifikant vergrößert (B), während die Wandstärken bei den Wildtypen aufgrund der TAC zunehmen (C-D) ( $\pm$  SEM; Signifikanzniveaus: \*  $\triangleq$   $p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq$   $p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq$   $p < 0,001$ ).

Die Auswirkungen der TAC-Operation sind auch auf molekularer Ebene erkennbar. Die Expression vieler bekannter hypertrophen Genmarker wurde signifikant erhöht. In der Wildtypgruppe ist *Nppa* 6,4-fach hochreguliert (*Nppa*:  $6,4 \pm 1,2$ -fach; *Nppb*:  $3,0 \pm 0,45$ -fach; *Rcan1.4*:  $4,1 \pm 1,3$ -fach; *Acta1*:  $8,3 \pm 1,7$ -fach; *Myh7*:  $9,9 \pm 1,8$ -fach; Abbildung 3-26). Die CEFIP-Knockout Mäuse zeigten bereits in der Basischarakterisierung aktivierte hypertrophe Marker. Durch transversale Aortenkonstriktion konnten diese noch weiter induziert werden (*Nppa*:  $5,5 \pm 1,0$ -fach; *Nppb*:  $4,6 \pm 0,4$ -fach; *Rcan1.4*:  $8,8 \pm 1,1$ -fach; *Acta1*:  $14,8 \pm 1,4$ -fach; *Myh7*:  $6,4 \pm 1,6$ -fach (Normalisiert auf WT Sham). In der TAC-Gruppe sind die Marker *Nppb*, *Rcan1.4* und *Acta1* bei den CEFIP-Knockout Mäusen im Verhältnis zu den Wildtypen signifikant erhöht. *Fhl2* hingegen ist weiterhin in keinem der Modelle reguliert (Abbildung 3-26).



**Abbildung 3–26: Quantitative Untersuchung des hypertrophen Genprogramms von CEFIP-Knockout Mäusen nach transversaler Aortenkonstriktion**

Transversale Aortenkonstriktion führt bei CEFIP-Knockout Mäusen zur Steigerung der bereits aktivierten Hypertrophiemarker. Die Expression von *Fhl2* auf mRNA-Ebene ist nicht durch TAC oder CEFIP reguliert. Das hypertrophe Genprogramm ist bei beiden Genotypen durch die TAC signifikant erhöht. Die Abwesenheit von CEFIP führt zu einer stärkeren Heraufregulation im Vergleich zu den Kontrolltieren mit und ohne TAC ( $\pm$  SEM; Signifikanzniveaus: \*  $\triangleq$   $p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq$   $p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq$   $p < 0,001$ ).

### 3.6.2 Stimulation mit Isoproterenol führt bei CEFIP-Knockout Mäusen zur Vergrößerung des Herzens

Bei der Hypertrophieinduktion via  $\beta$ -Sympathomimetika Isoproterenol werden im Vergleich zur Aortenkonstriktion weniger Signalwege gleichzeitig stimuliert. Über  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren wird die Protein Kinase A (PKA) aktiviert, welche über  $Ca^{2+}$ -Freisetzung zur Aktivierung des Calcineurin-NFAT Signalweges und über Raf1 auch zur Aktivierung des MAP/ERK-1/2-Signalweg führt.

Hierfür wurden jeweils sieben männlichen CEFIP-Knockout Mäusen oder C57BL/6N Mäusen osmotische Minipumpen der Firma Alzet eingesetzt. Die Pumpen wurden entsprechend des Körpergewichtes mit Isoproterenol gefüllt, während die Kontrolltiere nur Pumpen mit physiologischer Kochsalzlösung bekamen. 14 Tage nach Implantation der Pumpen subkutan auf dem Rücken der Tiere wurden die Tiere echokardiographisch untersucht und ihre morphometrischen Parameter bestimmt (Tabelle 3-8).

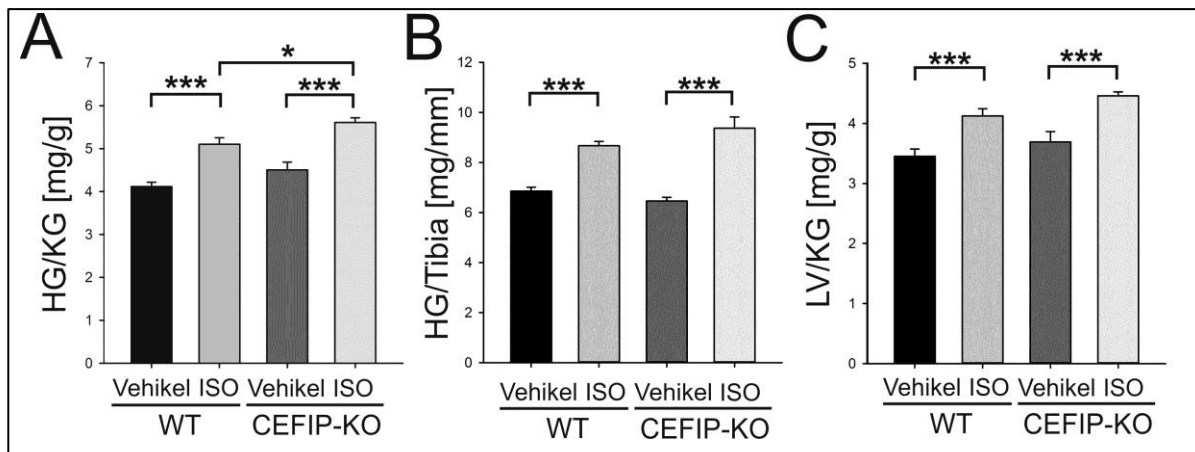


**Tabelle 3–8: Morphometrische Daten von CEFIP-Knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen nach 14-tägiger Isoproterenol-Stimulation**

	Alter [d]	KG [g]	HG [mg]	LV [mg]	Tibia- länge [mm]	HG/KG [mg/g]	HG/Tibia- länge [mg/mm]	LV/KG [mg/g]	LV/Tibia- länge [mg/mm]	Lungen- gewicht [mg]
<b>WT Vehikel N=7</b>	82,6 ± 3,6	27,9 ± 0,9	114,8 ± 3,0	98,1 ± 2,9	16,70 ± 0,10	4,21 ± 0,10	6,86 ± 0,15	3,45 ± 0,12	5,84 ± 0,16	152,1 ± 6,7
<b>WT ISO N=7</b>	83,9 ± 3,3	28,2 ± 1,1	143,4 ± 3,7	119,5 ± 3,4	16,50 ± 0,13	5,10 ± 0,15	8,67 ± 0,17	4,13 ± 0,12	7,19 ± 0,19	161,9 ± 10,4
<b>CEFIP-KO Vehikel N=7</b>	79,4 ± 2,9	23,7 ± 0,6	108,3 ± 3,6	89,2 ± 4,8	16,30 ± 0,11	4,58 ± 0,18	6,64 ± 0,22	3,69 ± 0,17	5,44 ± 0,29	133,4 ± 2,8
<b>CEFIP-KO ISO N=7</b>	80,6 ± 3,3	26,8 ± 0,6	150,2 ± 4,7	118,4 ± 2,9	16,10 ± 0,44	5,61 ± 0,11	9,37 ± 0,45	4,46 ± 0,07	7,15 ± 0,13	155,0 ± 8,5
<b>Signifikanz- niveau</b>	n.s.	b*** c***	a*** b***	a*** b***	n.s.	a*** b*** d*	a*** b***	a*** b***	a*** b***	n.s.

Signifikanzniveaus wurden durch Two-Way ANOVA-Test gefolgt vom Student-Newman-Keul Post-hoc-Test ermittelt. n.s.  $\triangleq$  nicht signifikant, \*  $\triangleq$   $p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq$   $p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq$   $p < 0,001$ . Vergleich für: a  $\triangleq$  ISO vs. Vehikel innerhalb der WT-Gruppe, b  $\triangleq$  ISO vs. Vehikel innerhalb der CEFIP-KO-Gruppe, c  $\triangleq$  CEFIP-KO vs. WT innerhalb der Vehikel-Gruppe, d  $\triangleq$  CEFIP-KO vs. WT innerhalb der ISO-Gruppe.

Der Erfolg der induzierten Hypertrophie mittels chronischer Isoproterenolstimulation konnte anhand des Quotienten aus Herzgewicht zu Körpergewicht sowohl bei den Wildtyptieren als auch bei den CEFIP-defizienten Mäusen bestätigt werden (Abbildung 3-27 A). Hierbei zeigte sich, dass das Verhältnis innerhalb der Isoproterenol-Gruppe bei den CEFIP-Knockout Mäusen größer ist als bei den Kontrolltieren. Diese Tendenz zeigte sich ebenfalls bei den Quotienten aus dem Herzgewicht zur Tibiallänge und LV zu Körpergewicht (Abbildung 3-27 B-C).



**Abbildung 3–27: Morphometrische Analyse von CEFIP-Knockout Mäusen nach chronischer Isoproterenolstimulation**

A, Die Infusion von Isoproterenol über 14 Tage konnte bei beiden Genotypen die HG/KG-Ratio signifikant erhöhen, welche bei den CEFIP-Knockout Tieren mit Isoproterenolgabe im Vergleich zu den Wildtypen stärker ausfällt. B-C, Der Quotient aus Herzgewicht zur Tibialänge bzw. Gewicht des linken Ventrikels zum Körpergewicht zeigt in beiden Genotypen die durch Isoproterenol verursachte Hypertrophie ohne einen signifikanten Unterschied ( $\pm$  SEM; Signifikanzniveaus: \*  $\triangleq$   $p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq$   $p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq$   $p < 0,001$ ).

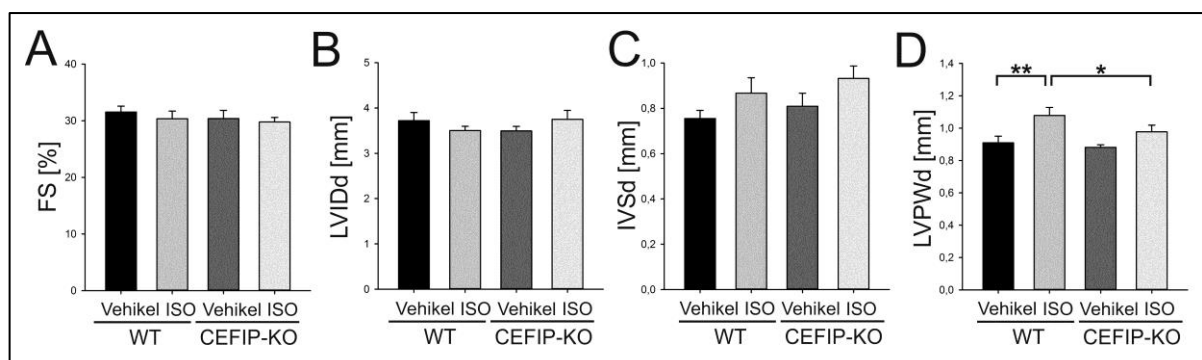
14 Tage nach Implantation der osmotischen Pumpen und damit chronischer Stimulation mit Isoproterenol wurden die Tiere echokardiographisch untersucht und ihre Herzparameter LVID, IVS und LVPW in der Diastole und Systole, sowie die Herzfrequenz, EF und FS analysiert (Tabelle 3-9).

**Tabelle 3–9: Echokardiographische Daten von CEFIP-Knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäuse nach 14-tägiger Isoproterenol-Stimulation**

	Herzfrequenz [bpm]	FS [%]	EF [%]	LVIDd [mm]	LVIDs [mm]	IVSd [mm]	IVSs [mm]	LVPWd [mm]	LVPWs [mm]
<b>WT Vehikel N=7</b>	522,10 $\pm$ 13,7	31,54 $\pm$ 0,9	61,52 $\pm$ 1,44	3,72 $\pm$ 0,16	2,70 $\pm$ 0,18	0,76 $\pm$ 0,04	1,17 $\pm$ 0,04	0,91 $\pm$ 0,05	1,23 $\pm$ 0,06
<b>WT ISO N=7</b>	561,54 $\pm$ 21,3	30,37 $\pm$ 1,17	61,08 $\pm$ 2,48	3,51 $\pm$ 0,08	2,38 $\pm$ 0,10	0,87 $\pm$ 0,07	1,3 $\pm$ 0,06	1,08 $\pm$ 0,04	1,56 $\pm$ 0,06
<b>CEFIP-KO Vehikel N=7</b>	433,01 $\pm$ 45,2	30,39 $\pm$ 1,22	62,73 $\pm$ 2,7	3,6 $\pm$ 0,13	2,80 $\pm$ 0,16	0,81 $\pm$ 0,06	1,02 $\pm$ 0,07	0,88 $\pm$ 0,01	1,14 $\pm$ 0,08
<b>CEFIP-KO ISO N=7</b>	581,76 $\pm$ 17,8	29,79 $\pm$ 0,7	64,65 $\pm$ 2,31	3,72 $\pm$ 0,17	2,70 $\pm$ 0,15	0,93 $\pm$ 0,06	1,35 $\pm$ 0,07	0,98 $\pm$ 0,04	1,41 $\pm$ 0,06
<b>Signifikanz- niveau</b>	b*** c*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	b**	a** b*	a*** b**

Signifikanzniveaus wurden durch Two-Way ANOVA-Test gefolgt vom Student-Newman-Keul Post-hoc-Test ermittelt. n.s.  $\triangleq$  nicht signifikant, \*  $\triangleq$   $p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq$   $p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq$   $p < 0,001$ . Vergleich für: a  $\triangleq$  ISO vs. Vehikel innerhalb der WT-Gruppe, b  $\triangleq$  ISO vs. Vehikel innerhalb der CEFIP-KO Gruppe, c  $\triangleq$  CEFIP-KO vs. WT innerhalb der Vehikel-Gruppe, d  $\triangleq$  CEFIP-KO vs. WT innerhalb der ISO-Gruppe.

Die chronische Zufuhr von Isoproterenol über einen längeren Zeitraum führt bei den Mäusen zu einer signifikanten Erhöhung der Herzfrequenz. Die Zunahme des gemessenen Herzgewichtes hat in diesem Stadium noch keinen Einfluss auf das Fractional Shortening oder den ventrikulären Diameter (Abbildung 3-28 A-B). Es wird jedoch deutlich, dass sich durch die Belastung das Septum verdickt (Abbildung 3-28 C) und in der Wildtypgruppe die Hinterwand des linken Ventrikels signifikant verstärkt hat. Der LVPWd unterscheidet sich in der ISO-Gruppe ebenfalls signifikant voneinander, wobei die Hinterwand weniger dick ist (Abbildung 3-28 D).



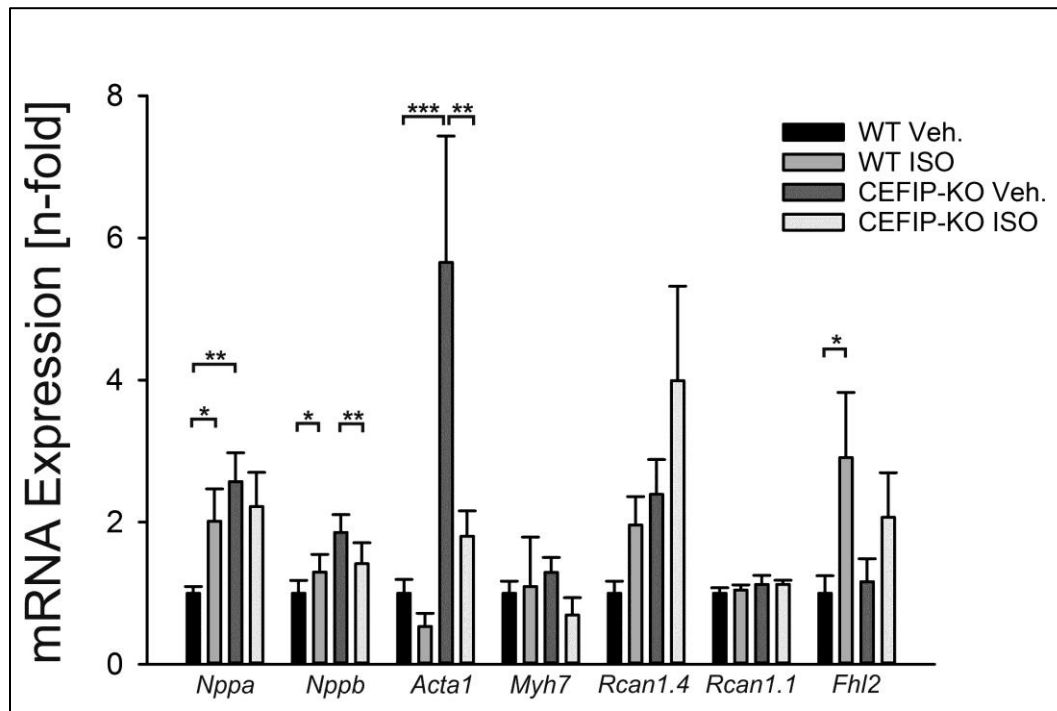
**Abbildung 3–28: Echokardiographische Analyse von CEFIP-Knockout Mäusen nach chronischer Isoproterenolstimulation**

14-tägige Stimulation mit Isoproterenol führt nicht zur Verschlechterung des Fractional Shortenings. A-C, Echokardiographisch konnte sowohl in der systolischen Funktion, als auch im linksventrikulären Diameter und der Stärke des Septums keine Veränderung in den chronisch mit Isoproterenol stimulierten Wildtypen und CEFIP-Knockout Mäusen gemessen werden. D, Die Stärke der Hinterwand war hingegen in den Wildtypen durch Isoproterenolstimulation verdickt ( $\pm$  SEM; Signifikanzniveaus: \*  $\triangleq$   $p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq$   $p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq$   $p < 0,001$ ).

Auf molekularer Ebene ist der Interaktionspartner *Fhl2* in den Wildtypmäusen 3-fach und in den CEFIP-Knockout 2-fach hochreguliert (WT ISO:  $2,91 \pm 0,6$ -fach; KO ISO:  $2,1 \pm 0,6$ -fach; Abbildung 3-29 A). Dies entspricht anderen Veröffentlichungen über *Fhl2*-Regulation in Isoproterenolversuchen (Kong, Shelton et al. 2001; Hojayeve, Rothermel et al. 2012).

Bei den Genmarkern, welche bei Hypertrophie reguliert sind, zeigen nur *Nppa* und *Nppb* eine signifikante Aktivierung in der Kontrollgruppe (*Nppa*- WT Iso:  $2,01 \pm 0,41$ -fach; *Nppb*- WT ISO:  $2,03 \pm 0,27$ -fach, Abbildung 3-29 B). Die CEFIP-Knockout Gruppe zeigt unter

Kontrollbedingungen bereits eine Aktivierung des hypertrophen Genprogramms, welches mit 14-tägiger Isoproterenolstimulation nicht weiter induziert werden konnte. Allein *Rcan1.4* zeigt eine Tendenz zur Heraufregulation in Isoproterenol-behandelten CEFIP-Knockout Mäusen, während *Acta1* in beiden ISO-Gruppen herabreguliert wird.



**Abbildung 3–29: Quantitative Untersuchung des hypertrophen Genprogramms von CEFIP-Knockout Mäusen nach chronischer Isoproterenolstimulation**

Isoproterenol bewirkt in CEFIP-Knockout Mäusen keine weitere Induktion der hypertrophen Genmarker. *Fhl2* ist in Mäusen mit chronischer Isoproterenolgabe signifikant auf mRNA-Ebene hochreguliert. Die hypertrophen Genmarker *Nppa* und *Nppb* sind nur in Wildtypmäusen, welche Isoproterenol bekommen haben signifikant hochreguliert ( $\pm$  SEM; Signifikanzniveaus: \*  $\triangleq$   $p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq$   $p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq$   $p < 0,001$ ).

### 3.6.3 Die Calcineurin-induzierte Hypertrophie wird durch CEFIP-Defizienz nicht verstärkt

Die Bestätigung des Interaktionspartners FHL2 *in vitro* und die daraus resultierenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass CEFIP eine wichtige Rolle im Calcineurin-NFAT Signalweg spielt. Um auch hier den genauen Einfluss im Organismus zu untersuchen, wurden CEFIP-defiziente Mäuse mit Calcineurin-Transgenen Tieren (CnA-TG) gekreuzt. Die Calcineurin-überexprimierenden Mäuse entwickeln spontan eine ausgeprägte Hypertrophie und leiden im weiteren Verlauf an einer Herzinsuffizienz (Molkentin, Lu et al. 1998).

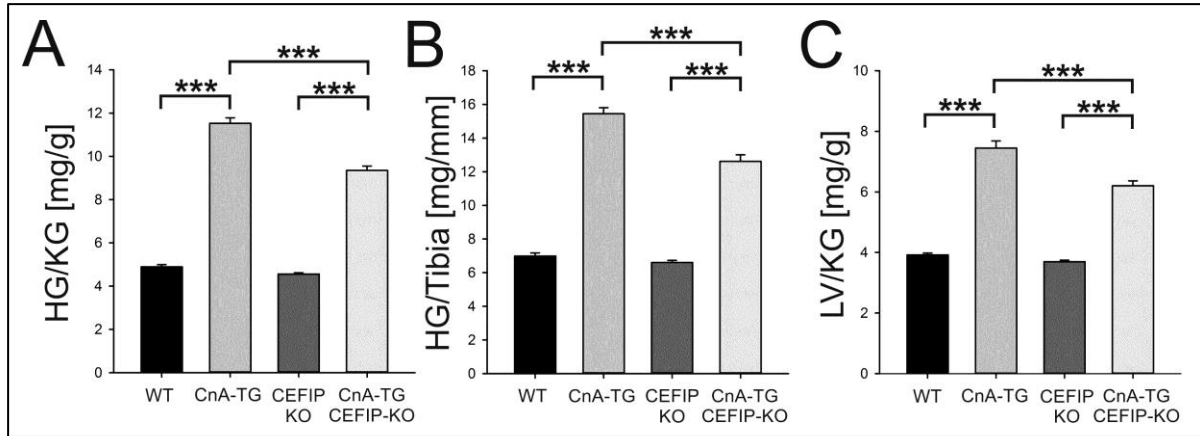
Jeweils 12 männliche Tiere wurden genotypisiert und im Alter von 7-9 Wochen echokardiographisch untersucht und morphometrisch vermessen (Tabelle 3-10).

**Tabelle 3–10: Morphometrische Daten von CEFIP-Knockout Tieren gekreuzt mit Calcineurin-TG Mäusen**

	Alter [d]	KG [g]	HG [mg]	LV [mg]	Tibia- länge [mm]	HG/KG [mg/g]	HG/Tibia- länge [mg/mm]	LV/KG [mg/g]	LV/Tibia- länge [mg/mm]	Lungen- gewicht [mg]
<b>WT</b> N=12	53,0 ± 0,3	22,6 ± 0,5	110,0 ± 2,5	88,2 ± 1,7	15,8 ± 0,10	4,89 ± 0,09	6,96 ± 0,17	3,92 ± 0,06	5,58 ± 0,11	147,3 ± 3,2
<b>CnA-TG</b> N=12	52,5 ± 0,4	20,7 ± 0,4	238,5 ± 5,8	153,6 ± 4,4	15,4 ± 0,08	11,54 ± 0,23	15,42 ± 0,33	7,45 ± 0,21	9,94 ± 0,28	151,4 ± 6,7
<b>CEFIP-KO</b> N=11	68,4 ± 6,1	23,1 ± 0,6	105,0 ± 2,3	85,2 ± 2,9	15,9 ± 0,17	4,57 ± 0,06	6,61 ± 0,12	3,70 ± 0,05	5,36 ± 0,15	133,3 ± 2,3
<b>CnA-TG CEFIP-KO</b> N=13	59,7 ± 2,9	20,8 ± 0,5	195,0 ± 7,1	129,9 ± 5,9	15,4 ± 0,18	9,34 ± 0,19	12,57 ± 0,36	6,18 ± 0,15	8,34 ± 0,31	131,6 ± 3,5
<b>Signifikanz- niveau</b>	c**	a* b**	a*** b*** d***	a*** b*** d***	b*	a*** b*** d***	a*** b*** d***	a*** b*** d***	a*** b*** d***	c* d***

Signifikanzniveaus wurden durch Two-Way ANOVA-Test gefolgt vom Student-Newman-Keul Post-hoc-Test ermittelt. n.s.  $\triangleq$  nicht signifikant, \*  $\triangleq$   $p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq$   $p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq$   $p < 0,001$ . Vergleich für: a  $\triangleq$  CnA-TG vs. WT, b  $\triangleq$  CnA-TG/CEFIP-KO vs. CEFIP-KO, c  $\triangleq$  CEFIP-KO vs. WT, d  $\triangleq$  CnA-TG/CEFIP-KO vs. CnA-TG.

Die Analyse der morphometrischen Daten ergaben, dass eine Kreuzung von CEFIP-Knockout Tieren mit Calcineurin-TG zu einer signifikanten Reduktion der Herzgewicht/Körpergewicht-Ratio im Vergleich zu Calcineurin-TG alleine führt (Abbildung 3-30 A). Das geringere Gewicht der CnA-TG/CEFIP-KO-Herzen bestätigt sich auch in dem Quotienten zur Tibiallänge (Abbildung 3-30 B) und in der Vermessung des Quotienten des linken Ventrikels zum Körpergewicht (Abbildung 3-30 C).



**Abbildung 3–30: Morphometrische Analyse von CnA-TG/CEFIP-KO Mäusen**

CEFIP-defiziente Mäuse gekreuzt mit Calcineurin-TG Mäusen weisen ein geringeres Herzgewicht auf als Calcineurin-TG Tiere. A-C, Calcineurin-Transgene Mäuse haben ein stark vergrößertes Herz (Quotient HG/KG, HG/Tibia, LV/KG). Dieser Effekt wird durch die Kreuzung der Mäuse mit den CEFIP-Knockout Mäusen signifikant reduziert ( $\pm$  SEM; Signifikanzniveaus: \*  $\triangleq$   $p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq$   $p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq$   $p < 0,001$ ).

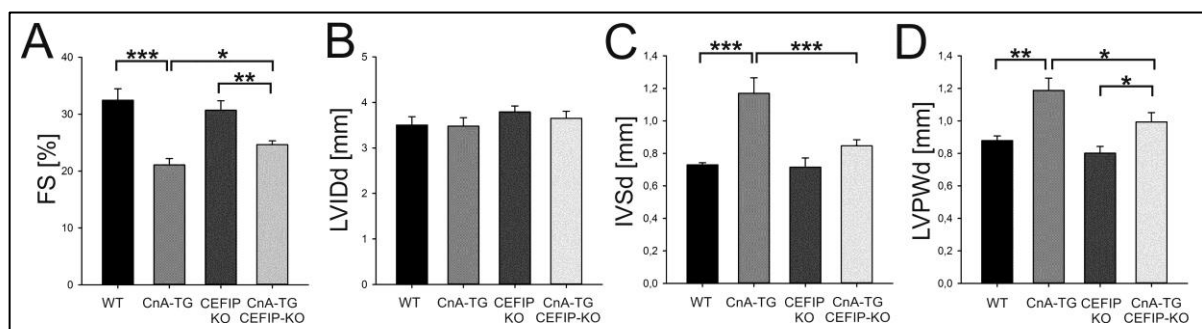
Zur Erhebung der echokardiographischen Daten wurden neun doppelt transgene (Calcineurin-TG, CEFIP-KO) Tiere und sieben Calcineurin-TG Mäuse untersucht. Als Kontrolle dienten männliche Geschwistertiere C57BL/6N und reine CEFIP-Knockout Mäuse. Es wurden die Herzparameter LVID, IVS und LVPW in der Diastole und Systole, sowie die Herzfrequenz, EF und FS analysiert (Tabelle 3-11).

**Tabelle 3–11: Echokardiographische Daten von CEFIP-Knockout Tieren gekreuzt mit Calcineurin-TG Mäusen und deren Kontrolltieren**

	Herzfrequenz [bpm]	FS [%]	EF [%]	LVIDd [mm]	LVIDs [mm]	IVSd [mm]	IVSs [mm]	LVPWd [mm]	LVPWs [mm]
<b>WT</b> N=6	453,04 $\pm$ 22,52	32,46 $\pm$ 1,40	64,63 $\pm$ 2,2	3,50 $\pm$ 0,84	2,33 $\pm$ 0,23	0,73 $\pm$ 0,02	1,13 $\pm$ 0,09	0,88 $\pm$ 0,03	1,22 $\pm$ 0,05
<b>CnA-TG</b> N=7	301,39 $\pm$ 44,54	21,09 $\pm$ 1,28	52,72 $\pm$ 1,8	3,48 $\pm$ 0,19	2,85 $\pm$ 0,13	1,19 $\pm$ 0,11	1,24 $\pm$ 0,12	1,19 $\pm$ 0,08	1,37 $\pm$ 0,11
<b>CEFIP-KO</b> N=6	439,47 $\pm$ 32,05	30,71 $\pm$ 1,41	61,65 $\pm$ 4,8	3,79 $\pm$ 0,13	2,66 $\pm$ 0,13	0,72 $\pm$ 0,07	1,01 $\pm$ 0,12	0,80 $\pm$ 0,04	1,04 $\pm$ 0,06
<b>CnA-TG CEFIP-KO</b> N=9	333,40 $\pm$ 23,68	24,65 $\pm$ 1,11	52,81 $\pm$ 1,5	3,65 $\pm$ 0,16	2,91 $\pm$ 0,16	0,84 $\pm$ 0,40	1,19 $\pm$ 0,08	0,99 $\pm$ 0,06	1,40 $\pm$ 0,13
<b>Signifikanzniveau</b>	a** b*	a*** b** d*	a*	n.s.	a*	a*** d***	n.s.	a** b* d*	b*

Signifikanzniveaus wurden durch Two-Way ANOVA-Test gefolgt vom Student-Newman-Keul Post-hoc-Test ermittelt. n.s.  $\triangleq$  nicht signifikant, \*  $\triangleq$   $p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq$   $p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq$   $p < 0,001$ . Vergleich für: a  $\triangleq$  CnA-TG vs. WT, b  $\triangleq$  CnA-TG/CEFIP-KO vs. CEFIP-KO, c  $\triangleq$  CEFIP-KO vs. WT, d  $\triangleq$  CnA-TG/CEFIP-KO vs. CnA-TG.

Die Kreuzung der CEFIP-Knockout Mäuse mit den Calcineurin-überexprimierenden Mäusen führte zu keiner Veränderung im Fractional Shortening. Calcineurin-TG haben aufgrund ihres stark vergrößerten Herzens eine schlechtere Auswurfleistung, welche nicht so stark vermindert bei den CnA-TG/CEFIP-KO gemessen wurde (Abbildung 3-31 A). In diesem Alter ist der LVIDd diastolisch nicht verändert (Abbildung 3-31 B). Die CEFIP-Defizienz inhibiert die Ausbildung der Calcineurin-induzierten Hypertrophie gemessen an den Wandstärken des Septums (IVSd) und der Hinterwand (LVPWd) (Abbildung 3-31 C-D).



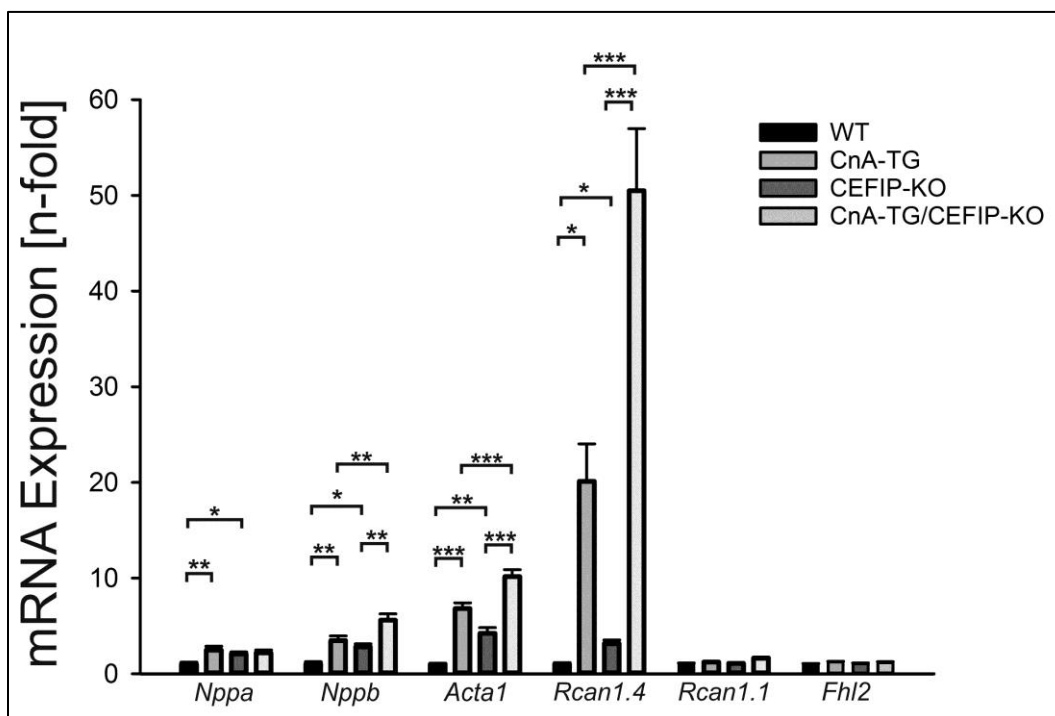
### Abbildung 3–31: Echokardiographische Analyse von CnA-TG/CEFIP-KO Mäusen

Kreuzung von CEFIP-Knockout und Calcineurin-TG Mäusen führt nicht zu Verschlechterung des Fractional Shortenings. A, Calcineurin-Transgene Mäuse haben im Vergleich zu Wildtypmäusen ein signifikant schlechteres Fractional Shortening. Die Kreuzung der CnA-TG mit CEFIP-KO Mäusen führt zur leichten Verbesserung des Fractional Shortenings. B, Der linksventrikuläre Durchmesser ist in allen vier Gruppen gleich. C-D, Sowohl die Stärke der Septumwand (IVS) als auch der Hinterwand (LVPW) nimmt in der Diastole bei Überexpression von Calcineurin signifikant zu. Im Vergleich zu den CnA-TG Mäusen war bei den mit CEFIP-Knockout gekreuzten CnA-TG sowohl die Stärke der Septumwand als auch der LVPWd-Parameter signifikant geringer ( $\pm$  SEM; Signifikanzniveaus: \*  $\triangleq$   $p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq$   $p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq$   $p < 0,001$ ).

FHL2 interagiert mit Calcineurin, wie bereits ausgeführt, und inhibiert die Hypertrophie. In Mäusen, welche kardial Calcineurin überexprimierten, zeigt sich auf mRNA-Ebene jedoch kein unterschiedliches *Fhl2*-Expressionsniveau in CEFIP-Knockout Mäusen oder CnA-TG/CEFIP-KO im Verhältnis zu Wildtypen (Abbildung 3-32).

Die durch Calcineurin erzeugte Hypertrophie ist auch auf molekularem Level zu zeigen. Die typischen Faktoren wie *Nppa*, *Nppb* und *Acta1* sind signifikant heraufreguliert, als Calcineurin-spezifischer Marker ist *Rcan1.4* ebenfalls stark hochreguliert. *Nppa* ist in CnA-TG

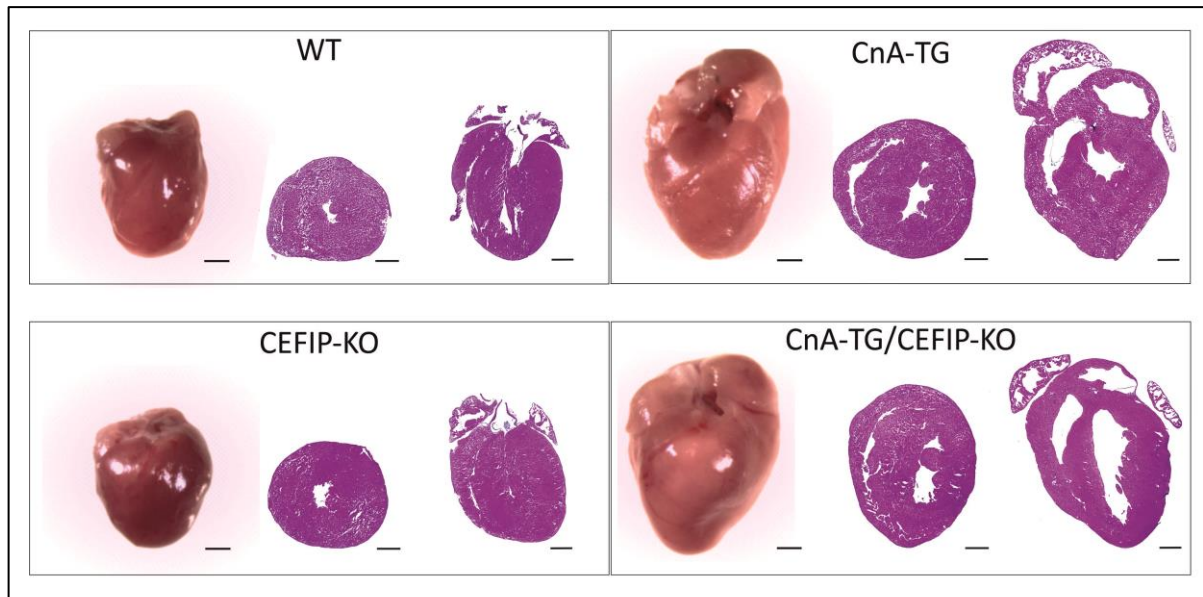
2,5-fach überexprimiert, während CEFIP-Knockout Mäuse ihren Basallevel von 2-fach auch bei der Kreuzung mit Calcineurin-TG nicht überbieten (im Vergleich zu WT: CnA-TG:  $2,48 \pm 0,308$ -fach; CEFIP-KO:  $2,01 \pm 0,34$ -fach CnA-TG/CEFIP-KO:  $2,17 \pm 0,37$ -fach; Abbildung 3-32). *Nppb* und *Acta1* sind in Calcineurin-Transgenen Mäusen signifikant überexprimiert, welches sich durch die Kreuzung mit CEFIP-Knockout Mäusen nochmal zunehmend steigert (im Vergleich zu WT: *Nppb*- CnA-TG:  $3,47 \pm 0,54$ -fach; CnA-TG/CEFIP-KO:  $5,59 \pm 0,47$ -fach, *Acta1*- CnA-TG:  $6,82 \pm 0,63$ -fach; CnA-TG/CEFIP-KO:  $10,15 \pm 0,55$ -fach. *Rcan1.4* ist in den Calcineurin-Transgenen Tieren der wichtigste Marker. Kreuzt man diese Tiere mit CEFIP-defizienten wird der Effekt nochmals um das 2,5-fache gesteigert (im Vergleich zu WT: CnA-TG:  $20,12 \pm 4,85$ -fach; CnA-TG/CEFIP-KO:  $50,49 \pm 4,2$ -fach; Abbildung 3-32).



**Abbildung 3–32: Quantitative Untersuchung des hypertrophen Genprogramms von CnA-TG/CEFIP-KO Mäusen**

Die Kreuzung von Calcineurin-TG mit CEFIP-Knockout Mäusen führt zur „Super“-Induktion von *Rcan1.4*. Das Calcineurin bindende Protein FHL2 zeigt in Tieren mit überexprimiertem Calcineurin eine tendenzielle Erhöhung auf mRNA Ebene. Die hypertrophen Genmarker sind durch die verstärkte kardiale Anwesenheit von Calcineurin signifikant erhöht. Besonders *Rcan1.4* ist in den Calcineurin-TG stark erhöht und wird durch die Abwesenheit von CEFIP in den Knockout Mäusen 2,5-fach verstärkt ( $\pm$  SEM; Signifikanzniveaus: \*  $\triangleq$   $p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq$   $p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq$   $p < 0,001$ ).



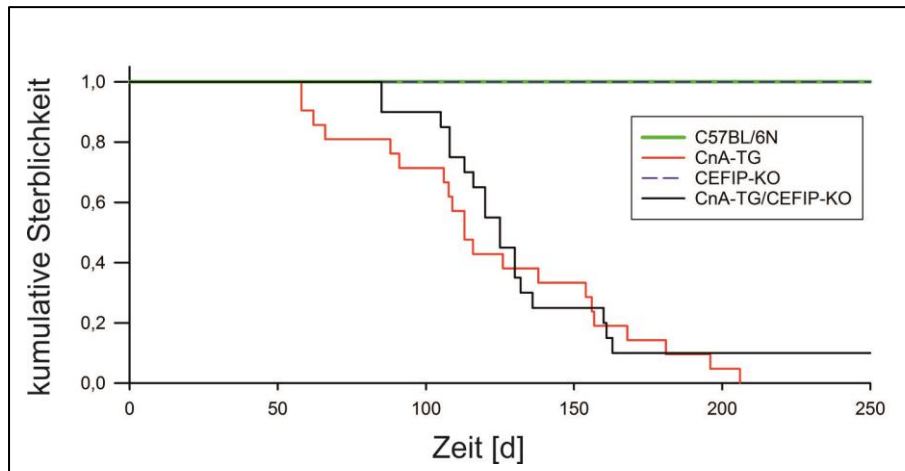


**Abbildung 3–33: Vergleich der CEFIP-KO Herzen mit CnA-TG und deren Kreuzung**

Herzen von 9 Wochen alten Mäusen und ihren Kontrollen wurden entnommen und abgelichtet. Jeweils ein Längs- und ein Querschnitt wurden in 5 µm dünne Schnitte verarbeitet und nach einer H+E-Färbung dargestellt (Maßstabsbalken 1 mm).

Morphologisch betrachtet unterscheiden sich CEFIP-KO Herzen nicht von Wildtypherzen in ihrer Größe und Form (Abbildung 3-33). Durch die Überexpression von konstitutiv aktivem Calcineurin vergrößert sich das Herz und zeigt in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung sowohl im Quer- als auch im Längsschnitt die stark verdickte Septum- und Hinterwand und vergrößerte Ventrikel.

*In vitro* CEFIP-Versuche haben gezeigt, dass die Abwesenheit von CEFIP Calcineurin-vermittelte Hypertrophie verhindern kann. Die Kreuzung von CEFIP-Knockout Mäusen in einen Calcineurin-überexprimierenden Hintergrund ließ eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit vermuten. Calcineurin-TG Mäuse entwickeln mit circa 8 Wochen eine Hypertrophie und im Alter von 12 Wochen eine Herzinsuffizienz, an welcher sie dann versterben. In der Versuchsgruppe hatten die Calcineurin-TG Mäuse eine Lebensdauer von durchschnittlich 4,5 Monaten, die Ältesten wurden 7 Monate (Abbildung 3-34). Die Kreuzung mit CEFIP-defizienten Tieren erbrachte keine signifikant höhere Überlebensrate. Auch hier verstarben die Tiere mit durchschnittlich 4,5 Monaten. Lediglich eine Maus erreichte ein Alter von 10 Monaten.



**Abbildung 3–34: Auswirkung der Kreuzung von CnA-TG mit CEFIP-KO auf die Sterblichkeit**

Kreuzung mit CEFIP-Knockout Mäusen erhöht nicht die Überlebenswahrscheinlichkeit. Kaplan-Meier-Kurve von CnA-TG und CnA-TG/CEFIP-KO Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen und CEFIP-KO Mäusen (N=21 je Gruppe). 50 % der Calcineurin-TG Tiere waren nach 122,4 Tagen [d] verstorben. 50 % der CnA/CEFIP-KO Tiere verstarben nach 125,0 Tagen. Sowohl die Wildtyp Mäuse als auch homozygoten CEFIP-Knockout Mäuse waren über 1,5 Jahre überlebensfähig.

### 3.7 Bestätigung des CEFIP-Einflusses in isolierten neonatalen Mauskardiomyozyten

Nachdem CEFIP sowohl in neonatal isolierten Rattenkardiomyozyten (NMCM) als auch im adulten Knockout Mausmodell charakterisiert worden war, stellte sich die Frage warum die *in vivo* Ergebnisse nicht den *in vitro* Ergebnissen entsprachen.

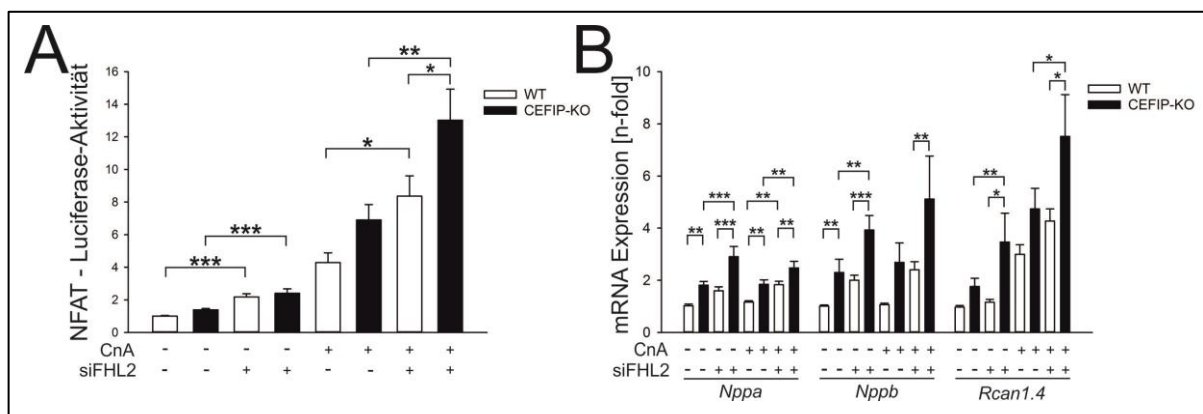
Erste Verdachtspunkte könnten sein, dass es sich in der Zellkultur um noch nicht differenzierte Kardiomyozyten handelt, während die charakterisierten Tiere adulte Mäuse mit ausdifferenzierten Herzzellen sind. Des Weiteren handelt es sich bei den Mäusen um Knockout Tiere, welche die Deletion im gesamten Organismus haben. Auch der „Knockdown“ mittels synthetischer miRNA schafft nur eine Regulation von 80 %.

Um diese Fragen zumindest teilweise zu beantworten, wurden aus den homozygoten Knockout Mäusen im Alter von 1-3 Tagen Kardiomyozyten isoliert. Hierfür mussten reine homozygot CEFIP-Knockout Tiere mit homozygot CEFIP-Knockout Tieren verpaart werden, da eine vorherige Genotypisierung im Alter von 1-3 Tagen nicht möglich ist. Als Kontrollgruppe dienten C57BL/6N Mäuse.

Die Zellen wurden gruppenspezifisch isoliert und nach 24 h Erholungsphase analog zu den Luciferase-Versuchen (Kapitel 3.4.3) behandelt. Je Gruppe wurden die Zellen mit Adenoviren, welche sowohl Firefly-NFAT-Luciferase, Renilla-Luciferase als auch konstitutiv

aktives Calcineurin oder  $\beta$ -Galaktosidase exprimieren, co-infiziert. Später wurden sie mit siRNAs gegen FHL2 oder deren Kontrolle transfiziert.

Die Auswertungen der Luciferase-Tests zeigten, dass in CEFIP-KO Kardiomyozyten die durch konstitutiv aktive Calcineurin vermittelte NFAT-Luciferase-Aktivität deutlich verstärkt war und die Abwesenheit von FHL2 zu einer weiteren deutlichen Steigerung der Luciferase-Aktivität in beiden Gruppen führte (Abbildung 3-35 A). Die Reduktion von CEFIP in NRVCMS führte währenddessen zur Verminderung der NFAT-Luciferase-Aktivität geführt. Die hypertrophen Genmarker entsprachen der Expression in den CEFIP-CnA-*in vivo*-Versuchen. Die vollständige Abwesenheit von CEFIP führte zur Induktion der *Nppa*-, *Nppb*- und *Rcan1.4*-Expression, welche durch konstitutives Calcineurin nochmal gesteigert wurde (Abbildung 3-35 B). Die Versuche in isolierten NMCMs aus CEFIP-Knockout Mausherzen spiegelt die *in vivo* Daten wieder, was dafür sprechen könnte, dass eine Herunterregulation von CEFIP via synthetischer miRNA einen anderen Effekt hat, als die komplette Deletion von Geburt an.



**Abbildung 3–35: Regulation der NFAT-Luciferase-Aktivität in isolierten CEFIP-defizienten Kardiomyozyten**

Isolierte CEFIP-defiziente Kardiomyozyten zeigen eine starke Calcineurin-abhängige Induktion der NFAT-Luciferase-Aktivität. A, In Wildtypkardiomyozyten steigert die Abwesenheit von FHL2 die Luciferase-Aktivität um das 2-fache (WT siFHL2:  $2,18 \pm 0,14$ -fach, N=9), welche mit Unterstützung von konstitutiv aktivem Calcineurin nochmals verstärkt werden kann (WT siFHL2  $\Delta$ CnA:  $8,36 \pm 1,24$ -fach, N=9). Im Vergleich dazu zeigen Kardiomyozyten aus CEFIP-KO Tieren nahezu denselben Effekt bei FHL2-Abwesenheit (KO siFHL2:  $2,40 \pm 0,273$ -fach, N=9). Eine Steigerung des Calcineurinspiegels führt hier allerdings zu einer weitaus stärkeren Erhöhung der Luciferase-Aktivität (KO siFHL2  $\Delta$ CnA:  $13,02 \pm 1,912$ -fach, N=9). B, Die Messung des hypertrophen Genprogramms zeigt in neonatalen CEFIP-KO Kardiomyozyten eine signifikante Steigerung aller Parameter. Die Behandlung dieser mit einer siRNA gegen FHL2 und zusätzlicher Stimulation mit  $\Delta$ CnA führt zu einer starken Induktion von *Rcan1.4* (WT siFHL2  $\Delta$ CnA:  $4,74 \pm 0,79$ -fach, N=15; KO siFHL2  $\Delta$ CnA:  $7,52 \pm 1,60$ -fach, N=12) ( $\pm$  SEM; Signifikanzniveaus: \*  $\triangleq$  p<0,05; \*\*  $\triangleq$  p<0,01; \*\*\*  $\triangleq$  p<0,001).



## 4 Diskussion

### 4.1 CEFIP ist ein neues Z-Scheibenprotein

Die Z-Scheibe des Sarkomers ist in den letzten Jahren zu einem Knotenpunkt in der Entstehung von Kardiomyopathien erklärt worden (Frank, Kuhn et al. 2006). Ihre ursprüngliche Funktion als rein mechanische, nur für die Strukturhaltung notwendige Einheit wurde durch eine zentrale Rolle in der myokardialen Signaltransduktion erweitert. Immer mehr unerforschte Proteine und Mutationen in Z-Scheibenproteinen werden für die Entstehung von Hypertrophie und dilatativer Kardiomyopathie verantwortlich gemacht und dennoch ist die genaue Pathogenese dieser Herzerkrankungen noch unzureichend erforscht (Frey & Olson 2003; Heineke, Ruetten et al. 2005; Frank, Kuhn et al. 2006; Frank, Kuhn et al. 2007).

In systematischen Screening-Experimenten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. N. Frey wurde nach unbekannt Genen mit einer hohen Abundanz in Herz- und Skelettmuskel gesucht. Dadurch konnten auch mehrere neue herz- und muskelspezifische exprimierte Z-Scheibenproteine beschrieben werden, darunter die Familie der Calsarcins (Frey, Richardson et al. 2000; Frey & Olson 2002), Myomasp (Will, Eden et al. 2010) oder auch das kardiale F-Box Protein Fbxl22 (Spaich, Will et al. 2012). Die Familie der Calsarcins interagiert direkt mit Calcineurin. Calsarcin-1-Knockout Tiere entwickeln im reinen C57/Bl6-Hintergrund einen dilatativen Phänotyp, während die Überexpression von Calsarcin-1 in Kardiomyozyten vor Angiotensin-vermittelter Hypertrophie schützt (Frank, Kuhn et al. 2007). Fbxl22 vermittelt die Degradation von Z-Scheibenproteinen wie  $\alpha$ -Aktinin2 und Filamin C und inhibiert die kardiomyozytäre Hypertrophie. Der „Knockdown“ von Fbxl22 in Kardiomyozyten resultiert in der Akkumulation von  $\alpha$ -Aktinin und der damit verbundenen Kardiomyopathie (Spaich, Will et al. 2012). Sowohl Fbxl22 als auch die Calsarcine zeigen eine wichtige Rolle an der Z-Scheibe und in der Entstehung von Kardiomyopathien.

Ein neues Z-Scheibenprotein aus diesen EST-basierenden Screens wird im Rahmen dieser Arbeit vorgestellt. Die herz- und muskelspezifische Expression wurde mittels Northern Blot Hybridisierung und quantitativer Real-Time PCR bestätigt. Beide Methoden zeigen zwar eine relativ spezifische Expression der *Cefip*-RNA, jedoch vermittelt die Northern Blot Analyse den Eindruck einer höheren Expression von *Cefip* im Herzen. Die quantitative Real-Time PCR Analyse zeigt eine höhere Konzentration im Skelettmuskel. Beide Methoden werden hinsichtlich ihrer Spezifität und Sensitivität häufig diskutiert. Die Northern Blot Analyse ergibt erstmals eine Aussage über die Größe von *Cefip* (~6,8 kb). Daraufhin wurde eine Western Blot Analyse von unterschiedlichen Mausgeweben durchgeführt. Hierfür wurde in Kooperation mit der Zellbiologie Bonn ein Anti-CEFIP-Antikörper generiert. Bei dem

Antikörper handelt es sich um ein Antiserum aus Kaninchen, bei dem als Immunogen nur ein 354 Aminosäuren Fragment des N-terminalen CEFIP verwendet wurde. Dieser Antikörper konnte durch Peptidverdrängung validiert werden. Mit Hilfe dieses Antikörpers konnte das Expressionsprofil von CEFIP in Herz- und Skelettmuskulatur bestätigt werden. Es zeigte sich ebenfalls im Lungengewebe eine sehr schwache Bande, welche durch Peptidverdrängung verschwand. Auf mRNA-Ebene zeigt sich eine schwache Expression von CEFIP in Lunge, Niere und Leber, welche durch andere Versuche wie zum Beispiel Immunohistologie nicht bestätigt werden konnte. Da es sich um einen generierten Antikörper, welcher gegen ein Teilfragment von CEFIP gerichtet ist, handelt, könnte der Antikörper hier ein unbekanntes Protein mit ähnlicher Teilsequenz detektiert haben. Dieser Blot zeigt auch, dass es sich bei CEFIP mit circa 230 kDa um ein größeres Protein handelt. Computerbasierend ist nur eine Größe von circa 170 kDa vorgegeben worden, die aber nicht 2D- und 3D-Strukturen und posttranslationale Modifikationen berücksichtigt.

Um CEFIP zu charakterisieren, wurden zuerst computerbasierte Analysen durchgeführt, wobei gezeigt werden konnte, dass CEFIP in unterschiedlichen Spezies zwar evolutionär hoch konserviert ist, dennoch keine bekannten funktionellen Domänen besitzt. Die einzige Domäne die humanen und murinen CEFIP-Aminosäuresequenzen gefunden werden konnte, ist eine „domain of unknown function“ (DUF4585, pfam15232), welche ebenfalls im Protein PROB1 vorkommt, aber bisher keine bekannte Funktion besitzt und nicht näher charakterisiert wurde. Die Domäne zeichnet sich durch einen konservierten, circa 70 Aminosäuren langen, am C-Terminus gelegenen Abschnitt aus.

Um erste Hinweise auf die Funktion von CEFIP im Herzen zu bekommen, wurde die Lokalisation von CEFIP in Kardiomyozyten bestimmt. Hierfür wurden neonatale Rattenkardiomyozyten, adulte Mauskardiomyozyten und Schnitte von murinem Herzgewebe mit dem CEFIP-spezifischen Antikörper angefärbt. Das CEFIP-Antiserum zeigt sehr spezifische Banden, welche mit  $\alpha$ -Aktinin co-lokalisieren. Da  $\alpha$ -Aktinin an der Z-Scheibe lokalisiert ist, beweist die Färbung, dass es sich bei CEFIP ebenfalls um ein Z-Scheibenprotein handelt. Färbungen von Gewebe aus Niere und Leber zeigen keine Färbung mit CEFIP-Antiserum. Dies spiegelt die Western Blot, Northern Blot und Real-Time-Analysen wieder.

## 4.2 Funktionelle Einordnung von CEFIP

Um die Funktion von CEFIP an der Z-Scheibe zu definieren, musste analysiert werden, ob CEFIP eine potentiell strukturelle oder eine dynamische Rolle einnimmt. Allein die molekulare Größe von CEFIP lässt vermuten, dass es sich bei CEFIP um ein Strukturprotein handelt. Interessanterweise zeigen FRAP-Analysen, dass es sich bei CEFIP verglichen mit

anderen Sarkomer-Proteinen aus Säugetieren (Kuhn, Frank et al. 2009; Kuhn, Frank et al. 2012; Leber, Ruparelia et al. 2016) oder Vögeln (Wang, Dube et al. 2011; Barcelos, Ambrosio et al. 2017) um ein sehr dynamisches Protein mit hoher Mobilität handelt. Somit scheint CEFIP eher eine Rolle in der Signaltransduktion zu spielen als im Strukturaufbau des kontraktiven Apparats.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde zur Funktionsanalyse von CEFIP nach direkten Interaktionspartnern von CEFIP durch Yeast 2-Hybrid Analysen gesucht. Aufgrund von autoaktivierenden Eigenschaften der kompletten CEFIP-Sequenz sowie deren Größe mussten drei Fragmente von CEFIP als Köder („bait“) eingesetzt werden. Im Rahmen dieser drei Yeast 2-Hybrid Analysen konnten viele bekannte Z-Scheibenproteine als potentielle Interaktionspartner identifiziert werden. Diese Interaktionen sprechen wiederum für eine Lokalisation von CEFIP an der Z-Scheibe. Auffällig häufig konnte mit den Fragmenten A1966-2160 und A12160-3168 Fragmenten FHL2 als „prey“ gefunden werden. Die Interaktion zwischen FHL2 und CEFIP konnte sowohl durch Co-Immunopräzipitation als auch durch Co-Lokalisation in adulten Mauskardiomyozyten bestätigt werden. Interessanterweise müssen mindestens zwei unabhängige Bindungsstellen für FHL2 auf CEFIP existieren, da FHL2 in zwei der Yeast 2-Hybrid Analysen detektiert wurde, obwohl die Sequenzen der als „baits“ eingesetzten Fragmente von CEFIP nicht überlappen.

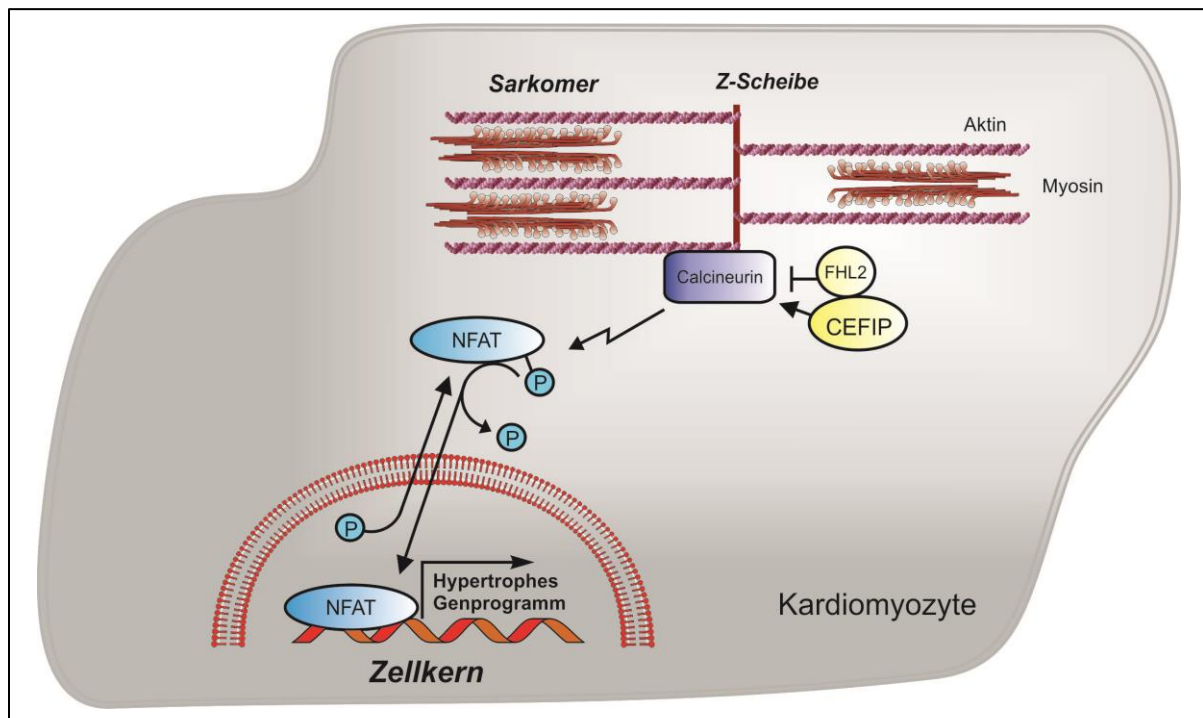
### 4.3 Abhängigkeit der Hypertrophieinduktion von CEFIP

FHL2 wurde bereits als kardial spezifisches Z-Scheibenprotein identifiziert (Chan, Tsui et al. 1998), welches mit einer Reihe unterschiedlichster Zellmembran-, Zytoplasma- oder Sarkomer-Proteinen interagiert (Rachmin, Amsalem et al. 2015; Tran, Kurakula et al. 2016). Zu diesen zählt auch Calcineurin, ein Schlüsselprotein in der Hypertrophie (Ritter, Hack et al. 2002; Hojayev, Rothermel et al. 2012). Bislang ist die genaue Rolle von FHL2 in der kardialen Hypertrophie noch nicht vollständig geklärt. *In vivo* Analysen von FHL2-defizienten Mäusen zeigen, dass diese unter Normalbedingungen keinen pathologischen Phänotyp zeigen. Auch nach TAC-Operationen entwickeln FHL2-Knockout Mäuse eine Hypertrophie im selben Ausmaß wie Wildtyp-Kontrolltiere (Chu, Bardwell et al. 2000). Werden die Mäuse jedoch mit einem  $\beta$ -adrenergen Rezeptoragonist wie Isoproterenol stimuliert, reagieren sie mit einer verstärkten Hypertrophie (Kong, Shelton et al. 2001). Unter hypertrophen Bedingungen zeigt sich eine Induktion der FHL2-Spiegel als protektiv. Wie von Purcell et al. (2004) beschrieben, verhindert eine Überexpression von FHL2 die durch Phenylephrin oder MEK1 hervorgerufene Hypertrophie (Purcell, Darwis et al. 2004). Interessanterweise zeigt CEFIP genau den gegenteiligen Effekt auf die kardiale Hypertrophie als FHL2.

Eine adenovirale Überexpression von CEFIP in neonatalen Rattenkardiomyozyten führt zur zellulären Hypertrophie. Begleitet wird diese Vergrößerung der Zellen von einer verstärkten Expression des hypertrophen Genprogramms, zu dem die natriuretischen Peptide *Nppa* und *Nppb* zählen. Wird die Hypertrophie von Kardiomyozyten durch Stimulation mit dem alpha-adrenergen Rezeptoragonist Phenylephrin hervorgerufen, kann sie durch CEFIP-Überexpression sogar noch weiter verstärkt werden. In der Gegenprobe führt die Herunterregulation von endogenem CEFIP durch adenoviralen Transfer einer miRNA gegen CEFIP zur Abmilderung der Phenylephrin-induzierten Hypertrophie.

Der  $G_{q/11}$  Agonist Phenylephrin löst über eine Vielzahl von Signalwegen eine Hypertrophie aus (Frey & Olson 2003) und ist dadurch für eine genauere Aussage über die Funktion von CEFIP in der Signaltransduktion ungeeignet. Hierfür wurden spezifischere Versuche unternommen. Die Bestätigung von FHL2 als Interaktionspartner von CEFIP führt zur Annahme, dass CEFIP in den gleichen Signalweg wie FHL2 eingebunden sein könnte. Der wahrscheinlich interessanteste und wichtigste Interaktionspartner von FHL2 ist in diesem Bezug Calcineurin (Hojayev, Rothermel et al. 2012) und somit die Calcineurin-vermittelte Hypertrophie. In diesem Signalweg vermag es aktiviertes Calcineurin die NFAT-Transkriptionsfaktoren zu dephosphorylieren, wodurch die damit verbundene Translokation in den Nukleus und Induktion der hypertrophie-assoziierten Gene vermittelt wird (Heineke & Ritter 2012). Eine adenovirale Überexpression von CEFIP führt in Kardiomyozyten zu einer gesteigerten NFAT-Luciferase-Reporteraktivität, welche durch Stimulation mit konstitutiv aktivem Calcineurin noch weiter induziert werden kann. Ähnliche Ergebnisse erzielten Hojayev et al. 2012 mit einem „Knockdown“ von FHL2, welche in diesen Luciferase-Assays ebenfalls bestätigen werden konnten (Hojayev, Rothermel et al. 2012). Interessanterweise konnte der Luciferase-Reporter durch eine CEFIP-Überexpression mit parallelem FHL2-„Knockdown“ in Gegenwart von überexprimiertem, konstitutiv aktiviertem Calcineurin nicht weiter induziert werden. Grund dafür könnte das Erreichen der maximalen Aktivität („ceiling effect“) durch bereits zwei der drei Komponenten sein. Währenddessen kann die Steigerung der Calcineurin-abhängigen NFAT-Promotoraktivität, welche durch die Herunterregulation von FHL2 entsteht, durch die gleichzeitige Abwesenheit von CEFIP abgemildert werden. Dies zeigt, dass die Interaktion von FHL2 sowohl mit Calcineurin als auch mit CEFIP diese drei Proteine zu einem Komplex vernetzt (Abbildung 4-1). Für FHL2 konnte Hojayev et al. 2012 über Co-Immunopräzipitation und Co-Lokalisation die direkte Bindung an Calcineurin bestätigen und auch für CEFIP konnte die Interaktion mit FHL2 gezeigt werden. Bisher konnte die direkte Interaktion von CEFIP und Calcineurin mittel Co-Immunopräzipitation nicht bestätigt werden. Weiterhin haben aber FHL2 und CEFIP genau gegensätzliche Effekte auf die Calcineurin-NFAT Signalkaskade.





**Abbildung 4–1: Modell des Calcineurin-NFAT Signalweges und der potentiellen Rolle von CEFIP**

CEFIP ist an der Z-Scheibe lokalisiert und reguliert den Calcineurin-NFAT Signalweg. CEFIP aktiviert Calcineurin, welches die NFAT-Transkriptionsfaktoren dephosphoryliert und dadurch ihre Translokation in den Nukleus und Aktivierung der hypertrophie-assoziierten Gene vermittelt. FHL2 ist ein Interaktionspartner von CEFIP und verhindert durch Bindung an Calcineurin dessen Hypertrophieinduktion. Somit regulieren CEFIP und FHL2 den Calcineurin-Signalweg gegensätzlich (Dierck, Kuhn et al. 2017).

#### 4.4 Rolle von CEFIP in Kardiomyopathien

Bislang ist die Funktion von CEFIP für die Herzfunktion und Entwicklung von Kardiomyopathien völlig unbekannt. Im Herzgewebe von Patienten mit ischämischer oder dilatativer Kardiomyopathie konnte eine signifikante, fast 2,5-fache Induktion von *CEFIP* gezeigt werden. In diesen humanen Proben waren die hypertrophen Genmarker stark aktiviert. Diese Regulation konnte ebenfalls in murinen Modellen der Hypertrophie und der dilatativen Kardiomyopathie gemessen werden. Wiederum zeigt FHL2 in solchen Modellen den gegenteiligen Effekt. In humanen nicht-ischämischen Kardiomyopathieproben ist FHL2 signifikant herunterreguliert (Arimura, Matsumoto et al. 2007). In Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie wurden bereits spezifische Mutationen in FHL2 entdeckt (Friedrich, Reischmann et al. 2014). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass CEFIP als ein Mediator in Kardiomyopathien fungieren könnte. Vermutlich könnte CEFIP ein Teil der maladaptiven hypertrophen Antwort auf biomechanischen Stress in Kardiomyozyten sein.

Ebenso könnten Mutationen in CEFIP zur Entstehung von Hypertrophie oder Herzinsuffizienz beitragen oder sogar ein Auslöser sein. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte CEFIP-Expression ausreicht, um über den Calcineurin-NFAT Signalweg eine Hypertrophie auszulösen. Somit wäre CEFIP ein potentielles Target für therapeutische Intervention zum Beispiel mittels Verabreichung von siRNAs. Ein großer Vorteil wäre die Spezifität in Herz- und Skelettmuskulatur und die dadurch stark reduzierten Nebenwirkungen.

### 4.5 CEFIP Funktion *in vivo*

#### **CEFIP hat keinen Effekt auf die TAC-induzierte Hypertrophie**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CEFIP-Überexpression in isolierten Kardiomyozyten zu einer verstärkten Hypertrophie führt, welche wahrscheinlich durch den Calcineurin-Signalweg gesteuert wird. Um die aus den *in vitro*-Versuchen entstandenen Hypothesen zu bestätigen, wurde eine konstitutive CEFIP-Knockout Maus generiert. Hierbei wurde im gesamten Organismus das kodierende Exon 4 ausgeschaltet. Da CEFIP ein herz- und skelettmuskelspezifisches Protein ist, sollte der Knockout auch nur in den entsprechenden Organen zu einem Effekt führen. Die Mäuse hatten im Vergleich zu C57BL/6N die gleiche Sterblichkeitsrate und konnten bis zu 1,5 Jahre überleben. Dies bewies, dass das 230 kDa große Protein nicht in der Embryonalphase oder zum Überleben notwendig ist. Die Tiere zeigten sowohl mit 8 Wochen als auch mit 1,5 Jahren keinen offensichtlichen pathologischen Phänotyp. Jedoch war die Expression der Calcineurin-NFAT Zielgene wie *Rcan1.4* und *Nppb* signifikant in den CEFIP-Knockout Mäusen erhöht, obwohl die Parameter wie Herzgewicht zu Körpergewicht oder auch die Auswurfraction beweisen, dass keine Hypertrophie vorliegt (Abbildung 3-18/19; Abbildung 3-21/22). Die Calcineurin unabhängige Isoform *Rcan1.1* war unter Basisbedingungen nicht reguliert (Abbildung 3-20; Abbildung 3-23). Die Isoform *Rcan1.4* steht unter Kontrolle des Promotors, der 15 NFAT-Bindungsstellen aufweist, und wird spezifisch Calcineurin-abhängig exprimiert. Somit wird *Rcan1.4* auch als endogener Indikator für die Aktivierung des Calcineurin-NFAT Signalweges verwendet (Yang, Xiong et al. 2002; Frey, Katus et al. 2004; Frank, Frauen et al. 2010). Die unveränderte Expression von *Rcan1.1* und die signifikant erhöhte Expression von *Rcan1.4* bestärkt die Hypothese, dass CEFIP im Calcineurin-NFAT Signalweg eine wichtige Rolle spielen könnte.

Obwohl in isolierten Kardiomyozyten ein antihypertropher Effekt durch die Suppression von CEFIP festgestellt wurde, konnte in den CEFIP-Knockout Mäusen eine durch TAC-Operation induzierte Hypertrophie im Vergleich zu ihren C57BL/6N Kontrolltieren nicht verhindert werden. Die Hypertrophie konnte am Quotienten von Herzgewicht zu Körpergewicht

gemessen werden und obwohl die Auswurfleistung in den TAC-operierten CEFIP-Knockout Mäusen schlechter war als in den Kontrollen, war keine signifikante Erhöhung der Septumdicke und Hinterwanddicke zu messen. Die signifikante Erhöhung des linksventrikulären Durchmessers und die schlechtere Auswurfleistung könnten für eine Entwicklung einer DCM durch TAC in den CEFIP-Knockout Tieren sprechen, wobei die Wildtypgruppe unter TAC ebenfalls eine Tendenz zur Erhöhung des LVIDd und der Wandstärken zeigt. Bei einer ausgeprägten DCM würden die Wandstärken typischerweise dünner werden. Auch makroskopisch deutet sich keine DCM-Entwicklung bei den CEFIP-KO Mäusen durch aortale Konstriktion an. Für den Interaktionspartner FHL2 wurden ähnliche Effekte publiziert. FHL2-Knockout Mäuse entwickeln unter TAC auch eine zu Wildtyptieren vergleichbare Hypertrophie (Chu, Bardwell et al. 2000). Da es sich bei der TAC um eine mechanische Methode der Hypertrophieinduktion handelt, ist durch die Ausführung dieser Operation eine gewisse Variation grundsätzlich gegeben. Außerdem werden durch diese Methode auch gleich mehrere Signalwege aktiviert, sodass sie daher nicht spezifisch für eine Signalkaskade ist (Perrino, Naga Prasad et al. 2006).

### **Induktion von Hypertrophie durch chronische Isoproterenolstimulation**

FHL2 ist sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene höchst abundant im Herzen und nur wenig in anderen Organen exprimiert (Johannessen, Moller et al. 2006). Hojayeve et al. (2012) konnte zeigen, dass in der Isoproterenol-induzierten Hypertrophie die FHL2-Expression stark erhöht ist (Hojayeve, Rothermel et al. 2012). Gleichzeitig führt die Stimulation mit Isoproterenol in FHL2-Knockout Mäusen zur Induktion der hypertrophen Genmarker wie *Nppb* und *Rcan1.4* und zur signifikanten Erhöhung des Quotienten von Herzgewicht zu Körpergewicht (Kong, Shelton et al. 2001; Hojayeve, Rothermel et al. 2012). In Anlehnung an diese Versuche wurde der Einfluss von chronischer Isoproterenolstimulation auf die CEFIP-Knockout Mäuse getestet. Auf mRNA-Ebene ist *Fhl2* in den Kontrolltieren unter Isoproterenol signifikant erhöht, wodurch die vorangegangenen Daten bestätigt werden konnten, während die *Fhl2*-Induktion in den CEFIP-Knockout Mäusen nach Isoproterenolstimulation deutlich reduziert ist. Die Stimulation mit Isoproterenol führt zu einem höheren Herz- zu Körpergewicht-Quotienten in Wildtyp Tieren. Dieser Effekt fällt in den CEFIP-Knockout Mäusen nochmals stärker aus. Vermutlich ist dieser Effekt überschätzt und auf eine leichte Vergrößerung des rechten Ventrikels und ein geringeres Körpergewicht zurückzuführen, da die Normalisierung auf die Tibialänge, bzw. nur der linke Ventrikel gegen das gesamte Körpergewicht keinen Unterschied zu den Isoproterenol-Kontrolltieren zeigt. Die hypertrophen Genmarker sind in den CEFIP-Knockout Mäusen schon unter Basisbedingungen erhöht, was sich mit chronischer Stimulation nochmals steigert. Das Fractional Shortening und der linksventrikuläre Diameter sind in beiden Genotypen nicht

verändert, jedoch zeigt die Kontrollgruppe eine signifikante Verdickung der Hinterwand. Alles in allem liegt hier die Vermutung nahe, dass die Stimulation mit Isoproterenol nicht das gewünschte Ausmaß an Hypertrophie erreichen konnte und noch erst in der Ausbildung war. Die fetalen Marker und das gesteigerte Herzgewicht weisen auf eine Hypertrophieinduktion hin, die jedoch keine Auswirkungen auf das Fractional Shortening hatte. Der NFAT-abhängige Faktor *Rcan1.4* ist nur leicht induziert und unterstreicht nochmals die nicht ausreichende Hypertrophieaktivierung. Der höhere PVLWd-Parameter in den Wildtypen bestätigt dieses und legt gleichzeitig die Vermutung nahe, dass die Deletion von CEFIP diesen Effekt kompensieren könnte.

### **CEFIP-Deletion verzögert die Hypertrophieinduktion**

FHL2 bindet direkt an Calcineurin und kann so das pathologische Herzwachstum verhindern (Hojayev, Rothermel et al. 2012). Im Zuge seiner Arbeit untersuchte Hojayev auch die Kreuzung von FHL2-Knockout Mäusen mit transgenen Mäusen, die herzspezifisch konstitutiv aktives Calcineurin ( $\Delta$ CnA, ohne die autoinhibierende Domäne mit alpha-MHC Promoter) überexprimieren, und die Auswirkung der Kreuzung auf die Hypertrophie. 9 Wochen alte Tiere wurden untersucht und es konnten keine Unterschiede festgestellt werden, desgleich in beiden Genotypen die durch konstitutiv aktives Calcineurin induzierte Hypertrophie nachgewiesen werden konnte. Somit bewies Hojayev, dass FHL2 eine Hypertrophie durch Isoproterenol unterbinden kann, jedoch nicht die TAC- oder Calcineurin-vermittelte Hypertrophie. Wahrscheinlich sind hierfür die unterschiedlichen betroffenen Signalwege verantwortlich (Hojayev, Rothermel et al. 2012).

Die Kreuzung von CEFIP-Knockout Mäusen mit den Calcineurin-Transgenen sollte Aufschluss über die Regulationsmechanismen in dieser Signalkaskade geben. Die analysierten, 8 Wochen alten Tiere zeigten eine starke Hypertrophie gemessen an dem Herzgewicht, wobei die zusätzliche CEFIP-Deletion dies signifikant abmildern konnte. Echokardiographisch ermittelte Faktoren zeigen, dass durch die Überexpression des aktivierten Calcineurin eine Hypertrophie der Hinterwand hervorgerufen wurde, wobei bei zusätzlicher CEFIP-Deletion die Zunahme der Wandstärke signifikant geringer ausfiel. Die Septumdicke ist nur in den Calcineurin-Transgenen Mäusen verdickt, während sie bei CEFIP-Knockout Mäusen fast gleich stark bleibt. Bei beiden Genotypen blieb der linksventrikuläre Diameter unabhängig von der Anwesenheit von CEFIP unverändert. Das Fractional Shortening war bei Calcineurin-Transgenen Mäuse signifikant reduziert, während die zusätzliche Deletion von CEFIP zu einer Verbesserung führte. Die gemessenen hypertrophen Genmarker zeigen jedoch eine starke Expression des Calcineurin-NFAT abhängigen Faktors *Rcan1.4* auf die CEFIP-Deletion bei aktiviertem Calcineurin.

Auch wenn in den letzten Jahren Fortschritte in der Ursachenforschung der kardialen Hypertrophie gemacht wurden, so werden einige Signalwege in ihrer Bedeutung immer noch kontrovers diskutiert und müssen weiter aufgeschlüsselt werden. Die hier erstellten Daten zeigen bisher, dass die Abwesenheit von CEFIP die Calcineurin-induzierte Hypertrophie supprimieren kann, aber auf die durch Isoproterenol oder Druckerhöhung (TAC) vermittelte Hypertrophie keinen Einfluss hat. Gründe hierfür können sowohl die Art als auch die Stärke der Aktivierung der beteiligten Signalwege sein. Isoproterenol aktiviert durch den beta-adrenergen Rezeptor die untergeordneten Signalwege (u.a. Abbildung 4-2; (Bernardo, Weeks et al. 2010; Frank & Frey 2011)), während durch Aortic Banding der „Wandstress“ zunimmt und mittels Stretchsensoren an der Zellmembran und am Sarkomer multiple Signalwege aktiviert werden. Durch mechanischen Stress wie die Erhöhung der Nachlast (aortale Konstriktion) wird über GPCRs eine Vielzahl von Signalwegen wie zum Beispiel der Calcineurin-NFAT-, der MAPK- und der PI3K-Signalwege aktiviert (Akhter, Luttrell et al. 1998; Molkenin & Dorn 2001; Bernardo, Weeks et al. 2010). Hinzu kommt aber auch die Aktivierung der Signalwege durch Stretch-sensitive Ionenkanäle, Rezeptoren und Intergrine, wobei hier der mechanische Stress in ein biochemisches Signal umgewandelt wird und in Folge dessen die pathologischen Signalwege aktiviert (Shai, Harpf et al. 2002; Brancaccio, Fratta et al. 2003). Dies zeigt, dass die Hypertrophieinduktion via aortaler Konstriktion durch keinen einzelnen spezifischen Signalweg oder durch spezifische Rezeptoren erfolgt. Demnach sind auch die pathophysiologischen Konsequenzen wie Zelldifferenzierung, Zellmigration, Entzündungen oder Apoptose breit gefächert (Li & Xu 2007; Bernardo, Weeks et al. 2010). Isoproterenol hingegen aktiviert als  $\beta$ -Adrenorezeptor Agonist den  $G_s$ -gekoppelten Rezeptor an der Zellmembran und führt hauptsächlich über Bildung von cAMP zur Aktivierung der Protein Kinase A (PKA). Über weitere Phosphorylierung erhöht sich bei den spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanälen in der Membran die Öffnungswahrscheinlichkeit. Durch den vermehrten  $Ca^{2+}$ -Einstrom bindet Calmodulin an Calcineurin, wodurch Calcineurin eine Konformationsänderung erfährt und so NFAT dephosphorylieren kann. NFAT transloziert in den Zellkern und interagiert dort mit Transkriptionsfaktoren. Des Weiteren kann die PKA auch die Aktivierung des MEK1/2-Signalweges induzieren (Molkenin & Dorn 2001). Durch spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptoren bewirkt die  $\beta$ -adrenerge Stimulation mittels Isoproterenol direkte Signalwege. Bei beiden Modellen (TAC und Isoproterenol) wird der Calcineurin-NFAT Signalweg mit aktiviert, jedoch auch andere hypertrophieauslösende Signalwege. In den Calcineurin-Transgenen Mäusen wird konstitutiv aktives Calcineurin unter Kontrolle des  $\alpha$ -MHC-Promotors exprimiert, der für eine spezifische und hohe Expression der Phosphatase sorgt. In diesem Modell ist der Signalweg bereits ständig aktiviert und muss nicht über Rezeptoren und Signalproteine induziert werden. Damit wird sich alleinig auf den „downstream“ verlaufenden Signalweg konzentriert. Diese

Überexpression ist gefolgt von einer enormen Hypertrophie und schließlich Herzversagen. Da die CnA-TG/CEFIP-KO Tiere in einem Alter von 9 Wochen untersucht werden, liegt hier noch das Stadium der Hypertrophie vor. Als Marker für die ausgelöste Hypertrophie in allen Versuchen werden zum Beispiel *Nppa*, welches das Atriale Natriuretische Peptid und *Nppb*, welches das „Brain“ Natriuretische Peptid kodiert, gemessen. Beide sind fetal exprimiert und werden mit Ausbildung einer Hypertrophie wieder aktiviert (Sergeeva & Christoffels 2013; Sergeeva, Hooijkaas et al. 2014).

#### **4.6 Einfluss von CEFIP auf den aktivierten Calcineurin-NFAT Signalweg**

*In vitro* konnte gezeigt werden, dass bei Induktion von CEFIP die Kardiomyozyten mit einer verstärkten hypertrophen Antwort auf verschiedene Stimuli reagieren. Besonders ist die Induktion des NFAT-Luciferase-Reporters zu erwähnen. Die Herunterregulation von endogenem CEFIP mittels miRNA führt zu dem genau gegenteiligen Effekt.

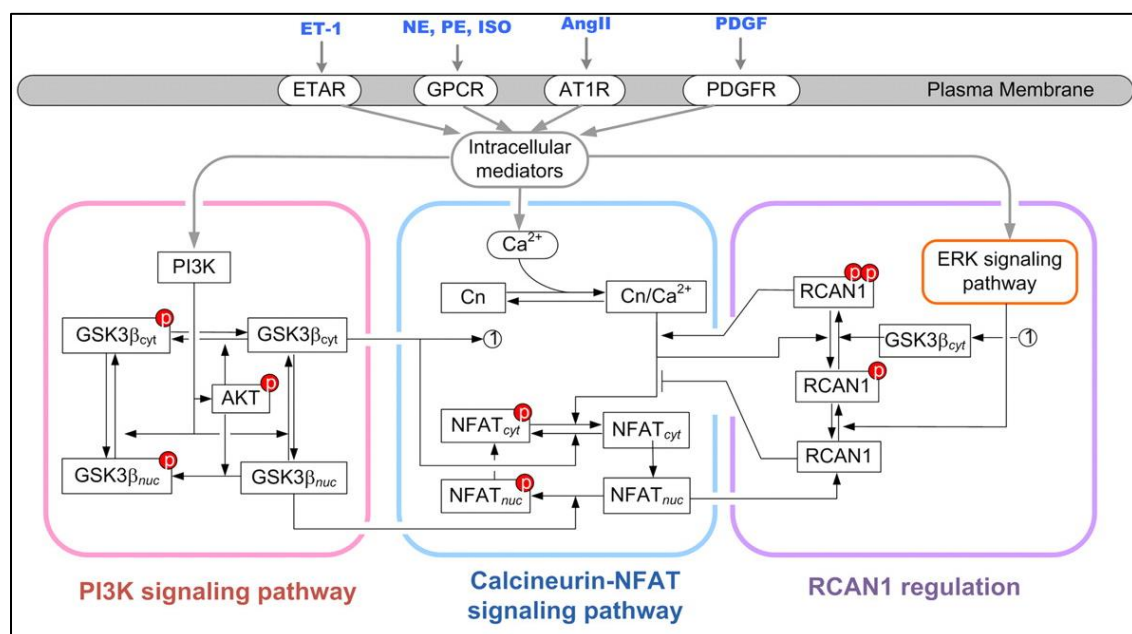
*In vivo*-Experimente zeigen, dass die Abwesenheit von CEFIP unter Normalbedingungen dennoch eine Aktivierung der hypertrophen Marker im Erwachsenenalter fördert. Eine Hypertrophie auf der Organebene kann aber nicht dokumentiert werden. In Stressmodellen wie TAC oder chronischer Isoproterenolstimulation haben die CEFIP-Knockout Tiere, wie bereits in den *in vitro* Analysen vermutet, keinen Vorteil im Vergleich zu C57BL/6N Mäusen, in welchen die Hypertrophie weniger ausgeprägt ist, jedoch auch keinen eindeutigen Nachteil.

Werden sie jedoch mit Calcineurin-Transgenen Mäusen gekreuzt, welche kardial eine sehr hohe Calcineurinexpression induzieren, können die CEFIP-Knockout Tiere die hypertrophe Antwort mildern. Dies zeigt sich durch ein gesteigertes Fractional Shortening, geringere Herz-/Körpergewicht-Ratio und normale Wanddicken im Alter von 9 Wochen. CEFIP-KO Tiere scheinen einen Vorteil im Calcineurin-TG Hintergrund zu haben. Jedoch spiegeln sich diese Daten nicht in der Überlebensdauer wieder. 50 % der Calcineurin-Transgenen Tiere sind mit durchschnittlich 100 Tagen auf Grund von dilatativer Kardiomyopathie und Herzversagen verstorben. Ebenfalls erreichen CnA/CEFIP-KO mit circa 125 Tagen ein ähnliches Durchschnittsalter wie die Calcineurin-TG, was die Hypothese aufkommen lässt, dass die Abwesenheit von CEFIP nur zu einer Verzögerung der Calcineurin-induzierten Hypertrophie führt.

Im Gegensatz zum „Knockdown“ von CEFIP mittels einer synthetischen micro-RNA in isolierten Kardiomyozyten aus neugeborenen Ratten führt der komplette „Knockout“ in Kardiomyozyten aus neugeborenen CEFIP-KO Mäusen dazu, dass die NFAT-Luciferase-Aktivität nicht ab-, sondern zunimmt. Begleitet wird dieser Effekt von einer Aktivierung der

hypertrophen Genmarker. In der Zellkultur wird durch zugeführtes, konstitutiv aktives Calcineurin diese Antwort sogar noch verstärkt, was sich kongruent zu den Daten aus dem Tiermodell verhält. Allerdings nimmt das Herzgewicht durch die Defizienz von CEFIP im Tiermodell unter Calcineurin-Einfluss nicht weiter zu, sondern sogar ab. Dies spricht für eine nicht so stark ausgeprägte Hypertrophie im Vergleich zu den Calcineurin-Transgenen Tieren, was auch durch die Parameter der Wandstärken bestätigt wird.

Aufgrund der hohen mRNA-Spiegel von *Rcan1.4* könnte man hier einen Effekt der negativen Rückkopplung von RCAN1.4 vermuten. Einerseits wird RCAN1.4 durch NFAT induziert und deshalb auch gerne als endogener Indikator für die Aktivität des Calcineurin-NFAT Signalweges herangezogen (Yang, Rothermel et al. 2000; Rothermel, McKinsey et al. 2001; Vega, Rothermel et al. 2003). Andererseits führt die gesteigerte Bildung von RCAN1.4 dazu, dass es aus dem Nukleus hinaus transloziert wird, dort direkt an die katalytische Domäne des Calcineurin A bindet und somit zur Suppression der Hypertrophie beiträgt (Yang, Rothermel et al. 2000). Die genaue Funktion von *Rcan1.4* wird noch diskutiert, da zwar bewiesen werden konnte, dass es sich hier um ein Zielgen von NFAT handelt, aber es in verschiedenen Versuchen sowohl eine inhibitorische als auch aktivierende Rollen gezeigt hat (Vega, Rothermel et al. 2003; Sanna, Brandt et al. 2006). Diese gegenteiligen Effekte scheinen dosisabhängig zu sein (Shin, Yang et al. 2011).



**Abbildung 4–2: Calcineurin-NFAT Signalweg**

Darstellung der Komplexität der einzelnen Mediatoren im Calcineurin-NFAT Signalweg (Shin, Yang et al. 2011).

Da die hohe Expression von Calcineurin in den CnA-TG/CEFIP-KO anhält, führt es über den längeren Zeitraum (hier 125 Tage) zur Dilatation der Ventrikel und schließlich zum Herzversagen. Es ist zusätzlich zu berücksichtigen, dass auch die Calcineurin-Transgenen Mäuse über eine erhöhte *Rcan1.4*-Aktivität verfügen bzw. auch hier die Calcineurinaktivität maximal ist. Um die Hypothese der nur verzögerten Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie zu bestätigen, könnte eine Wiederholung der Versuche mit älteren CEFIP-Knockout Mäusen im Calcineurin-Transgenen Hintergrund geführt werden, wobei die Zeitpunkte und die Expression von Calcineurin ebenfalls verfolgt werden müssen. Nur so ist auch eine Aussage über die Ausbildung der Hypertrophie und dilatativen Kardiomyopathien in den CnA-TG/CEFIP-KO Mäusen möglich.

Es kommen natürlich auch weitere Faktoren des Calcineurin-NFAT Signalweges in Betracht. Calcineurin wird hauptsächlich durch einen erhöhten intrazellulären Calciumspiegel aktiviert. Calcium bindet an Calmodulin, was zu einer Konformationsänderung von Calcineurin führt (Frey, Katus et al. 2004). „Downstream“ von Calcineurin befinden sich viele Regulatoren des Calcineurin-NFAT Signalweges, wie zum Beispiel RCAN2, MuRF1, FHL2, CHP1 (calcineurin B homologes protein 1), welche meist direkt mit Calcineurin interagieren (Wilkins & Molkentin 2004; Frank & Frey 2011; Maejima, Usui et al. 2014; Gao & Wang 2016). Eines der wenigen Proteine, das mit einem negativen Feedback gekoppelt ist, ist RCAN1, da es direkt durch Calcineurin-NFAT transkribiert wird (Vega, Bassel-Duby et al. 2003). Ein weiterer negativer Feedback-Regulator ist Carabin (EPI64C), welcher T-Zell vermittelt Calcineurin sowohl „upstream“ inhibieren als auch „downstream“ induzieren kann (Pan, Sun et al. 2007). *In vitro* Überexpressionsversuche zeigen, dass CEFIP ebenfalls den Calcineurin-NFAT Signalweg aktiviert. Dieser Signalweg wird durch diverse pathologische Stimuli wie auch aortale Konstriktion und  $\alpha$ -adrenerge Agonisten wie zum Beispiel Phenylephrin induziert. Überexpression von CEFIP führte zu Steigerung der gemessenen Hypertrophiemarkern, während die Herunterregulation von CEFIP mittels synthetischer miRNA zur Abschwächung der Phenylephrin-induzierten Hypertrophie führte. Dies konnte in Luciferase-Versuchen unter Aktivierung mittels konstitutiv aktivem Calcineurin ebenfalls bestätigt werden. CEFIP ist ebenfalls ein Regulator von Calcineurin (Dierck, Kuhn et al. 2017). Auch der Interaktionspartner FHL2 muss genauer betrachtet werden, da FHL2 direkter Bindungspartner von Calcineurin ist und auch in der Regulation der Hypertrophie eine Rolle spielt. *In vitro* Versuche mit CEFIP und FHL2 ergaben, dass CEFIP und FHL2 nicht linear miteinander agieren, aber beide am „fine tuning“ von Calcineurin beteiligt sind (Hojayev, Rothermel et al. 2012; Dierck, Kuhn et al. 2017). Fehlt nun eine Komponente, könnte dies die Regulation verändern bzw. beeinflussen. Die Abwesenheit von CEFIP in den Mäusen könnte somit auch dazu führen, dass FHL2 anfangs seine inhibierende Wirkung auf Calcineurin ausüben kann, aber durch die maximale Aktivierung des konstitutiven aktiven



Calcineurin letztendlich die Induktion der Hypertrophie und Ausbildung der dilatativen Kardiomyopathie nicht mehr verhindern kann.

#### **4.7 *In vitro* vs. *in vivo* Ergebnisse**

*In vitro* zeigt die Abwesenheit von CEFIP eine deutliche Vermeidung der Hypertrophieinduktion auf unterschiedlichen Wegen. Herunterregulation mittels miRNA vermag nicht nur die Hypertrophieinduktion durch Phenylephrin sondern auch die Aktivierung der Hypertrophie durch konstitutiv aktives Calcineurin zu inhibieren. *In vivo* jedoch hat die CEFIP-Deletion auf beta-adrenergen Stimulus via chronischer Isoproterenolgabe keinen positiven Effekt. Die Kreuzung mit Calcineurin-Transgenen Mäusen führte morphologisch und echokardiographisch zu einer signifikanten Verbesserung bei CEFIP-Deletion, jedoch überlebten die Tiere dadurch nicht länger. Dieser Unterschied zwischen den Modellen kann viele Gründe haben. Zunächst ist die Art der CEFIP-Regulation wichtig. In neonatalen Kardiomyozyten wird CEFIP adenoviral mit einer synthetischen miRNA endogen herunterreguliert. Dieser Effekt beträgt sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene 80 %. Die CEFIP-Knockout Tiere besitzen eine komplette Deletion des kodierenden Exons 4 und dies nicht nur kardiospezifisch sondern im gesamten Organismus. Des Weiteren werden die Tierversuche in einem Alter von circa 8 Wochen bis hin zu einem Alter von 1,5 Jahren durchgeführt. Bei den Kardiomyozyten handelt es sich um neonatale noch nicht differenzierte Zellen, welche aus Ratten in einem Alter von 1-3 Tagen isoliert werden. Um diesen Fehler möglichst minimal zu halten, wurden die Luciferase-Versuche nochmals mit isolierten neonatalen Kardiomyozyten aus CEFIP-Knockout oder C57BL/6N durchgeführt. Diese Versuche zeigten ähnliche Ergebnisse wie die *in vivo*-Daten. Vermutlich ist der Unterschied zwischen reduzierter CEFIP-Expression und vollständiger CEFIP-Deletion entscheidend. Um dieser feinen Regulation nachzukommen, wären Versuche mit heterozygoten CEFIP-Knockout Mäusen möglich. Somit könnte auch der Frage nachgegangen werden, ob es vielleicht je nach Expressionsniveau zu unterschiedlich starken Aktivierungen oder sogar Inhibierungen des Calcineurin-NFAT Signalweges, wie auch schon bei RCAN1.4 oder Erbin, kommen könnte (Yang, Rothermel et al. 2000; Rachmin, Tshori et al. 2014).



## 5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte ein neues Protein an der Z-Scheibe vorgestellt werden und somit zur weiteren Entschlüsselung der Zusammensetzung der Z-Scheibe beitragen. CEFIP ist herz- und skelettmuskulaturspezifisch exprimiert und an der Z-Scheibe lokalisiert. Der Vergleich der Proteinsequenzen zwischen unterschiedlichen Spezies zeigt eine hohe evolutionäre Konservierung. Besonders die Regulation in Modellen von Hypertrophie und Kardiomyopathien weisen auf eine klinische Relevanz hin. Obwohl CEFIP mit 230 kDa ein großes Protein im Herzen ist, zeigt es eine hohe Dynamik und einen eindeutigen Einfluss in der Regulation der Hypertrophie in Kardiomyozyten.

Besonders wichtig erscheint auch die Interaktion mit dem bekannten Four and a Half Lim domains Protein 2 (FHL2). Da Mutationen von FHL2 in humanen Proben von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie publiziert sind, ist es notwendig ebenfalls für CEFIP eine Mutations-Screen durchzuführen. Die Erkenntnisse daraus könnten helfen die Funktion von CEFIP in Kardiomyopathien zu entschlüsseln. Für eine genauere Charakterisierung von CEFIP wären jedoch auch weitere Charakterisierungen anderer Interaktionspartner und deren Regulation hilfreich. Aus dem durchgeführten Y2H-Screen sind einige potentielle Bindungspartner und ihre Interaktion mit CEFIP noch nicht vollständig aufgeklärt. Dies könnte die Rolle von CEFIP noch genauer definieren und ergänzen bzw. noch nicht untersuchte Mechanismen, wie zum Beispiel mit HSP27 (heat shock protein 27), aufdecken. HSP27 ist in humanen DCM-Patientenproben stark exprimiert und zeigt als Chaperon eine kardioprotektive Funktion (Knowlton, Kapadia et al. 1998; Willis & Patterson 2010). Hohe Level an HSP27 sollen jedoch ebenfalls zur Entstehung von Kardiomyopathien beitragen (Bauersachs & Widder 2010; Zhang, Min et al. 2010).

Patienten mit dilatativer oder ischämischer Kardiomyopathie zeigen erhöhte CEFIP-Spiegel. Somit könnte in der Regulierung von CEFIP ein weiterer Ansatz in der Therapie von Kardiomyopathien liegen.

Die Generierung einer CEFIP-Knockout Maus, welche im gesamten Organismus CEFIP nicht mehr exprimiert, führte zur Erkenntnis, dass CEFIP in der fötalen Entwicklung und im Strukturaufbau des Herzens keine tragende Rolle spielt. *In vivo* Experimente mit CEFIP-Knockout Tieren ergaben erste Hinweise auf eine Rolle in der Vermeidung oder Verzögerung der Hypertrophieausbildung bei aktiviertem Calcineurin-NFAT Signalweg. Hier wäre eine weitere Möglichkeit zur Bewertung der Funktion von CEFIP die Untersuchung von der Überexpression von CEFIP im Organismus. Da es sich bei CEFIP jedoch um ein relativ großes Protein handelt, wäre eine Generierung einer transgenen Maus, die herzspezifisch CEFIP überexprimiert, oder eine Überexpression mittels eines spezifischen adeno-assoziierten Virus (AAV) schwierig oder nur mit Teilkonstrukten möglich. AAVs können individuell modifiziert, auch mit möglichen Mutationskonstrukten oder inaktivierten

Phosphositekonstrukten, und herzspezifisch (AAV9) in Wildtypmäuse injiziert werden, um somit die Notwendigkeit von CEFIP für die Hypertrophieinduktion zu ermitteln. Die Charakterisierung der heterozygoten CEFIP-Knockout Maus könnte jedoch Aufschluss über mögliche Effekte auf den Calcineurin-NFAT Signalweg durch unterschiedliche CEFIP-Expressionsniveaus bringen.

Durch Phosphoproteomstudien konnten potentielle Phosphorylierungsstellen aufgedeckt werden und erste *in vitro* Versuche zeigen, dass diese für eine gesteigerte Luciferase-Induktion aktiviert sein müssen. Jedoch konnten über die zuständige Kinase bisher nur Vermutungen angestellt werden. CEFIP könnte ein Ziel für die beta-adrenerge Rezeptor kinase ( $\beta$ ARK) oder die Caseinkinase II sein. Auch die Tatsache, dass nicht beide Stellen aktiviert sein müssen, um die vollständige Funktion zu erreichen, müsste mit Hilfe der Kinase erforscht werden.

## 6 Literatur

- Akhter, S. A., L. M. Luttrell, H. A. Rockman, G. Iaccarino, R. J. Lefkowitz & W. J. Koch (1998). "Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy." Science 280(5363): 574-577.
- Alcalai, R., J. G. Seidman & C. E. Seidman (2008). "Genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy: from bench to the clinics." J Cardiovasc Electrophysiol 19(1): 104-110.
- Arbustini, E., N. Narula, G. W. Dec, K. S. Reddy, B. Greenberg, S. Kushwaha, T. Marwick, S. Pinney, R. Bellazzi, V. Favalli, C. Kramer, R. Roberts, W. A. Zoghbi, R. Bonow, L. Tavazzi, V. Fuster & J. Narula (2013). "The MOGE(S) Classification for a Phenotype-Genotype Nomenclature of Cardiomyopathy: Endorsed by the World Heart Federation." Glob Heart 8(4): 355-382.
- Arimura, T., Y. Matsumoto, O. Okazaki, T. Hayashi, M. Takahashi, N. Inagaki, K. Hinohara, N. Ashizawa, K. Yano & A. Kimura (2007). "Structural analysis of obscurin gene in hypertrophic cardiomyopathy." Biochem Biophys Res Commun 362(2): 281-287.
- Barcelos, A., C. Ambrosio, J. A. Pereira da Silva, S. McKenna, J. Wilburn & P. Lopes Ferreira (2017). "Psoriatic Arthritis Quality of Life questionnaire: translation, cultural adaptation and validation into Portuguese language." Rheumatol Int.
- Bauersachs, J. & J. D. Widder (2010). "Reductive stress: linking heat shock protein 27, glutathione, and cardiomyopathy?" Hypertension 55(6): 1299-1300.
- Beals, C. R., C. M. Sheridan, C. W. Turck, P. Gardner & G. R. Crabtree (1997). "Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3." Science 275(5308): 1930-1934.
- Bernardo, B. C., K. L. Weeks, L. Pretorius & J. R. McMullen (2010). "Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies." Pharmacol Ther 128(1): 191-227.
- Bonneux, L., J. J. Barendregt, K. Meeter, G. J. Bonsel & P. J. van der Maas (1994). "Estimating clinical morbidity due to ischemic heart disease and congestive heart failure: the future rise of heart failure." Am J Public Health 84(1): 20-28.
- Brancaccio, M., L. Fratta, A. Notte, E. Hirsch, R. Poulet, S. Guazzone, M. De Acetis, C. Vecchione, G. Marino, F. Altruda, L. Silengo, G. Tarone & G. Lembo (2003). "Melusin, a muscle-specific integrin beta1-interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload." Nat Med 9(1): 68-75.
- Bueno, O. F., L. J. De Windt, K. M. Tymitz, S. A. Witt, T. R. Kimball, R. Klevitsky, T. E. Hewett, S. P. Jones, D. J. Lefer, C. F. Peng, R. N. Kitsis & J. D. Molkentin (2000). "The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice." EMBO J 19(23): 6341-6350.

- Bueno, O. F., E. van Rooij, J. D. Molkenin, P. A. Doevendans & L. J. De Windt (2002). "Calcineurin and hypertrophic heart disease: novel insights and remaining questions." Cardiovasc Res 53(4): 806-821.
- Bueno, O. F., B. J. Wilkins, K. M. Tymitz, B. J. Glascock, T. F. Kimball, J. N. Lorenz & J. D. Molkenin (2002). "Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta -deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A 99(7): 4586-4591.
- Bundesamt, S. (2016). "Vollstationär behandelte Patientinnen und Patienten (einschließlich Sterbe- und Stundenfälle) in Krankenhäusern nach der ICD-10 im Jahr 2016." Retrieved 14.02.2018.
- Bundesamt, S. (2017). "Sterbefälle 2015 nach den 10 häufigsten Todesursachen der ICD-10." Abrufdatum 14.02.2018.
- Bundesärztekammer (BÄK), K. B. K., Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). (2017). " Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische Herzinsuffizienz–Langfassung, DOI: 10.6101/AZQ/000390. ." 2. Auflage. Version 2. Retrieved 14.02.2017.
- Burkard, N., J. Becher, C. Heindl, L. Neyses, K. Schuh & O. Ritter (2005). "Targeted proteolysis sustains calcineurin activation." Circulation 111(8): 1045-1053.
- Cantley, L. C. (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway." Science 296(5573): 1655-1657.
- Chan, K. K., S. K. Tsui, S. M. Lee, S. C. Luk, C. C. Liew, K. P. Fung, M. M. Waye & C. Y. Lee (1998). "Molecular cloning and characterization of FHL2, a novel LIM domain protein preferentially expressed in human heart." Gene 210(2): 345-350.
- Chien, K. R., K. U. Knowlton, H. Zhu & S. Chien (1991). "Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response." FASEB J 5(15): 3037-3046.
- Chu, P. H., W. M. Bardwell, Y. Gu, J. Ross, Jr. & J. Chen (2000). "FHL2 (SLIM3) is not essential for cardiac development and function." Mol Cell Biol 20(20): 7460-7462.
- da Silva Lopes, K., A. Pietas, M. H. Radke & M. Gotthardt (2011). "Titin visualization in real time reveals an unexpected level of mobility within and between sarcomeres." J Cell Biol 193(4): 785-798.
- Dellefave, L. & E. M. McNally (2010). "The genetics of dilated cardiomyopathy." Curr Opin Cardiol 25(3): 198-204.
- Dierck, F., C. Kuhn, C. Rohr, S. Hille, J. Braune, S. Sossalla, S. Molt, P. F. M. van der Ven, D. O. Furst & N. Frey (2017). "The novel cardiac z-disc protein CEFIP regulates cardiomyocyte hypertrophy by modulating calcineurin signaling." J Biol Chem 292(37): 15180-15191.

- Elliott, P., B. Andersson, E. Arbustini, Z. Bilinska, F. Cecchi, P. Charron, O. Dubourg, U. Kuhl, B. Maisch, W. J. McKenna, L. Monserrat, S. Pankuweit, C. Rapezzi, P. Seferovic, L. Tavazzi & A. Keren (2008). "Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases." Eur Heart J 29(2): 270-276.
- Fingar, D. C., S. Salama, C. Tsou, E. Harlow & J. Blenis (2002). "Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E." Genes Dev 16(12): 1472-1487.
- Flick, M. J. & S. F. Konieczny (2000). "The muscle regulatory and structural protein MLP is a cytoskeletal binding partner of beta-spectrin." J Cell Sci 113 ( Pt 9): 1553-1564.
- Frank, D., R. Frauen, C. Hanselmann, C. Kuhn, R. Will, J. Gantenberg, L. Fuzesi, H. A. Katus & N. Frey (2010). "Lmcd1/Dyxin, a novel Z-disc associated LIM protein, mediates cardiac hypertrophy in vitro and in vivo." J Mol Cell Cardiol 49(4): 673-682.
- Frank, D. & N. Frey (2011). "Cardiac Z-disc signaling network." J Biol Chem 286(12): 9897-9904.
- Frank, D., C. Kuhn, H. A. Katus & N. Frey (2006). "The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease." J Mol Med (Berl) 84(6): 446-468.
- Frank, D., C. Kuhn, H. A. Katus & N. Frey (2007). "Role of the sarcomeric Z-disc in the pathogenesis of cardiomyopathy." Future Cardiol 3(6): 611-622.
- Frank, D., C. Kuhn, M. van Eickels, D. Gehring, C. Hanselmann, S. Lippl, R. Will, H. A. Katus & N. Frey (2007). "Calsarcin-1 protects against angiotensin-II induced cardiac hypertrophy." Circulation 116(22): 2587-2596.
- Frey, N., T. Barrientos, J. M. Shelton, D. Frank, H. Rutten, D. Gehring, C. Kuhn, M. Lutz, B. Rothermel, R. Bassel-Duby, J. A. Richardson, H. A. Katus, J. A. Hill & E. N. Olson (2004). "Mice lacking calsarcin-1 are sensitized to calcineurin signaling and show accelerated cardiomyopathy in response to pathological biomechanical stress." Nat Med 10(12): 1336-1343.
- Frey, N. & H. A. Katus (2008). "[Dilated cardiomyopathy as a genetic disease: molecular and clinical aspects]." Internist (Berl) 49(1): 43-50.
- Frey, N., H. A. Katus, E. N. Olson & J. A. Hill (2004). "Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target?" Circulation 109(13): 1580-1589.
- Frey, N. & E. N. Olson (2002). "Calsarcin-3, a novel skeletal muscle-specific member of the calsarcin family, interacts with multiple Z-disc proteins." J Biol Chem 277(16): 13998-14004.
- Frey, N. & E. N. Olson (2003). "Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly." Annu Rev Physiol 65: 45-79.

- Frey, N., J. A. Richardson & E. N. Olson (2000). "Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins." Proc Natl Acad Sci U S A 97(26): 14632-14637.
- Friedrich, F. W. & L. Carrier (2012). "Genetics of hypertrophic and dilated cardiomyopathy." Curr Pharm Biotechnol 13(13): 2467-2476.
- Friedrich, F. W., S. Reischmann, A. Schwalm, A. Unger, D. Ramanujam, J. Munch, O. J. Muller, C. Hengstenberg, E. Galve, P. Charron, W. A. Linke, S. Engelhardt, M. Patten, P. Richard, J. van der Velden, T. Eschenhagen, R. Isnard & L. Carrier (2014). "FHL2 expression and variants in hypertrophic cardiomyopathy." Basic Res Cardiol 109(6): 451.
- Gao, C. & Y. Wang (2016). "Positive Role for a Negative Calcineurin Regulator in Cardiac Hypertrophy." Hypertension 67(5): 841-842.
- Garrington, T. P. & G. L. Johnson (1999). "Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways." Curr Opin Cell Biol 11(2): 211-218.
- Goldstein, M. A., L. H. Michael, J. P. Schroeter & R. L. Sass (1989). "Two structural states of Z-bands in cardiac muscle." Am J Physiol 256(2 Pt 2): H552-559.
- Grunig, E., J. A. Tasman, H. Kucherer, W. Franz, W. Kubler & H. A. Katus (1998). "Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy." J Am Coll Cardiol 31(1): 186-194.
- Guerini, D., C. Montell & C. B. Klee (1992). "Molecular cloning and characterization of the genes encoding the two subunits of *Drosophila melanogaster* calcineurin." J Biol Chem 267(31): 22542-22549.
- Haq, S., G. Choukroun, H. Lim, K. M. Tymitz, F. del Monte, J. Gwathmey, L. Grazette, A. Michael, R. Hajjar, T. Force & J. D. Molkentin (2001). "Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure." Circulation 103(5): 670-677.
- Heineke, J. & J. D. Molkentin (2006). "Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways." Nat Rev Mol Cell Biol 7(8): 589-600.
- Heineke, J. & O. Ritter (2012). "Cardiomyocyte calcineurin signaling in subcellular domains: from the sarcolemma to the nucleus and beyond." J Mol Cell Cardiol 52(1): 62-73.
- Heineke, J., H. Ruetten, C. Willenbockel, S. C. Gross, M. Naguib, A. Schaefer, T. Kempf, D. Hilfiker-Kleiner, P. Caroni, T. Kraft, R. A. Kaiser, J. D. Molkentin, H. Drexler & K. C. Wollert (2005). "Attenuation of cardiac remodeling after myocardial infarction by muscle LIM protein-calcineurin signaling at the sarcomeric Z-disc." Proc Natl Acad Sci U S A 102(5): 1655-1660.
- Hill, C. S., J. Wynne & R. Treisman (1995). "The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF." Cell 81(7): 1159-1170.



- Hiramitsu, S.&H. Hishida (2007). "[Management of chronic heart failure]." Nihon Rinsho 65 Suppl 4: 494-497.
- Ho, C. Y., P. Charron, P. Richard, F. Girolami, K. Y. Van Spaendonck-Zwarts&Y. Pinto (2015). "Genetic advances in sarcomeric cardiomyopathies: state of the art." Cardiovasc Res 105(4): 397-408.
- Hojayev, B., B. A. Rothermel, T. G. Gillette&J. A. Hill (2012). "FHL2 binds calcineurin and represses pathological cardiac growth." Mol Cell Biol 32(19): 4025-4034.
- Johannessen, M., S. Moller, T. Hansen, U. Moens&M. Van Ghelue (2006). "The multifunctional roles of the four-and-a-half-LIM only protein FHL2." Cell Mol Life Sci 63(3): 268-284.
- Johansen, F. E.&R. Prywes (1994). "Two pathways for serum regulation of the c-fos serum response element require specific sequence elements and a minimal domain of serum response factor." Mol Cell Biol 14(9): 5920-5928.
- Kensler, R. W., J. F. Shaffer&S. P. Harris (2011). "Binding of the N-terminal fragment C0-C2 of cardiac MyBP-C to cardiac F-actin." J Struct Biol 174(1): 44-51.
- Klee, C. B., H. Ren&X. Wang (1998). "Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin." J Biol Chem 273(22): 13367-13370.
- Knoll, R., M. Hoshijima&K. R. Chien (2002). "Muscle LIM protein in heart failure." Exp Clin Cardiol 7(2-3): 104-105.
- Knowlton, A. A., S. Kapadia, G. Torre-Amione, J. B. Durand, R. Bies, J. Young&D. L. Mann (1998). "Differential expression of heat shock proteins in normal and failing human hearts." J Mol Cell Cardiol 30(4): 811-818.
- Kong, Y., J. M. Shelton, B. Rothermel, X. Li, J. A. Richardson, R. Bassel-Duby&R. S. Williams (2001). "Cardiac-specific LIM protein FHL2 modifies the hypertrophic response to beta-adrenergic stimulation." Circulation 103(22): 2731-2738.
- Kruger, M.&W. A. Linke (2009). "Titin-based mechanical signalling in normal and failing myocardium." J Mol Cell Cardiol 46(4): 490-498.
- Kuhn, C., D. Frank, F. Dierck, U. Oehl, J. Krebs, R. Will, L. H. Lehmann, J. Backs, H. A. Katus&N. Frey (2012). "Cardiac remodeling is not modulated by overexpression of muscle LIM protein (MLP)." Basic Res Cardiol 107(3): 262.
- Kuhn, C., D. Frank, R. Will, C. Jaschinski, R. Frauen, H. A. Katus&N. Frey (2009). "DYRK1A is a novel negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy." J Biol Chem 284(25): 17320-17327.
- Kuwahara, K.&K. Nakao (2011). "New molecular mechanisms for cardiovascular disease:transcriptional pathways and novel therapeutic targets in heart failure." J Pharmacol Sci 116(4): 337-342.

- Lai, M. M., P. E. Burnett, H. Wolosker, S. Blackshaw & S. H. Snyder (1998). "Cain, a novel physiologic protein inhibitor of calcineurin." J Biol Chem 273(29): 18325-18331.
- Laufs, U., S. Anker, S. Baldus, C. Birner, V. Falk, C. Perings & B. Pieske (2016). "Pocket-Leitlinie: Herzinsuffizienz (Version 2016)." European Heart Journal doi: 10.1093/eurheartj/ehw1128.
- Leber, Y., A. A. Ruparel, G. Kirfel, P. F. M. van der Ven, B. Hoffmann, R. Merkel, R. J. Bryson-Richardson & D. O. Furst (2016). "Filamin C is a highly dynamic protein associated with fast repair of myofibrillar microdamage." Hum Mol Genet 25(13): 2776-2788.
- Levy, D., R. J. Garrison, D. D. Savage, W. B. Kannel & W. P. Castelli (1990). "Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study." N Engl J Med 322(22): 1561-1566.
- Li, C. & Q. Xu (2007). "Mechanical stress-initiated signal transduction in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo." Cell Signal 19(5): 881-891.
- Luther, P. K. (2009). "The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling." J Muscle Res Cell Motil 30(5-6): 171-185.
- Maejima, Y., S. Usui, P. Zhai, M. Takamura, S. Kaneko, D. Zablocki, M. Yokota, M. Isobe & J. Sadoshima (2014). "Muscle-specific RING finger 1 negatively regulates pathological cardiac hypertrophy through downregulation of calcineurin A." Circ Heart Fail 7(3): 479-490.
- Manning, B. D. & L. C. Cantley (2007). "AKT/PKB signaling: navigating downstream." Cell 129(7): 1261-1274.
- Marian, A. J. (2006). "Beta-adrenergic receptors signaling and heart failure in mice, rabbits and humans." J Mol Cell Cardiol 41(1): 11-13.
- Marian, A. J. & E. Braunwald (2017). "Hypertrophic Cardiomyopathy: Genetics, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Therapy." Circ Res 121(7): 749-770.
- Maron, B. J., J. A. Towbin, G. Thiene, C. Antzelevitch, D. Corrado, D. Arnett, A. J. Moss, C. E. Seidman & J. B. Young (2006). "Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention." Circulation 113(14): 1807-1816.
- McCartan, C., R. Mason, S. R. Jayasinghe & L. R. Griffiths (2012). "Cardiomyopathy classification: ongoing debate in the genomics era." Biochem Res Int 2012: 796926.
- McKenna, W. J., B. J. Maron & G. Thiene (2017). "Classification, Epidemiology, and Global Burden of Cardiomyopathies." Circ Res 121(7): 722-730.

- McKinsey, T. A. & E. N. Olson (1999). "Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry." Curr Opin Genet Dev 9(3): 267-274.
- McMullen, J. R., M. C. Sherwood, O. Tarnavski, L. Zhang, A. L. Dorfman, T. Shioi & S. Izumo (2004). "Inhibition of mTOR signaling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload." Circulation 109(24): 3050-3055.
- McNally, E. M., D. Y. Barefield & M. J. Puckelwartz (2015). "The genetic landscape of cardiomyopathy and its role in heart failure." Cell Metab 21(2): 174-182.
- Miano, J. M. (2010). "Role of serum response factor in the pathogenesis of disease." Lab Invest 90(9): 1274-1284.
- Molkentin, J. D. & G. W. Dorn, 2nd (2001). "Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy." Annu Rev Physiol 63: 391-426.
- Molkentin, J. D., J. R. Lu, C. L. Antos, B. Markham, J. Richardson, J. Robbins, S. R. Grant & E. N. Olson (1998). "A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy." Cell 93(2): 215-228.
- Molt, S., J. B. Buhrdel, S. Yakovlev, P. Schein, Z. Orfanos, G. Kirfel, L. Winter, G. Wiche, P. F. van der Ven, W. Rottbauer, S. Just, A. M. Belkin & D. O. Furst (2014). "Aciculin interacts with filamin C and Xin and is essential for myofibril assembly, remodeling and maintenance." J Cell Sci 127(Pt 16): 3578-3592.
- Morisco, C., K. Seta, S. E. Hardt, Y. Lee, S. F. Vatner & J. Sadoshima (2001). "Glycogen synthase kinase 3beta regulates GATA4 in cardiac myocytes." J Biol Chem 276(30): 28586-28597.
- Morisco, C., D. Zebrowski, G. Condorelli, P. Tschlis, S. F. Vatner & J. Sadoshima (2000). "The Akt-glycogen synthase kinase 3beta pathway regulates transcription of atrial natriuretic factor induced by beta-adrenergic receptor stimulation in cardiac myocytes." J Biol Chem 275(19): 14466-14475.
- Naga Prasad, S. V., G. Esposito, L. Mao, W. J. Koch & H. A. Rockman (2000). "Gbetagamma-dependent phosphoinositide 3-kinase activation in hearts with in vivo pressure overload hypertrophy." J Biol Chem 275(7): 4693-4698.
- Norton, J. M. (2001). "Toward consistent definitions for preload and afterload." Adv Physiol Educ 25(1-4): 53-61.
- Osaki, M., M. Oshimura & H. Ito (2004). "PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer." Apoptosis 9(6): 667-676.
- Osio, A., L. Tan, S. N. Chen, R. Lombardi, S. F. Nagueh, S. Shete, R. Roberts, J. T. Willerson & A. J. Marian (2007). "Myozenin 2 is a novel gene for human hypertrophic cardiomyopathy." Circ Res 100(6): 766-768.

- Pan, F., L. Sun, D. B. Kardan, K. A. Whartenby, D. M. Pardoll & J. O. Liu (2007). "Feedback inhibition of calcineurin and Ras by a dual inhibitory protein Carabin." Nature 445(7126): 433-436.
- Perrino, C., S. V. Naga Prasad, L. Mao, T. Noma, Z. Yan, H. S. Kim, O. Smithies & H. A. Rockman (2006). "Intermittent pressure overload triggers hypertrophy-independent cardiac dysfunction and vascular rarefaction." J Clin Invest 116(6): 1547-1560.
- Ponikowski, P., A. A. Voors, S. D. Anker, H. Bueno, J. G. F. Cleland, A. J. S. Coats, V. Falk, J. R. Gonzalez-Juanatey, V. P. Harjola, E. A. Jankowska, M. Jessup, C. Linde, P. Nihoyannopoulos, J. T. Parissis, B. Pieske, J. P. Riley, G. M. C. Rosano, L. M. Ruilope, F. Ruschitzka, F. H. Rutten & P. van der Meer (2016). "2016 ESC Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure." Rev Esp Cardiol (Engl Ed) 69(12): 1167.
- Porrello, E. R., R. E. Widdop & L. M. Delbridge (2008). "Early origins of cardiac hypertrophy: does cardiomyocyte attrition programme for pathological 'catch-up' growth of the heart?" Clin Exp Pharmacol Physiol 35(11): 1358-1364.
- Purcell, N. H., D. Darwis, O. F. Bueno, J. M. Muller, R. Schule & J. D. Molkentin (2004). "Extracellular signal-regulated kinase 2 interacts with and is negatively regulated by the LIM-only protein FHL2 in cardiomyocytes." Mol Cell Biol 24(3): 1081-1095.
- Rachmin, I., E. Amsalem, E. Golomb, R. Beerli, D. Gilon, P. Fang, H. Nechushtan, G. Kay, M. Guo, P. L. Yiqing, R. S. Foo, D. E. Fisher, E. Razin & S. Tshori (2015). "FHL2 switches MITF from activator to repressor of Erbin expression during cardiac hypertrophy." Int J Cardiol 195: 85-94.
- Rachmin, I., S. Tshori, Y. Smith, A. Oppenheim, S. Marchetto, G. Kay, R. S. Foo, N. Dagan, E. Golomb, D. Gilon, J. P. Borg & E. Razin (2014). "Erbin is a negative modulator of cardiac hypertrophy." Proc Natl Acad Sci U S A 111(16): 5902-5907.
- Ritter, O., S. Hack, K. Schuh, N. Rothlein, A. Perrot, K. J. Osterziel, H. D. Schulte & L. Neyses (2002). "Calcineurin in human heart hypertrophy." Circulation 105(19): 2265-2269.
- Rothermel, B. A., T. A. McKinsey, R. B. Vega, R. L. Nicol, P. Mammen, J. Yang, C. L. Antos, J. M. Shelton, R. Bassel-Duby, E. N. Olson & R. S. Williams (2001). "Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A 98(6): 3328-3333.
- Sanna, B., E. B. Brandt, R. A. Kaiser, P. Pfluger, S. A. Witt, T. R. Kimball, E. van Rooij, L. J. De Windt, M. E. Rothenberg, M. H. Tschop, S. C. Benoit & J. D. Molkentin (2006). "Modulatory calcineurin-interacting proteins 1 and 2 function as calcineurin facilitators in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A 103(19): 7327-7332.
- Schluter, K. D., Y. Goldberg, G. Taimor, M. Schafer & H. M. Piper (1998). "Role of phosphatidylinositol 3-kinase activation in the hypertrophic growth of adult ventricular cardiomyocytes." Cardiovasc Res 40(1): 174-181.

- Scoote, M.&A. J. Williams (2004). "Myocardial calcium signalling and arrhythmia pathogenesis." Biochem Biophys Res Commun 322(4): 1286-1309.
- Seidman, J. G.&C. Seidman (2001). "The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms." Cell 104(4): 557-567.
- Sergeeva, I. A.&V. M. Christoffels (2013). "Regulation of expression of atrial and brain natriuretic peptide, biomarkers for heart development and disease." Biochim Biophys Acta 1832(12): 2403-2413.
- Sergeeva, I. A., I. B. Hooijkaas, I. Van Der Made, W. M. Jong, E. E. Creemers&V. M. Christoffels (2014). "A transgenic mouse model for the simultaneous monitoring of ANF and BNP gene activity during heart development and disease." Cardiovasc Res 101(1): 78-86.
- Shai, S. Y., A. E. Harpf, C. J. Babbitt, M. C. Jordan, M. C. Fishbein, J. Chen, M. Omura, T. A. Leil, K. D. Becker, M. Jiang, D. J. Smith, S. R. Cherry, J. C. Loftus&R. S. Ross (2002). "Cardiac myocyte-specific excision of the beta1 integrin gene results in myocardial fibrosis and cardiac failure." Circ Res 90(4): 458-464.
- Shin, S. Y., H. W. Yang, J. R. Kim, W. D. Heo&K. H. Cho (2011). "A hidden incoherent switch regulates RCAN1 in the calcineurin-NFAT signaling network." J Cell Sci 124(Pt 1): 82-90.
- Shiojima, I., K. Sato, Y. Izumiya, S. Schiekofer, M. Ito, R. Liao, W. S. Colucci&K. Walsh (2005). "Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure." J Clin Invest 115(8): 2108-2118.
- Shore, P.&A. D. Sharrocks (1995). "The MADS-box family of transcription factors." Eur J Biochem 229(1): 1-13.
- Spaich, S., R. D. Will, S. Just, C. Kuhn, D. Frank, I. M. Berger, S. Wiemann, B. Korn, M. Koegl, J. Backs, H. A. Katus, W. Rottbauer&N. Frey (2012). "F-box and leucine-rich repeat protein 22 is a cardiac-enriched F-box protein that regulates sarcomeric protein turnover and is essential for maintenance of contractile function in vivo." Circ Res 111(12): 1504-1516.
- Spirito, P., C. E. Seidman, W. J. McKenna&B. J. Maron (1997). "The management of hypertrophic cardiomyopathy." N Engl J Med 336(11): 775-785.
- Sugden, P. H.&A. Clerk (1998). "Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy." J Mol Med (Berl) 76(11): 725-746.
- Sugden, P. H.&A. Clerk (1998). "Regulation of mitogen-activated protein kinase cascades in the heart." Adv Enzyme Regul 38: 87-98.
- Sugden, P. H.&A. Clerk (1998). ""Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium." Circ Res 83(4): 345-352.

- Taigen, T., L. J. De Windt, H. W. Lim & J. D. Molkentin (2000). "Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy." Proc Natl Acad Sci U S A 97(3): 1196-1201.
- Tilley, D. G. (2011). "G protein-dependent and G protein-independent signaling pathways and their impact on cardiac function." Circ Res 109(2): 217-230.
- Towbin, J. A. & N. E. Bowles (2002). "The failing heart." Nature 415(6868): 227-233.
- Tran, M. K., K. Kurakula, D. S. Koenis & C. J. de Vries (2016). "Protein-protein interactions of the LIM-only protein FHL2 and functional implication of the interactions relevant in cardiovascular disease." Biochim Biophys Acta 1863(2): 219-228.
- Ueki, K., T. Muramatsu & R. L. Kincaid (1992). "Structure and expression of two isoforms of the murine calmodulin-dependent protein phosphatase regulatory subunit (calcineurin B)." Biochem Biophys Res Commun 187(1): 537-543.
- Vega, R. B., R. Bassel-Duby & E. N. Olson (2003). "Control of cardiac growth and function by calcineurin signaling." J Biol Chem 278(39): 36981-36984.
- Vega, R. B., B. A. Rothermel, C. J. Weinheimer, A. Kovacs, R. H. Naseem, R. Bassel-Duby, R. S. Williams & E. N. Olson (2003). "Dual roles of modulatory calcineurin-interacting protein 1 in cardiac hypertrophy." Proc Natl Acad Sci U S A 100(2): 669-674.
- Vega, R. B., J. Yang, B. A. Rothermel, R. Bassel-Duby & R. S. Williams (2002). "Multiple domains of MCIP1 contribute to inhibition of calcineurin activity." J Biol Chem 277(33): 30401-30407.
- Voelkel, T. & W. A. Linke (2011). "Conformation-regulated mechanosensory control via titin domains in cardiac muscle." Pflugers Arch 462(1): 143-154.
- Wang, J., D. K. Dube, B. Mittal, J. M. Sanger & J. W. Sanger (2011). "Myotilin dynamics in cardiac and skeletal muscle cells." Cytoskeleton (Hoboken) 68(12): 661-670.
- Wilkins, B. J., Y. S. Dai, O. F. Bueno, S. A. Parsons, J. Xu, D. M. Plank, F. Jones, T. R. Kimball & J. D. Molkentin (2004). "Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy." Circ Res 94(1): 110-118.
- Wilkins, B. J. & J. D. Molkentin (2004). "Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy." Biochem Biophys Res Commun 322(4): 1178-1191.
- Will, R. D., M. Eden, S. Just, A. Hansen, A. Eder, D. Frank, C. Kuhn, T. S. Seeger, U. Oehl, S. Wiemann, B. Korn, M. Koegl, W. Rottbauer, T. Eschenhagen, H. A. Katus & N. Frey (2010). "Myomasp/LRRC39, a heart- and muscle-specific protein, is a novel component of the sarcomeric M-band and is involved in stretch sensing." Circ Res 107(10): 1253-1264.

- 
- Willis, M. S.&C. Patterson (2010). "Hold me tight: Role of the heat shock protein family of chaperones in cardiac disease." Circulation 122(17): 1740-1751.
- Yamazaki, T., I. Komuro, I. Shiojima&Y. Yazaki (1999). "The molecular mechanism of cardiac hypertrophy and failure." Ann N Y Acad Sci 874: 38-48.
- Yang, J., B. Rothermel, R. B. Vega, N. Frey, T. A. McKinsey, E. N. Olson, R. Bassel-Duby&R. S. Williams (2000). "Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles." Circ Res 87(12): E61-68.
- Yang, T. T., Q. Xiong, H. Enslin, R. J. Davis&C. W. Chow (2002). "Phosphorylation of NFATc4 by p38 mitogen-activated protein kinases." Mol Cell Biol 22(11): 3892-3904.
- Zhang, X., G. Azhar, J. Chai, P. Sheridan, K. Nagano, T. Brown, J. Yang, K. Khrapko, A. M. Borrás, J. Lawitts, R. P. Misra&J. Y. Wei (2001). "Cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of serum response factor." Am J Physiol Heart Circ Physiol 280(4): H1782-1792.
- Zhang, X., J. Chai, G. Azhar, P. Sheridan, A. M. Borrás, M. C. Furr, K. Khrapko, J. Lawitts, R. P. Misra&J. Y. Wei (2001). "Early postnatal cardiac changes and premature death in transgenic mice overexpressing a mutant form of serum response factor." J Biol Chem 276(43): 40033-40040.
- Zhang, X., X. Min, C. Li, I. J. Benjamin, B. Qian, Z. Ding, X. Gao, Y. Yao, Y. Ma, Y. Cheng&L. Liu (2010). "Involvement of reductive stress in the cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of heat shock protein 27." Hypertension 55(6): 1412-1417.





## VI Erklärung

### Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit, abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung meiner Arbeitskollegen und durch meinen Betreuer, nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Die Abhandlung ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Diese Arbeit wurde bisher, weder in Teilen noch vollständig, an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt, veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

---

Ort, Datum



---

Diese Arbeit wurde im Rahmen der DFG-Forschergruppe 1352: "Structure, Function and Regulation of the Myofibrillar Z-disc Interactome" erstellt.



## **VII Lebenslauf**

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen



---

## VIII Publikationen

**Dierck F**, Kuhn C, Rohr C, Hille S, Braune J, Sossalla S, Molt S, van der Ven PFM, Fürst DO, Frey N. (2017) The novel cardiac z-disc protein CEFIP regulates cardiomyocyte hypertrophy by modulating calcineurin signaling. *J Biol Chem.* 292(37):15180-15191

Hille S, **Dierck F**, Kühl C, Sosna J, Adam-Klages S, Adam D, Lüllmann-Rauch R, Frey N, Kuhn C. (2016) Dyrk1a regulates the cardiomyocyte cell cycle via D-cyclin-dependent Rb/E2f-signalling. *Cardiovasc Res.* 110(3):381-94

Rangrez AY, Eden M, Poyanmehr R, Kuhn C, Stiebeling K, **Dierck F**, Bernt A, Lüllmann-Rauch R, Weiler H, Kirchof P, Frank D, Frey N. (2016) Myozap Deficiency Promotes Adverse Cardiac Remodeling via Differential Regulation of Mitogen-activated Protein Kinase/Serum-response Factor and  $\beta$ -Catenin/GSK-3 $\beta$  Protein Signaling. *J Biol Chem.* 291(8):4128-43

Kuhn C, Frank D, **Dierck F**, Oehl U, Krebs J, Will R, Lehmann LH, Backs J, Katus HA, Frey N. (2012) Cardiac remodeling is not modulated by overexpression of muscle LIM protein (MLP). *Basic Res Cardiol.* 107(3):262

Reinecke K, Eminel S, **Dierck F**, Roessner W, Kersting S, Chromik AM, Gavrilova O, Laukeviciene A, Leuschner I, Waetzig V, Rosenstiel P, Herdegen T, Sina C. (2012) The JNK inhibitor XG-102 protects against TNBS-induced colitis. *PLoS One.* 7(3):e30985





## IX Danksagung

Ich möchte die Gelegenheit nutzen, mich an dieser Stelle bei all denjenigen zu bedanken, die mich während der Erstellung dieser Arbeit fortwährend begleitet, unterstützt und motiviert haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Norbert Frey für die Bereitstellung des Themas sowie für sein Engagement, seine vielen Ratschläge und Diskussionsbereitschaft.

Ich danke Herrn Prof. Clement herzlich für die Übernahme der Betreuung an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Christian Kuhn nicht nur für seine intensive Betreuung und vertrauensvolle Zusammenarbeit, sondern auch für die Unterstützung bei den Tierversuchen und für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Bei allen Mitgliedern des Labors für Molekulare Kardiologie möchte ich mich für die gemeinsame Zeit bedanken. Ihr habt immer für eine tolle Arbeitsatmosphäre gesorgt und wart zu jeder Zeit die gewünschte Unterstützung, Motivation und Ablenkung. Tausend Dank gehen an Susi, Gabi, Kathi, Christin, Vio, Alex, Vanessa, Ash, Abo, Linda, Nesrin und allen anderen unzähligen Mitarbeitern.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für ihre bedingungslose Unterstützung, ihren Rückhalt und Glauben in mich. Dennis, „Dankeschön“ für die Korrektur dieser Arbeit, aber besonders Danke, dass du mir mit viel Geduld und Optimismus in dieser Zeit zur Seite standest.

