

Aus der Klinik für Innere Medizin III  
mit den Schwerpunkten Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin  
(Direktor Prof. Dr. med. Norbert Frey)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel,  
an der Christian-Albrechts-Universität Kiel

**DIE BEDEUTUNG VON FYCO1 (FYVE AND COILED-COIL DOMAIN CONTAINING 1)  
IN DER KARDIALEN AUTOPHAGIE**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität Kiel

vorgelegt von  
Claudia Eva Mack  
aus Tübingen

Kiel 2015

Referent: Prof. Dr. N. Frey, Klinik für Innere Medizin III mit den Schwerpunkten Kardiologie,  
Angiologie und internistische Intensivmedizin  
Korreferent: Prof. Dr. P. J. Saftig, Biochemisches Institut

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2016  
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 22.09.2016

Gez.: Prof. Dr. J. Roider, Klinik für Ophthalmologie

Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung .....	5
1.1 Autophagie .....	5
1.2 Zelluläre Regulationsmechanismen der Autophagie .....	7
1.3 Die pathogenetische Bedeutung der Autophagie .....	8
1.4 FYCO1 als potentieller Interaktionspartner bekannter kardial exprimierter Gene .....	10
1.5 Zielsetzung der Arbeit .....	12
II. Material und Methoden .....	14
2.1 Material .....	14
2.1.1 Geräte .....	14
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	14
2.1.3 Chemikalien .....	15
2.1.4. Enzyme .....	16
2.1.5 Antikörper.....	17
2.1.6 Antibiotika .....	17
2.1.7 Kits .....	17
2.1.8 Oligonukleotide .....	17
2.1.9 Puffer .....	18
2.1.10 Medien .....	20
2.1.11 Zelllinien .....	21
2.1.12 Bakterien .....	21
2.1.13 Versuchstiere.....	21
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden.....	22
2.2.2 Kultur von Säugetierzellen .....	23
2.2.3 Molekularbiologische Arbeitsmethoden - DNA .....	28
2.2.4 Molekularbiologische Arbeitsmethoden - RNA.....	31
2.2.5 Molekularbiologische Arbeitsmethoden - Protein.....	35
2.2.6 Generierung von miR-FYCO1-Viren.....	40
2.2.7 Tierversuche .....	48
2.2.8 Histologie.....	50
2.2.9 Statistische Auswertung.....	51

III. Ergebnisse.....	52
3.1 Überexpression von FYCO1 <i>in vitro</i> .....	52
3.1.1 Klonierung des FYCO1-Adenovirus.....	52
3.1.2 Validierung des AdFYCO1-Virus.....	52
3.1.3 Überexpression von FYCO1 in Kardiomyozyten induziert Autophagie .....	53
3.2 Knockdown von FYCO1 <i>in vitro</i> .....	56
3.2.1 Generierung von synthetischen microRNAs zum „Knockdown“ von FYCO1 .....	56
3.2.2 Validierung des Knockdown von FYCO1 in Rattenkardiomyozyten .....	57
3.2.3 Ein Knockdown von FYCO1 verhindert die Induktion von Autophagie in Kardiomyozyten .	58
3.3 Untersuchungen zu FYCO1 im Mausmodell.....	60
3.3.1 Generierung einer FYCO1-defizienten Maus.....	60
3.3.2 Basisanalysen der FYCO1-defizienten Maus .....	61
3.3.3 Analyse der FYCO1-defizienten Maus unter Stressbedingungen.....	67
3.3.4 Konstriktion der Aorta transversa zur experimentellen Nachlastserhöhung im FYCO1-KO-Mausmodell.....	72
IV. Diskussion .....	78
4.1 Ein FYCO1-abhängiger Stoffwechselweg kontrolliert Autophagie im Herzen.....	78
4.2 Die Bedeutung der Autophagie im Herzen.....	78
4.3 Die Bedeutung von FYCO1 in der Autophagie des Herzens .....	80
4.4 Fehlerhafte Autophagieprozesse als Ursache von Erkrankungen.....	81
4.5 Therapieoptionen durch die Modulation der Autophagie .....	82
V. Zusammenfassung.....	85
VI. Abbildungsverzeichnis.....	87
VII. Tabellenverzeichnis.....	90
VIII. Abkürzungsverzeichnis.....	91
IX. Literaturverzeichnis.....	94
X. Danksagung .....	98
XI. Lebenslauf .....	99

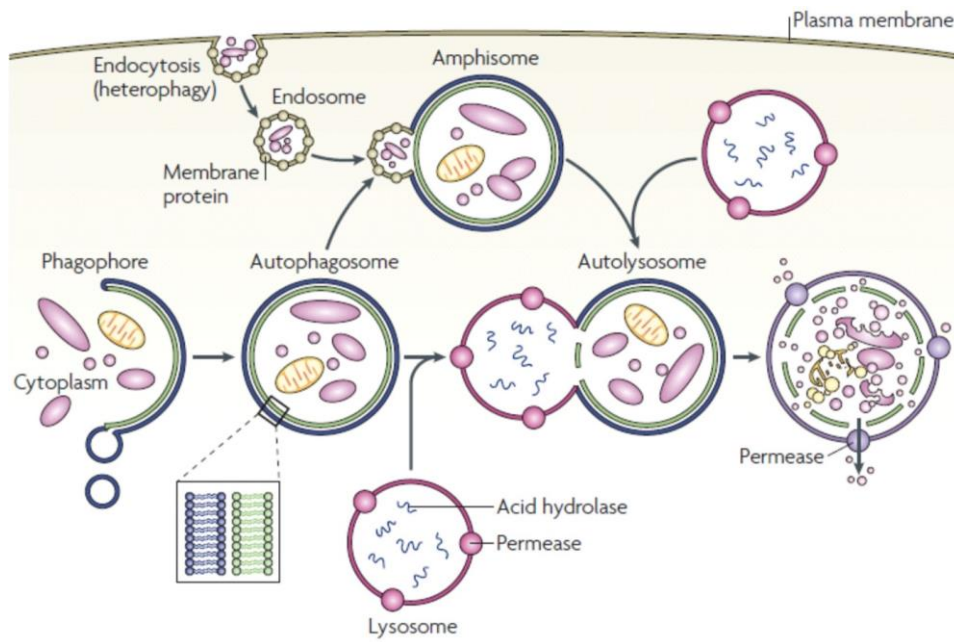
# I. Einleitung

## 1.1 Autophagie

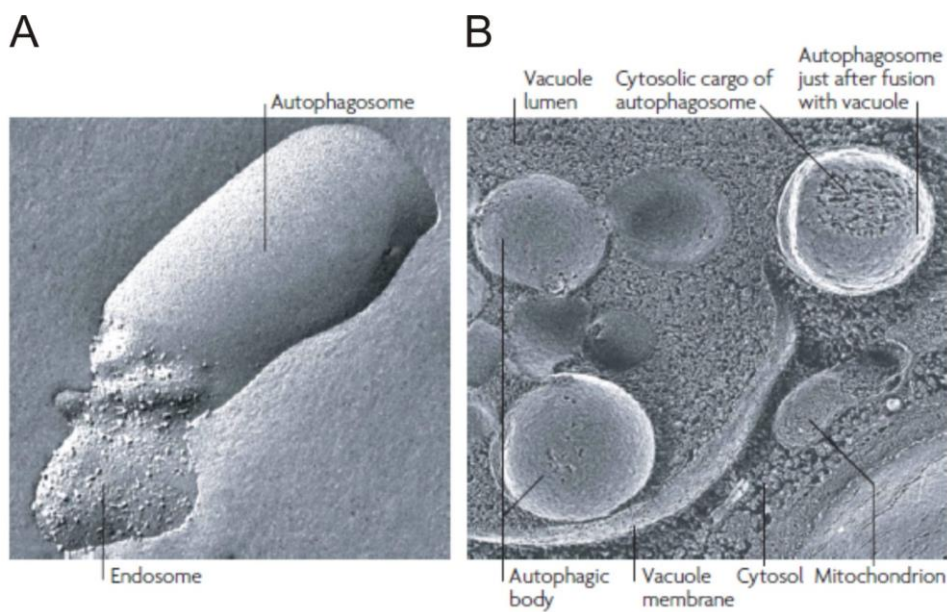
Der Terminus Autophagie (griechisch: „auto“: sich selbst, „-phagie“: essen/verzehren,) beschreibt den Prozess der lysosomalen Degradation von intrazellulären Strukturen [1, 2]. Dieser Degradationsmechanismus ist in allen eukaryotischen Zellen aktiv [3]. Unter nährstoffreichen Bedingungen sind Zellen so in der Lage, langlebige, fehlgefaltete Proteine sowie beschädigte, toxisch wirksame Organellen, zu recyceln [4-6]. Verfügt die Zelle über ausreichend Nährstoffe, stimulieren Wachstumsfaktoren, z.B. insulin-like growth factor 1 (IGF-1), die zelluläre Glukoseaufnahme, was zur Unterdrückung der Autophagie führt [7].

Autophagie ermöglicht der Zelle Adaptationsvorgänge an Umwelt- und Entwicklungsprozesse (Nährstoffmangel, Hypoxie, Hormone, Signalkaskaden der Zellentwicklung) [1-3, 8]. So führt der Abbau beschädigter Zellorganellen, z.B. unter Nährstoffmangel, zur Freisetzung von Amino- und Fettsäuren, die von der Zelle für Synthesevorgänge genutzt werden können [6, 8, 9].

Es werden drei Hauptformen der Autophagie unterschieden: Mikroautophagie, Chaperon-vermittelte Autophagie und Makroautophagie [10, 11]. Bei der Mikroautophagie kommt es durch Invagination der Membran von Lysosomen zur direkten Aufnahme von Bestandteilen des Zytosol [12]. Im Gegensatz dazu erfolgt bei der „chaperone-mediated autophagy“ die Internalisierung einzelner Proteine in Lysosomen über die Bindung des abzubauenen Proteins an ein Chaperon. Bei der Makroautophagie bilden sich Vesikel mit einer Doppelmembran, sogenannte Phagophoren, die einen Teil des Zytoplasmas einhüllen (Abb. 1). In der Folge durchlaufen diese Vesikel einen Reifungsprozess und werden als Autophagosomen bezeichnet. Diese fusionieren mit Lysosomen und setzen das phagozytierte Material lysosomalen Hydrolasen aus. Dann kommt es zum eigentlichen Abbau des Inhaltes. Dieser wird so recycelt und dem Stoffwechsel der Zelle wieder zur Verfügung gestellt [9, 13].



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Autophagie** mit Darstellung des Reifungsvorganges von Phagophoren zu Autolysosomen (aus: [2])



**Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Autophagosomen.** (A) Fusion von Autophagosomen mit Endosomen in einer Rattenleberzelle. (B) Fusion von Autophagosomen mit Hefevakuole (aus: [2])

## 1.2 Zelluläre Regulationsmechanismen der Autophagie

Der Prozess der Autophagie wird in die vier Stadien Induktion, Vakuolenbildung, Ausdehnung, Reifung und Gewinnung von Adenosintriphosphat (ATP) eingeteilt [13, 14]. Molekulargenetische Untersuchungen in Hefen führten zur Detektion von bisher 32 „autophagy related genes“ (*Atg*) [14]. Während der Induktion bilden sich charakteristische doppelmembranöse 0,5-1,5 µm messende Vesikel (Abb. 3) [7]. Dabei ist die Kinase target of rapamycin (TOR) ein Schlüsselenzym [15]. Herrscht ein ausreichendes Nährstoffangebot vor, dann liegen Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) in aktivierter Form vor und phosphorylieren das Zielmolekül AKT/Proteinkinase B (Gen für die Proteinkinase B). AKT aktiviert TOR, das ATG13 phosphoryliert und die Interaktion mit ATG1 inhibiert. Die Interaktion von ATG13 mit ATG1 stellt einen wichtigen Reaktionsschritt im Autophagiemechanismus dar, da bei Nährstoffmangel der ATG13/ATG1/ATG17-Komplex die Induktion der Autophagie begünstigt [7, 16].

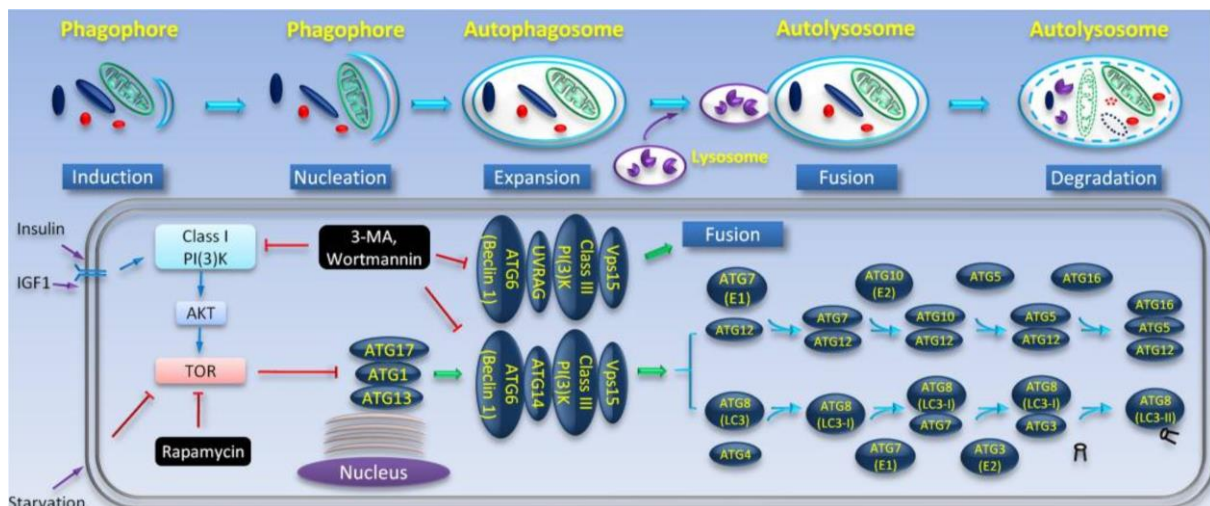


Abbildung 3: Regulationsmechanismen auf zellulärer Ebene bei Autophagie (aus: [7])

Der ATG1/ATG13/ATG17-Komplex ist der am besten charakterisierte der Autophagie in der Hefe. Die Prozesse in der Säugetierzelle funktionieren nach gleichem Prinzip [17]. Unter nährstoffreichen Bedingungen interagiert mammalianTOR (mTOR) mit ULK1 (Pendant von ATG1), ATG13 und dem Fusion Inhibiting Peptide 200 - Komplex (FIP200). Bei Nährstoffmangel wird ULK1 durch die Dissoziation von mTOR aktiviert und phosphoryliert ATG13 und FIP200, so dass die Autophagie resultiert. Für die Bildung des Autophagosoms sind zwei Ubiquitin-ähnliche Enzymsysteme verantwortlich. ATG12 wird durch ATG7 aktiviert und auf ATG10 übertragen. ATG12 wird kovalent an ATG5 gebunden und interagiert als ATG12/ATG5-Komplex mit ATG16. Im zweiten Enzymsystem wird LC3 (Light chain 3) durch ATG4 geschnitten und C-terminal ein Glycin-Rest freigelegt. Das modifizierte



LC3-I wird dann durch ATG7 aktiviert. Nach Übertragung von LC3-I auf ATG3 wird LC3-I an Phosphatidylethanolamin (PE) gekoppelt. Es lokalisiert sich als LC3-II an der Phagophorenmembran. Die meisten der ATG-Proteine werden nach dem Reifungsprozess zum Autophagosom über einen Signalweg recycelt, der die Proteine ATG2, ATG9 und ATG18 beinhaltet [7, 13].

### 1.3 Die pathogenetische Bedeutung der Autophagie

Die Autophagie stellt einen essenziellen Regulationsmechanismus zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase dar. Fehlregulationen der Autophagie sind daher von Bedeutung bei der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen [1]. So wurden bei neurodegenerativen Erkrankungen (M. Alzheimer, M. Parkinson) [18, 19], Skelettmypathien (M. Danon, Gliedergürteldystrophie) [8], Krebserkrankungen (Mamma, Ovar, Prostata, Kolon) [20-22] und Infektionserkrankungen (Tuberkulose) [23] Zusammenhänge zwischen Autophagie und Erkrankungsentstehung beschrieben. Der M. Danon, eine X-chromosomal vererbte Krankheit die früher zu den Glykogenspeicherkrankheiten gezählt wurde [24, 25], ist charakterisiert durch das Vorkommen einer Kardio- und Skelettmuskelmypathie sowie mentalen Retardierung [26, 27]. Der Pathogenese liegt eine Mutation im lysosomalen Protein LAMP-2 (Lysosome-associated Membrane Protein 2) zu Grunde. Patienten, denen LAMP-2 fehlt, weisen eine starke Akkumulation von Autophagosomen in der Muskulatur auf, da eine Fusion von Autophagosom und Lysosom nicht erfolgt [8]. Die Fusion von Lysosomen mit Autophagosom kann auch durch Pharmaka gehemmt werden, was ebenfalls zu einer Myopathie führt. Zu diesen Substanzen gehört Chloroquin [28]. Bei der Gliedergürteldystrophie LGMD 2B (Limb-girdle Muscular Dystrophy Typ 2B) verursacht eine Mutation im Dysferlin-Gen, einem Typ II Transmembranprotein, das hauptsächlich im Muskelsarkolemm exprimiert wird, die myopathischen Beschwerden. Das funktionslose Dysferlin reichert sich im endoplasmatischen Retikulum an und wird hauptsächlich durch Autophagie abgebaut [29]. Eine medikamentöse Aktivierung der Autophagie kann möglicherweise vor der Aggregation dieser Proteine schützen [8]. Autophagieprozesse wurden auch bei Herzerkrankungen untersucht und scheinen eine wichtige Rolle bei der Reaktion von Myozyten auf Stressfaktoren wie Ischämie im Rahmen koronarer Herzerkrankungen, Hypertonus, Herzklappenerkrankungen oder Herzinsuffizienz zu spielen [8]. Untersuchungen an Herzmuskelbiopsien von Patienten mit Kardiomyopathien zeigen eine Akkumulation von Autophagosomen als Ausdruck einer fehlregulierten Autophagie [30].

Dass die Regulation der Autophagie auch im Herzen essenziell ist, zeigt sich anhand einiger ausgewählter Mausmodelle. ATG5 und ATG7 sind Proteine, die in der Erweiterung und abschließenden Bildung des Autophagosoms eine wesentliche Funktion haben [31-33]. ATG5

homozygot defiziente Oozyten, die mit ATG5 homozygot defizientem Sperma befruchtet werden, entwickeln sich nicht über die 4.- 8. Zellstufe hinaus [10]. ATG5 homozygot defiziente Tiere, die von ATG5 heterozygoten Muttertieren ausgetragen werden, sterben während der Geburt [10]. In adulten Tieren führt ein Fehlen von ATG5 in Kardiomyozyten zu kardialer Hypertrophie, linksventrikulärer Dilatation und kontraktile Dysfunktion [34]. Ein spezifischer Knockout von ATG5 in Herzmuskelzellen während der Herzentwicklung induzierte keine kardiale Hypertrophie oder Dysfunktion unter physiologischen Bedingungen. Liegt jedoch eine Druckbelastung des Herzens vor, führt dies innerhalb einer Woche zur kardialen Dysfunktion und linksventrikulären Dilatation [34]. Autophagie scheint in der Herzentwicklung so einen zusätzlichen Effekt im kardialen „Remodelling“ zu haben, jedoch essentiell in der Homöostase der Herzmuskelzelle in Stressreaktionen zu sein [10].

ATG7 ist ein Schlüsselenzym im ATG-Konjugationssystem, speziell für die ATG12-Konjugation, die Modifikation des LC3-Systems und in der Bildung von Autophagosomen [32]. Auch wenn ATG7-defiziente Mäuse keinen offensichtlichen Phänotyp bei Geburt aufwiesen, war das durchschnittliche Körpergewicht bei Geburt deutlich niedriger und die Tiere verstarben innerhalb eines Tages [32]. Unter Nährstoffentzug verstarben diese Tiere ebenfalls früher als das Kontrollkollektiv, sodass Komatsu et al. zeigen konnten, dass ATG7 essentiell für das Recycling von Aminosäuren und somit das Überleben unter Nährstoffentzug in der Autophagie ist [32]. Masiero et al. konnten ergänzend darstellen, dass ein spezifischer ATG7-Knockout im Skelettmuskel zur Inhibierung von Autophagie führt und die Tiere unter Muskelatrophie, Schwäche und Muskelfaserdegeneration leiden [35].

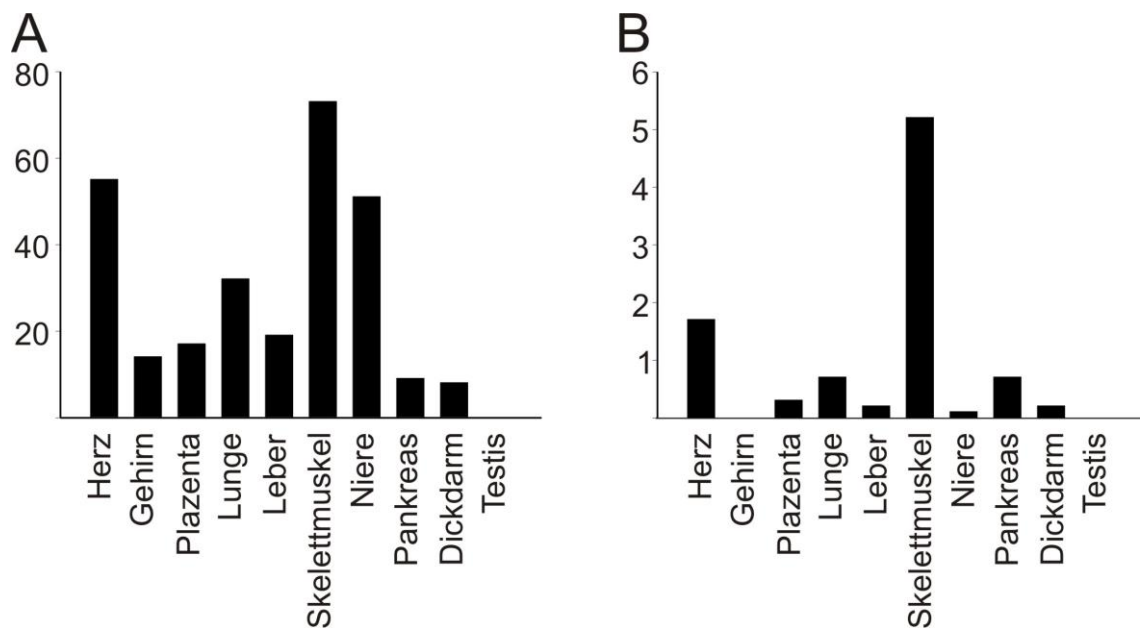
Beclin1, das Pendant zu ATG6 in Säugetierzellen, ist ein Teil des Klasse III PI3K-Komplexes, auch als Vps3 (Vacuolar protein sorting) bekannt, der die Autophagosomenbildung in Säugetierzellen reguliert [21]. Beclin1 ist dabei für die Konjugation von ATG12/ATG5 an Vorläufer der Membranen von Autophagosomen zuständig [36]. Ein homozygoter Knockout von Beclin1 führt zur Letalität des Embryos [20]. Diese weisen eine deutliche Gewichts- und Größenreduktion auf [37]. Mäuse mit heterozygoter Anlage von Beclin sind lebensfähig, weisen jedoch eine verminderte Autophagieaktivität in vielen Geweben auf [20]. Zhu et al. entwickelten ein Mausmodell mit einer Überexpression von Beclin1, um die Auswirkungen auf die Herzfunktion zu untersuchen. Die Überexpression von Beclin1 ruft unter physiologischen Bedingungen eine leicht erhöhte Autophagieaktivität hervor, bewirkt jedoch keine Veränderung des Fractional Shortenings (FS) oder der Ventrikelgröße [4]. Daher erfolgte an Beclin1-überexprimierenden Mäusen eine Druckbelastung des Herzens durch ein transthorakales aortales Banding (TAB), welche eine ventrikuläre Hypertrophie ohne Herzversagen induzieren soll [38]. Durch die kardiale Überexpression von Beclin1 kam es nach TAB zu einer deutlichen Zunahme der Hypertrophie im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (WT-Mäuse), die ebenfalls eine aortale Konstriktion erhalten hatten [4]. Die systolische Herzfunktion in WT-

Mäusen nach TAB war normwertig, die der transgenen Tiere wies jedoch eine deutliche Reduktion des FS auf. Überraschenderweise war das fetale Genprogramm jedoch in wildtyp und transgenen Mäusen nach TAB vergleichbar [4].

Neben der Inhibition der Autophagie durch genetische Manipulationen wurden bisher auch pharmakologische Interventionen untersucht. Hierbei kamen unter anderem Bafilomycin A1 und Chloroquin zum Einsatz. Um die Auswirkung eines gestörten Autophagieprozesses auf die kardiale Funktion zu ermitteln, wurde eine Mauspopulation für drei Tage mit je 0,3 mg Bafilomycin A1 pro kg Körpergewicht (KG), welches den letzten Schritt der Autophagie inhibiert, behandelt. Unter physiologischen Bedingungen kam es zu keiner Beeinträchtigung der Herzfunktion. Wurde den Tieren jedoch die Nahrung entzogen und so Autophagie induziert, konnte in der Echokardiographie eine signifikante Herzdilatation und eine linksventrikuläre Funktionseinschränkung dokumentiert werden. Bafilomycin A1 inhibiert die Autophagie und verursacht so unter Nahrungsmangel eine schwere kardiale Dysfunktion in Mäusen. Da unter physiologischen Bedingungen keine kardiale Dysfunktion ausgelöst werden kann, scheint die Autophagie als Kompensationsmechanismus zur Erhaltung der kardialen Funktion nur unter Nahrungsmangel eine Rolle zu spielen. Eine Hauptfunktion der Autophagie ist die Bereitstellung von Aminosäuren, daher kommt es unter Hungerbedingungen zur Zunahme von Aminosäuren im Zytoplasma. Stört man jedoch die Autophagie mit Bafilomycin A1, kommt es nicht zum Anstieg der Aminosäurenkonzentration und der ATP-Konzentration, jedoch zur Zunahme der kardialen Dysfunktion. Unzureichende Aminosäuren- und ATP-Konzentrationen scheinen daher wesentlich zur kardialen Dysfunktion beizutragen [39].

#### **1.4 FYCO1 als potentieller Interaktionspartner bekannter kardial exprimierter Gene**

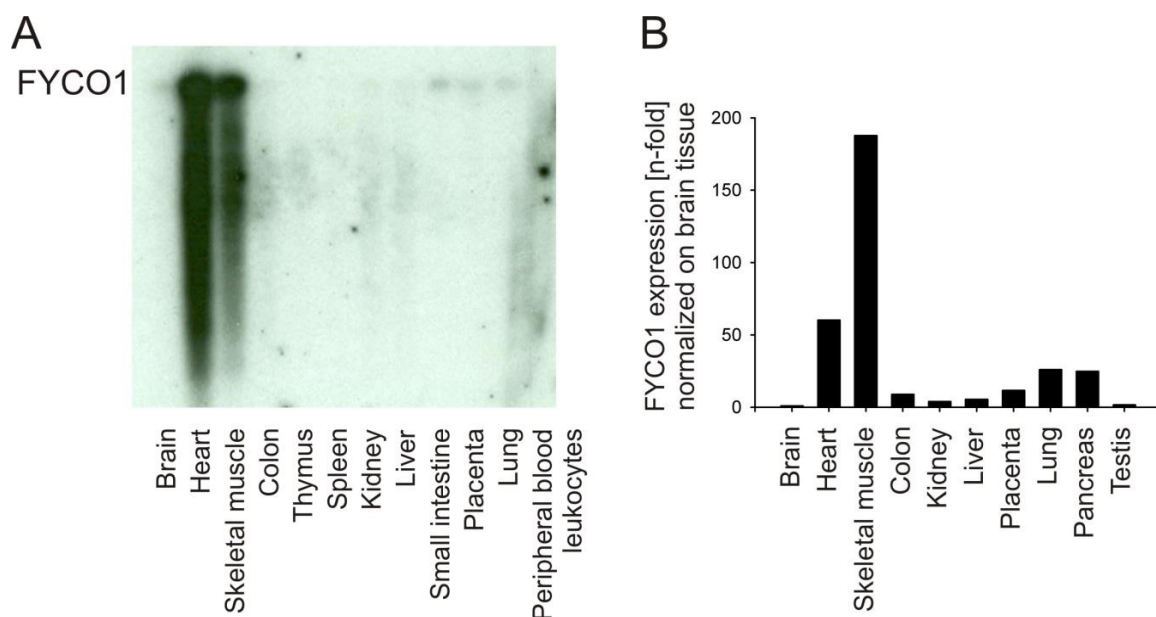
In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. N. Frey wurde im Rahmen der Dissertation von Raphael Zeller am Universitätsklinikum Heidelberg über die Identifizierung und Charakterisierung neuer Mutationen in bekannten und neuen Kandidatengen für die Kardiomyopathie eine computer-gestützte Analyse von EST-Datenbanken (Expressed Sequence Tags) durchgeführt, um Sequenzen mit einer herz- oder skelettmuskelspezifischen Expression zu finden. Dabei wurde das Gen *FYCO1* identifiziert [40].



**Abbildung 4: Expressionsprofil von *FYCO1*** A) Durch Datenbankanalysen ermitteltes *FYCO1*-Expressionsprofil in humanen Geweben (Abb. Modifiziert nach [40]) B) Validierung des Expressionsprofils von *FYCO1* in humanen Geweben mit Hilfe von quantitativer real-time PCR (Abb. Modifiziert nach [40])

Real-time PCR-Untersuchungen bestätigten die hohe Expression des Gens *FYCO1* im Muskelgewebe, die im Skelettmuskel etwa dreifach höher als im Herzmuskel ausfiel (Abb. 4B).

Eine Northern Hybridisierung mit einer *FYCO1*-Sonde zeigte ein deutliches Signal im Herz- und Skelettmuskel (Spur 2 und 3) (Abb. 5). In den anderen Geweben wurde nur eine vergleichsweise geringe Expression detektiert [40].



**Abbildung 5: Untersuchung der *FYCO1*-Expression mittels Northern-Blot Hybridisierung.** Spuren: 1) Gehirn, 2) Herzmuskel, 3) Skelettmuskel, 4) Dickdarm, 5) Thymus, 6) Milz, 7) Niere, 8) Leber, 9) Dünndarm, 10) Plazenta, 11) Lunge, 12) Periphere Blutleukozyten A) Northern-Blot B) Mathematische Auswertung

Durch einen anschließend durchgeführten „Yeast Two-Hybrid“-Screen wurde u.a. LC3 als potentieller Interaktionspartner von FYCO1 identifiziert. LC3, ein Homolog des ATG8 in der Hefe, stellt ein Markerprotein der Autophagieaktivität dar [4, 9]. Pankiv et al. identifizierte FYCO1 als einen Rab7-Effektor, der an LC3 und PI3P bindet und somit den Mikrotubulus-vermittelten Transport von Vesikeln ermöglicht. Cotransfektionen und Cofärbungen zeigten eine partielle Kollokalisierung von FYCO1 und LC3, FYCO1 konnte jedoch nur auf der Außenseite von Autophagosomen nachgewiesen werden [41].

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

FYCO1 ist ein morphologisch und funktionell bisher nur unzureichend charakterisiertes Protein. Die auffälligsten phänotypischen Effekte einer FYCO1-Fehlfunktion sind im Auge beschrieben. Verschiedene Mutationen im *FYCO1*-Gen wurden als Ursache der autosomal-rezessiv vererbten Katarakt in zwölf pakistanischen und einer arabischen Familie identifiziert [42]. Obwohl Kiss et al. 2002 bereits eine hohe Expression von FYCO1 im Herz- und Skelettmuskel beschrieben, was eine besondere Rolle von FYCO1 im Herzmuskel vermuten lässt, ist kaum etwas über die Funktion von FYCO1 oder die Effekte seiner Fehlfunktion im Herzen bekannt [43, 44]. Pankiv et al. konnten beobachten, dass FYCO1 auf der Außenmembran von Autophagosomen vorkommt und postulierten daher dass FYCO1 eine Rolle im Transport von Vesikeln entlang von Microtubuli spielt. Dies wird durch eine Bindung von FYCO1 an LC3 ermöglicht, wodurch eine saure Schleife im Protein FYCO1 freigelegt wird und somit die Membranbindung ermöglicht wird. Eine Hypothese über die Funktion von FYCO1 ist daher, dass FYCO1 unter Nährstoffmangel Prä-Autophagosomenmembrananteile entlang von Microtubuli zum Ort der Autophagosomenbildung im Zytosol bringt und schließlich den bidirektionalen Transport von Autophagosomen entlang der Microtubuli ermöglicht [41, 45]. Die Aufklärung molekularer Zusammenhänge zwischen FYCO1 und an der Autophagie beteiligten Proteine erlaubt den Einblick in zelluläre Mechanismen der Autophagie und trägt somit zum Verständnis nicht nur kardialer Erkrankungen bei.

Im Rahmen dieser Dissertation soll die molekulare Rolle von FYCO1 im Prozess der Autophagie in der Herzmuskelzelle charakterisiert werden. In *in vitro* Experimenten wurde *FYCO1* in neonatalen Rattenkardiomyozyten mittels eines adenoviralen Gentransfers herauf- oder durch synthetisch hergestellte, spezifisch gegen *FYCO1* gerichtete microRNAs, herunterreguliert.

Durch die Überexpression und den „Knockdown“ von *FYCO1* sollte die Funktion von FYCO1 in neonatalen Rattenkardiomyozyten insbesondere im Rahmen der Autophagie unter basalen und

stimulierten Bedingungen im Folgenden näher charakterisiert werden. Fragestellungen waren folgende:

1) Verändert eine Überexpression oder der Knockdown von FYCO1 die Autophagie unter basalen Bedingungen in neonatalen Rattenkardiomyozyten?

2) Verändert eine Überexpression oder der Knockdown von FYCO1 die Autophagie unter stimulierten Bedingungen in neonatalen Rattenkardiomyozyten?

Anschließend wurden *in vivo* Untersuchungen am konstitutiven Knockout-Mausmodell (KO-Mausmodell) durchgeführt. Ziel war zunächst die Phänotypisierung der FYCO1-defizienten Maus. Fragestellungen waren folgende: 3) Weisen FYCO1-defiziente Mäuse unter basalen Bedingungen morphometrische Unterschiede in Herz-, Lungen- oder Körpergewicht auf? Ändert sich dies im Alter oder unter Nahrungsentzug?

4) Wie verändert sich die Gen- und Proteinexpression? Welchen Einfluss hat dies auf die Autophagie in Herzmuskelzellen?

5) Kommt es bei FYCO1-defizienten Mäusen unter basalen Bedingungen zu funktionellen Einschränkungen des Herzens? Ändert sich dies im Alter oder unter Stimulation?

Im Weiteren sollte der Einfluss von Autophagie auf das kardiale „Remodelling“ bei kardialer Hypertrophie bzw. Herzinsuffizienz untersucht werden.

## II. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Autoklav Systec VX-65	Systec GmbH, Wetztenberg
Biometra Power Pack P25	Dräger, Lübeck
CFX 96 RealTime System/C1000 Thermal Cycler	BioRad Laboratories GmbH, München
CryoStar TM NX70	Thermo Fisher Scientific, Bremen
Elektroporationsgerät	BioRad Laboratories GmbH, München
Eppendorf Centrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg
FluorChem Q (Kamera für den Western Blot)	Alpha Innotech, San Leandro, CO, USA
Gelelektrophoresekammer	BioRad Laboratories GmbH, München
Heracell 240 CO2 Incubator	Thermo Scientific, Braunschweig
Keyence BZ-9000 (Kamera für die Immunzytologie)	Biorevo, Neu-Isenburg
Microliter Syringes Pipette	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Mikroskop Axiovert 40C	Zeiss, Oberkochen
Mikrowelle	Sharp, Hamburg
Mini Trans-Blot Cell von Bio-Rad	BioRad Laboratories GmbH, München
My Cycler, thermal cycler (PCR)	BioRad Laboratories GmbH, München
Neubauer-Zählkammer	VWR, Hannover
SDS-PAGE BioRad Mini-Protean System	BioRad Laboratories GmbH, München
Tecan infinite M200 PRO	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Thermocycler Biometra personal Cycler	Dräger, Lübeck
Thermomixer groß MaxQ8000	Thermo Scientific, Braunschweig
Thermomixer klein Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischwaage Sartorius	Dräger, Lübeck
Tischzentrifuge VWR Galaxy Mini Star	Dräger, Lübeck
Ultraschallgerät Vivid 7 Pro	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Ultra-Turrax	Brand, Wertheim
Wasserbad Julabo SW 22	Dräger, Lübeck
Zentrifuge groß Heracus Multifuge X3R Centrifuge	Thermo Scientific, Braunschweig
Zentrifuge klein Heracus Pico 21	Thermo Scientific, Braunschweig

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Bottel Top Filtrationssystem (für NRVCMs)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Coverslips, Menzel-Gläser	Thermo Scientific, Braunschweig
Cryomold TissueTek	Sakura Finetechnical Co, Tokyo, Japan
Elektroporationsküvette	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

Falcon-Tubes für Bakterien 13 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon Tube, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon Tube, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Filterpapier	BioRad Laboratories GmbH, München
Fluor Preserve Reagent (Einbettmedium bei der Immunzytologie)	Calbiochem Merck, Darmstadt
Gewebekulturflaschen, T 75 cm <sup>2</sup> , T 175 cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nümbrecht
Kryoröhrchen (NalgeneCryo Freezing Container)	Nalgene, Rochester, NY, USA
Nalgene Tube	Nalgene, Rochester, NY, USA
Objektträger Menzel-Gläser	Menzel GmbH & Co KG, Baunschweig
O.C.T. TM Compound Containing TissueTek (zum Einbetten von Gewebe)	Sakura Finetek Zoeterwoude, Niederlande
Papierfilter (für Bradford)	Schleicher-Schuell, Corston, UK
PCR-Platten	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen (für Bakterien)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, gestopft, 100-1000 µl, 2-200 µl, 2-100 µl, 0,5-20 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, ungestopft, 100-1000 µl, 2-200 µl, 2-100 µl, 0,5-20 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Platten zur Proteinmessung	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF-Membran	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
Rasierer	Dahlhausen und Co GmbH, Köln
RNase freie/ DNase freie Tubes 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Schwämme	BioRad Laboratories GmbH, München
Stabpipetten 5 ml, 10 ml, 20 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter (NRVCM)	Nalgene, Rochester, NY, USA
Tubes 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Whatman-Papier	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
6-Well-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhauen
12-Well-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhauen

### 2.1.3 Chemikalien

Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
AMPS (2-Acrylamido-2-methylpropansulfonsäure)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Bradford-Reagenz	BioRad Laboratories GmbH, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Merck KGaA, Darmstadt
DAPI-Kernfärbung Fura 2-AM, F0888-1MG	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
dNTP (Desoxy-Nukleosidtriphosphate)	Fermentas Life Sciences, Darmstadt



Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom GmbH, Berlin
Isofluran	Apotheke Beckstar, Kiel
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Kollagen I	Cell Systems Biotechnologie Vertrieb, Worthington, MN, USA
LB-Agar X969 (Luria/Miller)	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
LB-Medium X968 (Luria/Miller)	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Lipofectamin 2000	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
L-Glutamin 100 x, 200 mM	Invitrogen (GIBCO), Aotearoa, Neuseeland
Methanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Mounting Medium	Calbiochem, Darmstadt
Natrium-Acetat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
NCS, New born calf serum	Invitrogen (GIBCO), Aotearoa, Neuseeland
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
PBS	Invitrogen (GIBCO), Aotearoa, Neuseeland
Percoll-Stammlösung	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Phenolrot	Merck KGaA, Darmstadt
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Salzsäure 25 %	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
SDS	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Stickstoff	Air Liquid, Paris
TEMED	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
TRIzol-Reagenz	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
30 % Acrylamide/bisacrylamide	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

#### 2.1.4. Enzyme

Collagenase Typ 2	Cell Systems Biotechnologie Vertrieb, Worthington, MN, USA
DNase I	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dreamtaq-Polymerase	Fermentas Life Sciences, Darmstadt
Kollagen I	Cell Systems Biotechnologie Vertrieb, Worthington, MN, USA
PAC-I	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Pankreatin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Proteinase K	Rosch Innovations GmbH, Asbach

RNaseH

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

### 2.1.5 Antikörper

Primär-Antikörper:

Anti-FYCO1 NBP1-47266 (Kaninchen, polyklonal)

Anti-Hexon-Antikörper, FITC-gekoppelt

Anti-LC3B 2775 (Kaninchen, polyklonal)

Anti-V5 R96025 (Maus, monoklonal)

Anti- $\alpha$ -Tubulin T5168 (Maus, monoklonal)

Novus Biologicals, Littleton, CO, USA

BioDesign, Saint-Priest, Frankreich

Cell Signaling via NEB, Frankfurt am Main

Invitrogen (GIBCO), Aotearoa, Neuseeland

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Sekundär-Antikörper:

Anti-Kaninchen-Cy3 (Ziege, polyklonal)

Anti-Kaninchen-HRP SC2305 (Affe, polyklonal)

Anti-Maus-Cy3 (Ziege)

Dianova, Hamburg

SantaCruz, Dallas, TX, USA

Invitrogen Life Technologies GmbH,  
Darmstadt

### 2.1.6 Antibiotika

Carbenicillin 100  $\mu$ g/ml

Kanamycin 50  $\mu$ g/ml

Penicillin-Streptomycin

Spectinomycin 50  $\mu$ g/ml

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Invitrogen (GIBCO), Aotearoa, Neuseeland

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

### 2.1.7 Kits

BLOCK-IT Expression Vektor Kit

ECL-Detektionssystem

NucleoSpinKit

PAC-I Restriktionsendonuklease Kit

Plasmid Maxi Kit

SuperScript III First Strand Synthesis System

SYBR Green Kit

Invitrogen (GIBCO), Aotearoa, Neuseeland

GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg

Macherey-Nagel, Düren

New England Biolabs, Frankfurt am Main

Qiagen, Hilden

Invitrogen (GIBCO), Aotearoa, Neuseeland

Invitrogen (GIBCO), Aotearoa, Neuseeland

### 2.1.8 Oligonukleotide

Primer zur Genotypisierung: Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt

1260\_1: 5' GAG ACT CTG GCT ACT CAT CC 3'

1260\_2: 5' CCT TCA GCA AGA GCT GGG GAC 3'

1646\_31: 5' GAT TTC CTA GAT TCC ATG TTG C 3'

1645\_28: 5' GGA AGG GAG TTA TTG GTG ATG G 3'

Primer für die Realtime-PCR: MWG, Ebersberg

FYCO1 F	CGGCACCACTGCAGGTTATGTG
FYCO1 R	TTCTGGAAGCAGGCTCGGCA
MYH7r_135_F	CAAGCAGCAGTTGGATGAGCG
MYH7r_135_R	TCCTCGATGCGTGCCTGAAG
NPPAr_128_F	AAACTGAGGGCTCTGCTCGC
NPPAr_128_R	GGCTGTTATCTTCGGTACCGGAAG
NPPBr_124_F	TCCGGATCCAGGAGAGACTTCG
NPPBr_124_R	TCCTAAAACAACCTCAGCCCCTC
RPL32mr_165_F	GGTGGCTGCCATCTGTTTTACG
RPL32mr_165_R	CCGCACCCTGTTGTCAATGC
18Shmr_123_F	GCACGGCCGGTACAGTGAAA
18Shmr_123_R	GCGCCCCTCGGCATGTATTA

### 2.1.9 Puffer

KLP-Puffer (Kern-Lyse-Puffer)

20 mM Tris  
10 mM DTT  
500 mM NaCl  
1 % NP40  
12,5 % Glycin

SNET-Puffer

20 mM Tris-Cl (pH 8,0)  
5 mM EDTA (pH 8,0)  
400 mM NaCl  
1 % (w/v) SDS

1 x TBST

1 x TBS

0,1 % Tween 20

H<sub>2</sub>O reinst.

2,5 x Separating Gel Puffer pH 8,9

1,875 M Tris Base

H<sub>2</sub>O reinst.

HCL

0,25 % SDS

4 x Lämmli-Loading-dye

0,25 M Tris pH 6,8

40 % Glycerol

8 % SDS

0,08 % Bromphenol-Blau

0,2 M DTT

H<sub>2</sub>O reinst. ad 100 ml pH 6,8

5 x Stacking Gel Puffer pH 6,7

0,3 M Tris Base

H<sub>2</sub>O reinst.

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

0,5 % SDS

5x Elektrophorese Puffer pH 8,8

0,5 M Tris Base

1,92 M Glycine

H<sub>2</sub>O reinst.

0,5 % SDS

10x Transfer Puffer pH 8,3

0,25 M Tris Base

1,92 M Glycine

H<sub>2</sub>O reinst.

20 % Methanol

10 x TBS pH 7,5

0,25 m Tris Base

1,5 M NaCl

H<sub>2</sub>O reinst.

HCl

50 x TAE-Puffer pH 8,3

3 M Tris-Acetat

0,05 M EDTA

## 2.1.10 Medien

### Medien zur Bakterienkultur

LB-Medium	Life Technologies (GIBCO), Aotearoa, Neuseeland
SOC-Transformationsmedium	Life Technologies (GIBCO), Aotearoa, Neuseeland

### Medien zur Kultivierung von Säugetierzellen

Die verwendeten Medien wurden bei 4 °C gelagert. Kurz vor Benutzung in der Zellkultur wurden die Medien in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

### Medium zum Anwachsen von NRVCMs

DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 110 mg/l Natriumpyruvat (Life Technologies (GIBCO), Aotearoa, Neuseeland)  
+ 10 % (v/v) FCS  
+ 100 U/ml Penicillin  
+ 100 µg/ml Streptomycin  
+ 2 mM L-Glutamin

### Medium zur Kultivierung von NRVCMs

DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 110 mg/l Natriumpyruvat (Life Technologies (GIBCO), Aotearoa, Neuseeland)  
+ 100 U/ml Penicillin  
+ 100 µg/ml Streptomycin  
+ 2 mM L-Glutamin

### Medium zur Serumdeprivation von NRVCMs

DMEM ohne Glukose (Life Technologies (GIBCO), Aotearoa, Neuseeland)  
+ 100 U/ml Penicillin  
+ 100 µg/ml Streptomycin  
+ 2 mM L-Glutamin

### HBSS (Life Technologies (GIBCO), Aotearoa, Neuseeland)

- Ca
- Mg

### PBS (Life Technologies (GIBCO), Aotearoa, Neuseeland)

- CaCl<sub>2</sub>
- MgCl<sub>2</sub>

Medium zur Kultur von HEK293A-Zellen  
DMEM advanced (Life Technologies (GIBCO), Aotearoa, Neuseeland)  
+ 4 % FCS  
+ 100 U/ml Penicillin  
+ 100 µg/ml Streptomycin  
+ 2 mM L-Glutamin

#### 2.1.11 Zelllinien

##### HEK293A-Zellen

Die HEK293A-Zelle (Human Embryonic Kidney) ist eine humane Zelllinie und das Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle mit DNA-Teilen (Desoxyribonukleinsäure) des menschlichen Adenoviruses 5. Die Zelllinie besteht seit Ende der 1970er Jahre. 1962 transfizierte Harvey Shein (Harvard University) Nierenzellgewebe aus 2-3 Monate alten Foeten mit Simian-Virus 40 (Affenvirus 40, SV-40, Virus der Familie Polyomviren) und Harald zur Hausen (University of Philadelphia) 1967 Nierenzellgewebe von menschlichen Embryonen mit Adenovirus Typ-12. Die HEK293 Zelllinie wird bei der Entwicklung von Virenimpfstoffen, Chemotherapeutika sowie zur Produktion von rekombinanten Adenovirus-Vektoren verwendet.

#### 2.1.12 Bakterien

E.coli Bakterien DH10B	Invitrogen (GIBCO), Aotearoa, Neuseeland
E.coli OneShot TOP10 Bakterien	Invitrogen (GIBCO), Aotearoa, Neuseeland

#### 2.1.13 Versuchstiere

##### Mäuse

Die transgenen Mäuse wurden bei Taconic Artemis (Köln, Deutschland) generiert.

##### Ratten

Für die Herstellung einer Primärkultur ventrikulärer Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten (NRVCM) wurden die Nachkommen von schwangeren Ratten vom Wistar-Stamm verwendet. Die Tiere wurden 1-3 Tage postnatal von der Mutter getrennt und getötet.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

#### Transformation von Bakterien mit Plasmiden durch Elektroporation

Zur Transformation durch Elektroporation wurden elektrokompetente E.coli-Bakterien DH10B von Life Technologies verwendet. Die Bakterien wurden portioniert bei - 80 °C gelagert. Pro Plasmid wurde ein Tube, das 50 µl Bakterienvolumen enthielt, auf Eis aufgetaut. Jeder Bakteriensuspension wurde 1,5 µl Plasmid-DNA hinzugefügt. Die Plasmid-DNA sollte eine Konzentration von 100 ng/µl nicht überschreiten. Durch vorsichtiges Auf-und Abpipettieren wurde der Ansatz vermischt und danach in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation wurde bei folgenden Bedingungen durchgeführt: 2,0 kV, 200 Ω, 25 µF Strom floss dabei zwischen 1,1-2,4 msec bei einer Spannung von 1,8 V. Nach erfolgreicher Transformation wurde die Küvette mit 1 ml LB-Medium ausgespült, die Lösung aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Bakteriensuspension wurde für 1 h bei 37 °C und 750 rpm im Thermomixer inkubiert.

#### Aufzucht von Bakterien

#### Herstellung von Selektivnährböden

Zur Herstellung eines halben Liters LB-Agar-Medium wurden 20 g LB-Agar-Trockenmedium abgewogen und in eine sterile Flasche gegeben. Anschließend wurde das LB-Medium mit 500 ml H<sub>2</sub>O in Lösung gebracht. Das Gemisch wurde autoklaviert und nach dem Abkühlen bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zur Weiterverarbeitung werden die Flaschen mit dem ausgehärteten LB-Medium in der Mikrowelle erhitzt, bis das Medium wieder flüssig ist. Bei einer Temperatur von weniger als 60 °C wird zur Herstellung eines Selektivnährbodens eine entsprechende Menge eines Antibiotikums hinzugefügt. Folgende Antibiotika fanden Verwendung: Carbenicillin 100 µg/ml, Spectinomycin 50 µg/ml und Kanamycin 50 µg/ml. Unter einer Sterilwerkbank wurden Petrischalen ausgelegt und diese dann mit entsprechendem Volumen an LB-Medium befüllt. Bei Raumtemperatur (RT) konnten die Selektivnährböden aushärten. Bis zur Verwendung wurden die Agarplatten auf 4 °C gelagert.

#### Aussaat der Bakterien auf Selektivnährböden

Nach einer einstündigen Inkubation im Thermomixer bei 37 °C wurden die transformierten Bakterien in die Sterilwerkbank überführt. 100 µl Bakteriensuspension pro Ansatz wurde steril auf einen

entsprechenden Selektivnährboden pipettiert und ausgestrichen. Nach kurzem Antrocknen erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C. Einzelne Kolonien konnten mit einer Pipettenspitze geerntet und in Flüssigkulturen zum weiteren Wachstum eingebracht werden.

#### Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur

Zur Herstellung eines Liters flüssigem LB-Medium wurden 25 g LB-Medium in eine sterile Flasche gegeben und mit 1000 ml H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Das Gemisch wurde autoklaviert und nach dem Abkühlen bei 4 °C gelagert. Ein gewünschtes Volumen LB-Medium wurde in einem separaten Gefäß mit einem entsprechenden Antibiotikum abhängig von der Resistenzkassette des zu amplifizierenden Plasmids versetzt. Die Flüssigkultur wurde entweder mit einem kleinen Volumen Bakteriensuspension oder mit einer Bakterienkolonie angeimpft. Bei einer Inkubation über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kam es zur Anreicherung der Bakterien.

### 2.2.2 Kultur von Säugetierzellen

#### Allgemeine Hinweise

Alle Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in Inkubatoren kultiviert. Die einzelnen Bearbeitungsschritte wurden alle unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Für Primärkulturen, Zelllinien und virale Infektionen wurden zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen verschiedene Sterilwerkbänke verwendet.

#### Kulturgefäße

Zur Kultivierung der Säugetierzellen wurden sowohl Flaschen mit 75 und 175 cm<sup>2</sup> Grundfläche als auch Multiwell-Platten mit 6 und 12 Wells verwendet.

#### Beschichtung der Kulturgefäße mit Kollagen

Gefäße, die zur Kultivierung von Kardiomyozyten verwendet wurden, wurden zuvor mit Kollagen I beschichtet.

Es wurde eine Kollagen I Stammlösung mit Kollagen I (50 µg/ml) und 0,01 M HCl hergestellt. Die Kulturgefäße wurden für 1 h bei RT oder über Nacht mit dieser Lösung in einer Konzentration von 5-10 µg/cm<sup>2</sup> beschichtet. Anschließend wurde die Lösung vorsichtig abgenommen und die Kulturgefäße zweimal mit Aqua ad injectabilia gewaschen. Die Kulturgefäße wurden bei RT luftgetrocknet und konnten entweder sofort verwendet werden oder circa eine Woche bei 2-8 °C aufbewahrt werden.



## Primärkultur von Kardiomyozyten

Für Untersuchungen an Kardiomyozyten wurden Primärkulturen von Kardiomyozyten aus neugeborenen Ratten, die höchstens drei Tage alt waren, angelegt.

### Isolation von ventrikulären Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten

Zur Herstellung der Primärkultur von ventrikulären Kardiomyozyten wurden pro Präparation bis zu 100 neonatale Ratten verwendet. Die Tiere stammen aus dem Wistar-Stamm und waren zwischen einem und drei Tagen alt. Mit einer 70 % (v/v) Ethanol-Lösung wurde der Thorax der Tiere gereinigt, die Ratten decapitiert und der Thorax mit einer Schere eröffnet. Die Herzen wurden entnommen und in eiskalten ADS-Puffer überführt. Die anhängenden Gefäße, Vorhöfe und Lungenreste wurden entfernt. Die Ventrikel wurden in eine neue Schale mit eiskaltem ADS-Puffer überführt. Nach Aufreinigung aller Ventrikel wurde der ADS-Puffer soweit abgenommen, dass die Herzen gerade noch mit Puffer bedeckt waren. Das Ventrikelgewebe wurde nun mit einer Schere zerkleinert. Die Gewebestücke wurden zum Vorverdau in einer 37 °C warmen Verdauung aufgenommen. Die Verdauung bestand aus 0,5 mg/ml Collagenase Typ 2 und 0,6 mg/ml Pankreatin in ADS-Puffer, die nach Ansetzen steril filtriert wurde. Pro 24 Herzen wurden 18-20 ml Verdau-Lösung eingesetzt. Die Kulturflasche mit den in Verdauung befindlichen Ventrikeln wurde unter Schütteln (40 rpm) in einem 37°C warmen Wasserbad für 20 Minuten inkubiert. Die Vorverdau-Lösung wurde abgenommen und verworfen.

Nun wurde frische Verdauung hinzugefügt, erneut 18-20 ml pro 24 Tiere, und die Kulturflasche bei 37 °C für 20 Minuten im Wasserbad inkubiert. Der Überstand wurde mit einer 25 ml Pipette aufgenommen und durch einen Sterilfilter in ein 50 ml Falcon Tube pipettiert. Anschließend wurde der Filter mit 10 ml NCS durchgespült, um die letzten Kardiomyozyten aus dem Filter zu waschen. Das Falcon-Tube mit dem Kardiomyozyten/NCS-Gemisch wurde bei 1000 rpm für 5 Minuten bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Zellpellet in 5-7 ml NCS resuspendiert und mit leicht geöffnetem Deckel im CO<sub>2</sub>-Brutschrank bis zum Ende des Verdaus gesammelt. Der Kulturflasche mit den Ventrikel-Gewebestückchen wurde erneut Verdauung zugefügt und für 20 Minuten im Wasserbad inkubiert. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis das Gewebe fast vollständig aufgelöst war. Dies beinhaltete in der Regel 4-5 Verdauschritte.

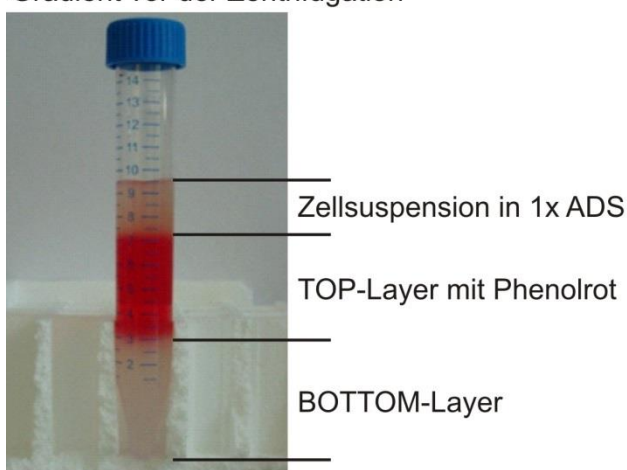
Nach vollständigem Verdau des Gewebes wurden die bereits gesammelten Zellpellets vereinigt und nochmals bei 1000 rpm für 5 Minuten bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in je 2 ml ADS pro Gradient resuspendiert.

## Aufreinigung von ventrikulären Kardiomyozyten aus neugeborenen Ratten

Bei der Isolation von Kardiomyozyten aus den Ventrikeln lösen sich auch Fibroblasten aus dem Gewebe. Um die Kardiomyozyten von den Fibroblasten und Erythrozyten abzutrennen, wurden die Zellen nach ihrer Dichte mit Hilfe des Percoll-Gradienten aufgereinigt. Alle Lösungen waren kalt und die Gradienten wurden nach der Herstellung bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert. Zunächst wurde eine Percoll-Stammlösung hergestellt, die sich für 4 Gradienten aus 27 ml Percoll und 3 ml 10 x ADS zusammensetzt. Daraus wurden zwei Lösungen unterschiedlicher Dichte generiert. Zunächst die Lösung mit der geringeren Dichte. Diese enthielt für 4 Gradienten 9 ml Stammlösung und 11 ml 1 x ADS-Puffer, der mit Phenolrot angefärbt worden war. Es wurden je 4 ml der Lösung mit der geringeren Dichte in ein 15 ml Falcon-Tube vorgelegt. Die Lösung mit der höheren Dichte bestand für 4 Gradienten aus 13 ml Stammlösung und 7 ml farblosem 1 x ADS. Je 3 ml der Lösung mit der höheren Dichte wurden mit Hilfe einer Stabpipette durch die vorgelegte Lösung auf den Boden des 15 ml Falcon-Tubes hinzupipettiert. Die Phasen durften sich nicht durchmischen und die Gradienten keine Luftbläschen enthalten, da sonst die Auftrennung gestört wurde.

Die Zellsuspension wurde vorsichtig auf die 4 Gradienten verteilt. Die Gradienten wurden in der vorgekühlten Zentrifuge bei 4 °C für 30 Minuten bei 2400 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation zeigte der Gradient drei Phasen. Zwischen oberer und mittlerer Phase sammelten sich die Fibroblasten, sodass die obere Phase sauber abgesaugt und verworfen werden konnte. Die Kardiomyozyten befanden sich am Übergang zwischen mittlerer und unterer Phase und wurden abgenommen und in einem 50 ml Tube gesammelt. Die Erythrozyten sammelten sich als Pellet am Boden der Gradienten.

Gradient vor der Zentrifugation



Gradient nach der Zentrifugation

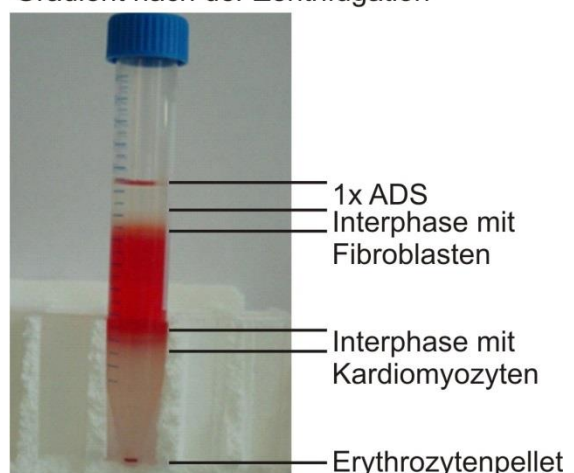


Abbildung 6: Darstellung der Gradienten vor und nach der Zentrifugation

Die 50 ml Tubes mit den gesammelten Kardiomyozyten wurden mit ADS auf 50 ml aufgefüllt und bei RT für 5 Minuten bei 1000 rpm abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt, dann wurde das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert und auf 40 ml Lösung aufgefüllt.

#### Aussaat von ventrikulären Kardiomyozyten aus neugeborenen Ratten

Zunächst musste die Zellzahl der Lösung bestimmt werden. Dies geschah nach der Methode von Neubauer. Dazu wurden 25  $\mu$ l Zellsuspension und 25  $\mu$ l Trypanblau in einem Eppendorf-Tube vermischt. Das Trypanblau färbt tote Zellen blau an, so dass diese bei der Zählung ausgenommen werden konnten. Die Neubauer-Zählkammer wurde vorbereitet und mit der gefärbten Zellsuspensionslösung aufgefüllt. Nach nachstehendem Schema werden die Zellen (schwarz) in einem Großquadrat der Zählkammer mäanderförmig ausgezählt.

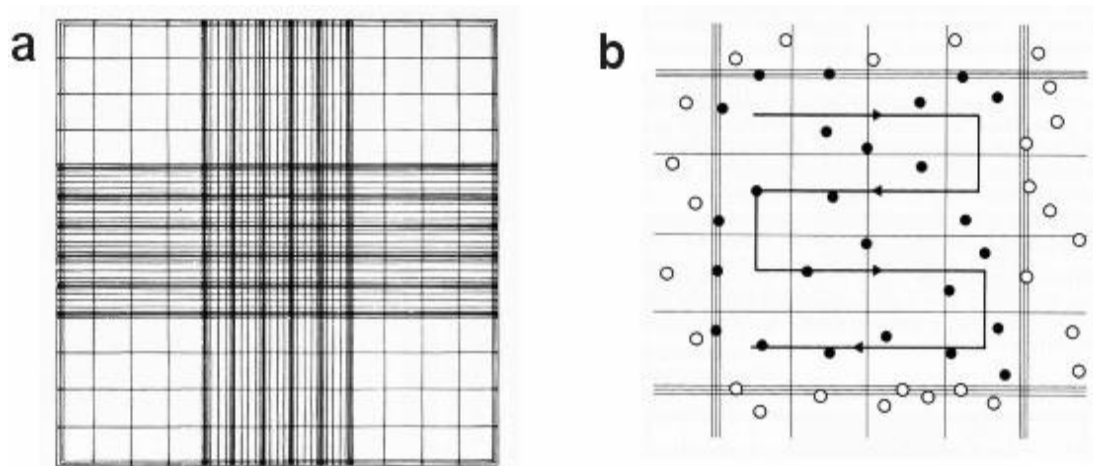


Abbildung 7: A) Darstellung der Neubauer-Zählkammer B) Schema zum Auszählen der Zellen

Pro Well einer 6-Well-Platte wurden 1.000.000 Zellen für die spätere Proteinverarbeitung und 600.000 Zellen pro Well für die spätere RNA-Verarbeitung eingesetzt. Für die Immunfluoreszenz wurden 12-Well-Platten mit Kollagen beschichteten Coverslips bestückt und mit zwischen 50.000 bis 150.000 Zellen pro Well gefüllt.

#### Kultur von HEK293A-Zellen

HEK293A ist eine humane Zelllinie. Die Zellen wachsen adhärent in einer singulären Schicht (monolayer) auf dem Boden des Kulturgefäßes und können gut in serumfreiem Medium kultiviert werden. Zur Kultivierung werden die Zellen im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> aufbewahrt.

### Auftauen von Zellen

Die HEK-Zellen wurden bei - 80 °C in Medium + 10 % DMSO kryokonserviert und bei Bedarf wieder aufgetaut, um Zellkulturversuche mit HEK-Zellen in der Passage 5 bis 25 durchführen zu können. Die Kryoröhrchen wurden aus dem Stickstoffbehälter entnommen und sofort in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt. Nach dem Auftauen wurde das Kryogefäß mit 70 % Ethanol kurz desinfiziert und anschließend unter die Sterilbank gebracht. Der Inhalt wurde in ein 50 ml Tube überführt und tropfenweise 10 ml DMEM-Medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) vorsichtig dazu gegeben. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 1000 rpm in einer Tischzentrifuge wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet mit Medium resuspendiert und auf ein bis zwei Zellkulturflaschen mit frischem DMEM-Medium verteilt. Nach 24 Stunden erfolgte ein Medienwechsel.

### Passagieren von Zellen

Die HEK-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70-80 % im Abstand von drei bis vier Tagen 1:6 geteilt. Nach Absaugen des alten Mediums und einer einmaligen Waschung der Zellen mit 5 ml PBS wurden 5 ml vorgewärmte 0,25 % (w/v) Trypsin-EDTA-Lösung auf dem Zellrasen verteilt und 2-3 Minuten bei RT inkubiert. EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) bindet dabei die Calcium-Ionen, sodass sich die Zellen von der Oberfläche lösen. Nach leichtem Abklopfen der Zellen wurde 10 ml frisches Medium mit 10 % FCS zugegeben um die Trypsinierung zu stoppen. Die Zellsuspension wurde in einem 50 ml Tube für 5 Minuten bei 1000 rpm abzentrifugiert, das Zellpellet mit neuem Medium aufgenommen und mit einem Verdünnungsfaktor von 1:6 in neue Kulturflaschen gegeben. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator.

### Langzeitlagerung von kryokonservierten Zellen

Das Zellpellet einer Kulturflasche wurde in 1 ml Einfriermedium (9 ml DMEM und 1 ml DMSO) resuspendiert und in ein 1 ml Tiefgefrieröhrchen pipettiert. Die Einfrieröhrchen mussten mit Medium vollgefüllt und absolut dicht verschlossen sein und wurden in eine Kryobox (NalgeneCryo Freezing Container), die mit Isopropanol befüllt war, gestellt. Die Box wurde bei - 80 °C für 24 h gelagert und gewährleistete eine konstante Kühlungsrate von - 1 °C pro Minute. Danach wurden die Einfrieröhrchen bei - 196 °C in flüssigem Stickstoff langfristig gelagert.

### Transfektion von Säugetierzellen mit Plasmid-DNA

Für die Transfektion von Plasmid-DNA in Säugetierzellen wurde Lipofectamine 2000 verwendet. Die HEK293A-Zellen wurden bei einer Dichte von 70-90 % transfiziert. Das Kulturmedium zur

Transfektion wurde ohne Antibiotika verwendet. Die Transfektion erfolgte unter einer Sterilwerkbank.

Für die Transfektion zur Herstellung von Adenoviren wurden zunächst 1 µg PAC-I-verdaute Plasmid-DNA und 250 µl DMEM (ohne FCS und Antibiotikum) in einem 2 ml Tube inkubiert. In einem weiteren 2 ml Tube wurden 3 µl Lipofectamine 2000 und 250 µl DMEM (ohne FCS und Antibiotikum) inkubiert. Die Inkubation fand für 5 Minuten bei RT statt. Beide Ansätze wurden anschließend zusammen pipettiert und erneut bei RT für 20 Minuten inkubiert.

In der Zwischenzeit erfolgte ein Medienwechsel der vorbereiteten HEK293A-Zellen auf DMEM mit Glukose und 10 % FCS. Nach der Inkubation wurde der Lipofectamine 2000-DNA-Komplex tropfenweise einem Well zugefügt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Medienwechsel auf DMEM mit Glukose, 10 % FCS und Penicillin/Streptomycin, um einen zytotoxischen Effekt zu vermeiden.

### 2.2.3 Molekularbiologische Arbeitsmethoden - DNA

Extraktion von DNA aus einer Mäuseschwanzbiopsie

Die Mäuseschwanzbiopsie wurde über Nacht bei 55 °C in 700 µl SNET-Puffer und 7 µl 20 mg/ml Proteinase K verdaut. Nach einer Zugabe von 700 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol wurde durch gründliches Vortexen eine Vermischung der Probe erreicht. Um eine Phasentrennung herbeizuführen, wurde die Probe bei 14.000 rpm für 5 Minuten bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in ein neues Tube überführt. Zur weiteren Aufreinigung der Probe wurden 700 µl Chloroform hinzugefügt und die beiden Phasen durch erneutes Vortexen gründlich vermischt. Eine anschließende Zentrifugation bei 14.000 rpm für 3 Minuten bei RT führte zur Phasentrennung. Die obere Phase wurde in ein neues Tube überführt. Zur weiteren Aufarbeitung wurden 700 µl Isopropanol hinzugefügt und die Probe durch Invertieren des Tubes gemischt. Jetzt fiel die DNA sichtbar aus. Die Probe wurde bei 14.000 rpm für 5 Minuten bei RT zentrifugiert, so dass sich ein DNA-Pellet am Boden des Tubes bildete. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 700 µl 75 % Ethanol gewaschen. Die Probe wurde erneut bei 14.000 rpm für 3 Minuten bei RT zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das DNA-Pellet wurde für 10 Minuten bei RT getrocknet und dann in 50 µl ddH<sub>2</sub>O über Nacht bei 4 °C resuspendiert.

Amplifikation der DNA

Zur Amplifikation von DNA wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) verwendet. Die PCR wurde beim Genotypisieren der Mäuse oder zur Analyse der Plasmid-DNA aus Bakterien genutzt. Für den

Reaktionsansatz wurden die DreamTaq Polymerase und der 10 x DreamTaq-Puffer von Thermo Scientific verwendet, dNTPs, ddH<sub>2</sub>O und ein Primerpaar. Als Template wurde entweder genomische DNA oder Plasmid-DNA in die Reaktion eingesetzt. Zur Amplifikation der DNA wurde ein Standardprogramm verwendet. Dies wurde abhängig von der Templatekonzentration, Templatelänge und Annealing-Temperatur der Primer variiert.

**Tabelle 1 Reaktionsansatz der PCR**

Reagenz	Volumen [ $\mu$ l]
ddH <sub>2</sub> O	42,55
Dream Taq (U/ $\mu$ l)	0,25
dNTPs (10 mM)	1,00
10x Dream Taq Puffer	5,00
Primer forward (100 $\mu$ M)	0,10
Primer revers (100 $\mu$ M)	0,10
Template DNA	1,00
Summe	50,00

**Tabelle 2 Temperaturprofil der PCR**

	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Zeit [min]	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5	1
Denaturierung	95	0,5	
Annealing	60	0,5	
Elongation	72	1	30-35
Finale Elongation	72	10	1
Kühlen	4	$\infty$	1

#### Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien in kleinem Maßstab

Zur quantitativen Extraktion von Plasmid-DNA wurde das Nucleo-Spin Plasmid Kit von Macherey-Nagel verwendet. Zunächst wurde der AE Puffer auf 70  $^{\circ}$ C und der AW Puffer auf 50  $^{\circ}$ C erwärmt. Aus einer gesättigten E.coli LB-Kultur wurden 4 ml Flüssigkeit entnommen und in ein steriles Tube gegeben. Das Tube wurde 30 Sekunden bei 11.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es wurden 250  $\mu$ l Puffer A1 hinzugefügt und das Pellet durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Anschließend wurden 250  $\mu$ l alkalischer Lysepuffer A2 hinzugefügt und die Bakteriensuspension durch achtmaliges Invertieren vermischt. Zur Lysereaktion wurde die Probe für 5 Minuten bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 300  $\mu$ l Puffer A3 und achtfache Inversion wurde die Lösung neutralisiert. Hierbei fiel die chromosomale DNA aus. Durch Zentrifugation bei 11.000 g für 5 Minuten bei RT wurde die Plasmid-DNA von der chromosomalen DNA getrennt. Für jede Probe wurde eine Säule in einem Sammelröhrchen platziert und der Überstand der Probe wurde vorsichtig auf die Membran

der Säule gegeben. Die Säule wurde bei 11.000 g für 5 Minuten bei RT zentrifugiert, sodass die Plasmid-DNA an der Säulenmembran binden konnte. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurden 500 µl vorgewärmter AW Puffer auf die Säule gegeben und erneut bei 11.000 g für 1 Minute bei RT zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Mit 600 µl Puffer A4 und einminütiger Zentrifugation bei 11.000 g bei RT wurde die Plasmid-DNA gewaschen. Durch erneute Zentrifugation für 2 Minuten bei 11.000 g wurde die Säulenmembran getrocknet und die Rückstände des ethanolhaltigen Waschpuffers aus der Membran gelöst. Um die Plasmid-DNA zu eluieren, wurden 50 µl AE Puffer auf die Membran gegeben, für eine Minute bei RT inkubiert und anschließend bei 11.000 g für eine Minute zentrifugiert. Die isolierten Plasmide wurden bis zur Weiterverarbeitung auf Eis oder bei - 20 °C gelagert.

#### Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien in großem Maßstab

Zur quantitativen Präparation von Plasmid-DNA wurde das Plasmid Maxi Kit von Qiagen verwendet. Zur Vorbereitung wurde Puffer P1 und P3 im Kühlschrank bei 4 °C vorgekühlt und Puffer QF auf 65 °C im Inkubator erwärmt. Aus einer LB-Flüssigkultur wurden 200 ml Bakteriensuspension in sterile Nalgenetubes überführt und bei 4.700 g für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Bakterienpellet in 12,5 ml Puffer P1 resuspendiert. Anschließend wurden 10 ml Lysepuffer P2 hinzugegeben und die Suspension durch sechsmaliges Invertieren vermischt. Die Inkubation erfolgte für 5 Minuten bei RT. Um die Lysereaktion zu beenden, wurden 10 ml kalter Puffer P3 zugefügt und durch sechsmaliges Invertieren gemischt. Die Bakteriensuspension wurde für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Hierbei bildete sich ein aus genomischer DNA, Proteinen, SDS und Zellfragmenten bestehendes flockiges, weißes Material. Um die Plasmid-DNA abzutrennen wurde die Probe bei 24.000 g für 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein sauberes Nalgenetube überführt. In einem zweiten Zentrifugationsschritt bei 24.000 g für 15 Minuten bei 4 °C wurde die Probe aufgereinigt. Während der Zentrifugation wurden die Quiagen-tip 500 Säulen mit 10 ml QBT äquilibriert. Das Lysat wurde auf die Säule gegeben, so dass die Plasmid-DNA an die Säule binden konnte. Die Membran wurde zweimal mit je 30 ml Puffer QC gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde nun mit 15 ml QF in ein steriles Nalgenetube eluiert. Eine Zugabe von 10,5 ml (0,7 vol) 100 % Isopropanol und die anschließende Zentrifugation bei 17.500 g für 30 Minuten bei 4 °C führte zur DNA-Präzipitation. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde mit 5 ml endotoxinfreiem 70 % Ethanol gewaschen. Die Probe wurde erneut bei 17.500 g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde bei RT getrocknet und danach in 200 µl 1 x TE resuspendiert. Die Plasmid-DNA wurde bei - 20 °C gelagert.

## 2.2.4 Molekularbiologische Arbeitsmethoden - RNA

### Allgemeine Hinweise

Beim Arbeiten mit RNA wurden vor Arbeitsbeginn der Arbeitsplatz und alle Pipetten mit 70 % Ethanol und DEPC-Wasser (Diethylcarbonat) gereinigt. Alle Verbrauchsmaterialien waren RNase-frei. Es wurden nur gestopfte Pipettenspitzen verwendet. Die Geräte wurden nur für das Arbeiten mit RNA verwendet. Alle Lösungen und Gefäße wurden mit 0,1 % (v/v) DEPC unter Rühren über Nacht bei RT inkubiert und danach zur Inaktivierung des DEPC autoklaviert.

### Extraktion von RNA aus Zellen

Das Kulturmedium DMEM wurde von der Zellkultur abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Pro Well einer 6-Well-Platte wurde 1 ml TRIzol-Reagenz zugefügt und die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden abgelöst. Die Zellsuspensionen wurden in je ein 1,5 ml-Tube überführt und bei RT für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden je 200 µl Chloroform hinzugefügt und die Proben per Hand gut geschüttelt. Eine Phasentrennung wurde durch Zentrifugation bei 12.000 g für 15 Minuten bei 4 °C erreicht. Nun enthielt die obere wässrige Phase die RNA, die Interphase Protein und die untere rötliche Phase DNA. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Tube überführt. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und Inkubation für 10 Minuten auf Eis wurde die RNA ausgefällt. Nach der Zentrifugation bei 12.000 g für 10 Minuten bei 4 °C hatte sich ein RNA-Pellet am Tubeboden abgesetzt. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 1 ml 75 % Ethanol in DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Proben wurden bei 7.500 g für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet bei RT getrocknet und anschließend durch Auf- und Abpipettieren in 30 µl DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert. Danach wurden die Proben für 10 Minuten bei 55 °C unter Schütteln inkubiert. Die RNA wurde bei - 80 °C gelagert.

### Extraktion von RNA aus Gewebe

Zur Isolation von RNA aus dem Myokard der Maus wurde bis zu 100 mg Gewebe, das in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei - 80 °C gelagert wurde, verwendet. Dem Gewebestück wurde je 1 ml TRIzol-Reagenz hinzugefügt und mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Das Homogenat wurde in ein Tube überführt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Der Ultra-Turrax wurde für jede neue Probe in 70 % Ethanol und DEPC-H<sub>2</sub>O gereinigt. Anschließend wurden je Probe 200 µl Chloroform hinzugefügt und die Tubes von Hand geschüttelt. Die Proben wurden für 3 Minuten bei RT inkubiert. Durch Zentrifugation bei 12.000 g für 15 Minuten bei 4 °C wurde eine Phasentrennung herbeigeführt. Der Überstand wurde in ein neues Tube überführt und weiterverarbeitet. Durch Zugabe von 500 µl



Isopropanol wurde die Fällung der RNA induziert. Die beiden Flüssigkeiten wurden durch Schütteln der Tubes vermischt und dann für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Proben wurden bei 12.000 g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, so dass sich ein Pellet bildete. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 75 % Ethanol in DEPC-H<sub>2</sub>O gewaschen und für 5 Minuten bei 7.500 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett verworfen, das Pellet wurde bei RT getrocknet und durch Auf- und Abpipettieren in DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die RNA wurde für 10 Minuten bei 55 °C unter Schütteln inkubiert. Die RNA wurde bei - 80 °C gelagert.

#### Reverse Transkription von RNA (RNA-Aufreinigung und cDNA-Sythese)

Um Verunreinigungen der RNA durch DNA zu beseitigen, wurde ein DNase Verdau mit DNaseI und eine Phenol-Chloroform-Aufreinigung durchgeführt. Dazu wurden 5 µg RNA in 40 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und 5 µl 10-fach konzentrierter Reaktionspuffer sowie 5 µl DNaseI für ein finales Probenvolumen von 50 µl hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde für 15 Minuten bei RT inkubiert und anschließend mit 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O auf 100 µl Probenvolumen aufgefüllt. Um die RNA zu extrahieren, erfolgte eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Aufreinigung. Der Probe wurden 100 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol hinzugefügt und die Phasen durch Vortexen vermischt. Durch Zentrifugation bei 14.000 rpm für 10 Minuten bei 4 °C wurde eine Phasentrennung erreicht. Der Überstand wurde in ein neues Tube überführt. Mit 300 µl Ethanol und 10 µl 3 M Natrium-Acetat pro Reaktionsansatz wurde die RNA für 30 Minuten bei - 20 °C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 14.000 rpm für 40 Minuten bei 4 °C wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 75 % Ethanol gewaschen und danach bei 14.000 rpm für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen, das Pellet bei RT getrocknet und in 10 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Die eigentliche reverse Transkription mit Generierung von komplementärer DNA (cDNA) wurde mit dem SuperScript III First Strand Synthesis System von Life Technologies in 0,5 ml Tubes durchgeführt. Der Reaktionsansatz kann aus Tabelle 3 entnommen werden.

**Tabelle 3 Reaktionsansatz für Schritt 1 der reversen Transkription**

Reagenz	Volumen [µl]
RNA (1 µg) (mit DEPC-H <sub>2</sub> O aufgefüllt)	11,5
Random Hexamer Primer (250 ng/µl)	0,5
dNTPs (10 mM)	1,0
Summe	13,0

Die Tubes wurden abzentrifugiert und für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert, dann auf Eis gelagert. Pro Tube wurden die Reagenzien aus Tab. 4 hinzugefügt.

**Tabelle 4 Reaktionsansatz für Schritt 2 der reversen Transkription**

Reagenz	Volumen [ $\mu$ l]
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,5
5 x RT-Puffer	4,0
DTT (0,1 M)	1,0
Rnase OUT (40 U/ $\mu$ l)	1,0
Super Script TM III RT (200 U/ $\mu$ l)	0,5
Summe	7,0

Die Proben wurden nach folgendem Temperaturprofil (Tab. 5) behandelt.

**Tabelle 5 Temperaturprofil für die reverse Transkription**

Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Dauer [min]
25	10
50	60
70	15

Nach der cDNA-Synthese wurde pro Tube 1  $\mu$ l RNaseH (5.000 U/ml) hinzugefügt und zunächst für 20 Minuten bei 37  $^{\circ}$ C inkubiert. Dann erfolgte eine Inaktivierung des Enzyms bei 65  $^{\circ}$ C für 20 Minuten. Die cDNA wurde mit 79  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O auf 100  $\mu$ l aufgefüllt und bei - 20  $^{\circ}$ C gelagert.

#### Real-time PCR

Zur Quantifizierung der Transkripte von Genen wurde die quantitative Real-Time-PCR (rt-PCR, qPCR). Verwendet wurde dafür der Express SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal von Life Technologies. SYBR Green ist ein Fluoreszenz-Farbstoff, der doppelsträngige DNA bindet. Die Intensität des Farbstoffsignals ist proportional zur DNA Konzentration. Um die Anzahl der Transkripte eines Gens zu messen, wurden spezifische Primer für die Amplifikation eingesetzt. Die Größe eines Amplikons sollte zwischen 75 bp (Basenpaaren) und 250 bp liegen. Um die Amplifikation von genomischer DNA zu verhindern, wurde ein Intron-überspannendes Amplikon gewählt. Als Referenzgene wurden Primerkombinationen für 18S rRNA oder Rlp32 rRNA eingesetzt. Alle verwendeten Materialien und Proben wurden die ganze Zeit auf Eis gelagert. Zunächst wurde ein Mastermix aus SYBR-Green und Wasser hergestellt und dieser vorsichtig vermischt. Der Mastermix wurde in so viele Tubes aufgeteilt, wie Primerpaare vorhanden waren. Diesen Tubes wurden dann die entsprechenden Primerpaare hinzugefügt (Tab. 6).

**Tabelle 6 Reaktionsansatz für die Real Time PCR**

Reagenz	Volumen pro Ansatz [ $\mu$ l]
Express SYBR Green ER qPCR SuperMix Universal	10,0
ddH <sub>2</sub> O	7,2
Primer forward	0,4
Primer reverse	0,4
Template cDNA	2,0
Final Volume	20,0

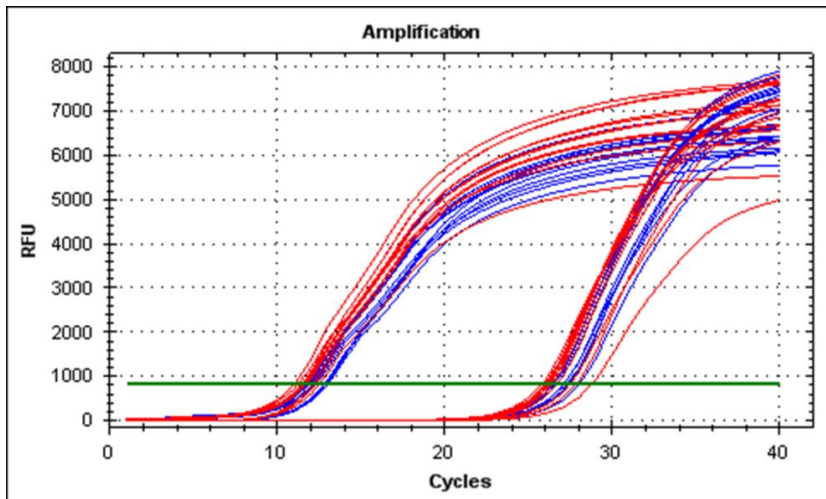
Dann wurde der Mastermix in eine spezielle Real Time PCR-Platte eingefügt. Zum Schluss wurde die cDNA hinzu pipettiert. Jede Messung erfolgte im Duplikat oder Triplet.

Dann wurde die Real Time PCR-Platte mit einer Schutzfolie verschlossen, kurz zentrifugiert und anschließend in den Light Cycler gestellt. Für die Messung im Gerät wurde folgendes Programm (Tab. 7) verwendet.

**Tabelle 7 Temperaturprofil für die Real Time PCR**

Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Dauer [sec.]	Anzahl der Zyklen
50	120	1
95	30	1
95	5	
60	30	40
95	10	1

Bei den Messungen wurden pro Reaktionsansatz und Zyklus der PCR die relativen Fluoreszenzeinheiten bestimmt. Zur Quantifizierung wurde der Threshold Cycle (CT, Schwellen-Zyklus) herangezogen. Dabei steigt die Intensität des Lichtsignals zum ersten Mal signifikant über die der Hintergrundfluoreszenz an. Um akkurate Ergebnisse zu erzielen, sollte der Threshold Cycle im exponentiellen Teil der PCR liegen.



**Abbildung 8: Beispiel für die Auswertung einer realtime PCR.** Gemessen wurde 18S und Nppa. Die blauen Kurven stehen für die Messung in einer Wildtierpopulation, die roten Kurven für Messungen in FYCO1-KO-Mäusen. Die grüne Linie gibt den Threshold Cycle an.

Für die Normalisierung und relative Quantifizierung der Genexpression wurde die  $\Delta\Delta CT$ -Methode verwendet. Zunächst wird die Differenz aus dem CT-Wert für das Referenzgen und dem CT-Wert für das Zielgen einer bestimmten Versuchsbedingung gebildet. Dies nennt man dann  $\Delta CT$ .

Für die relative Quantifizierung wurden die  $\Delta CT$ -Werte zweier cDNAs, also zweier unterschiedlicher Versuchsbedingungen, meist einer Kontroll- und einer Versuchsgruppe, herangezogen. Es wurde also die Differenz aus beiden  $\Delta CT$ -Werten gebildet,  $\Delta\Delta CT$ . Um diesen Wert als n-fache Regulation ausdrücken zu können, wurde folgende Formel benutzt:  $x = 2^{-\Delta\Delta CT}$ .

## 2.2.5 Molekularbiologische Arbeitsmethoden - Protein

### Extraktion von Protein aus Zellen

Nach erfolgter Behandlung der Kardiomyozyten wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen zweimalig mit eiskaltem PBS gewaschen. Pro Well einer 6-Well-Platte wurden 130  $\mu$ l Lyse-Puffer eingesetzt und die Zellen mit einem Zellschaber von ihrer Unterlage abgelöst. Der Puffer mit den Zellen wurde nun in ein Tube überführt. Um die Zellmembran zu zerstören und somit die Proteine freizusetzen wurde die Probe in flüssigen Stickstoff gehalten, bis die Flüssigkeit komplett durchgefroren war. Dann wurde die Probe in einem Thermocycler bei 37 °C wieder aufgetaut. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C für 20 Minuten bei 18.000 g zentrifugiert und der Überstand mit den Proteinen in ein neues Tube überführt. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben auf Eis oder bei -80 °C gelagert.

## Extraktion von Protein aus Gewebe

Um Protein aus dem Myokard von Mäusen zu isolieren, wurde den Tieren post mortem das Herz entnommen und ein Teil des Gewebes in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde das Gewebe auf Eis oder bei - 80 °C gelagert. Dem Gewebe wurde 1 ml Lyse-Puffer hinzugefügt. Mit einem Ultra-Turrax wurde das Gewebe homogenisiert und anschließend bei 4 °C für 20 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml-Tube überführt.

## Messung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wird durch die Methode nach Bradford ermittelt. Zunächst wurde eine Standardreihe (STD) mit BSA erstellt und Verdünnungen mit Lyse-Puffer in folgenden Konzentrationen angelegt: STD1 = 2,56 µg/µl, STD2 = 1,28 µg/µl, STD3 = 0,64 µg/µl, STD4 = 0,32 µg/µl. Alle Proben werden im Triplikat gemessen und nach folgendem Schema (Tab. 8) ersichtlich in die Messkassette pipettiert.

**Tabelle 8 Pipettierschema für die Proteinmessung nach Bradford.** Dabei werden der Standard STD1-STD4 und alle Proben P1-P27 im Triplet gemessen. Die drei Messwerte der Proteinkonzentration werden gemittelt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	P4	P4	P4	P12	P12	P12	P20	P20	P20
B	STD1	STD1	STD1	P5	P5	P5	P13	P13	P13	P21	P21	P21
C	STD2	STD2	STD2	P6	P6	P6	P14	P14	P14	P22	P22	P22
D	STD3	STD3	STD3	P7	P7	P7	P15	P15	P15	P23	P23	P23
E	STD4	STD4	STD4	P8	P8	P8	P16	P16	P16	P24	P24	P24
F	P1	P1	P1	P9	P9	P9	P17	P17	P17	P25	P25	P25
G	P2	P2	P2	P10	P10	P10	P18	P18	P18	P26	P26	P26
H	P3	P3	P3	P11	P11	P11	P19	P19	P19	P27	P27	P27

In Reihe A1-3 werden je 2 µl ddH<sub>2</sub>O pipettiert, in Reihe B1-3 werden je 2 µl STD1 pipettiert, in Reihe C1-3 werden je 2 µl STD2 pipettiert, in Reihe D1-3 werden je 2 µl STD3 pipettiert und in Reihe E1-3 werden je 2 µl STD4 pipettiert. In den darauffolgenden Reihen werden je 2 µl Probe jeweils im Triplet in die Messkassette vorgelegt.

Als nächstes wurden 10 ml Bradford-Reagenz und 40 ml ddH<sub>2</sub>O in einem Falcon gemischt und mit einem Papierfilter steril in ein 50 ml-Tube filtriert. Mit einer Multipipette wurden pro Probe 200 µl Bradford-ddH<sub>2</sub>O-Reagenz hinzugefügt und für 5 Minuten bei RT zur Inkubation auf den Schüttler gestellt. Im Tecan infinite M200 PRO wurde die Proteinkonzentration mittels Absorptionsmessung bei 596 nm mit einem Spectrophotometer gemessen. Durch die Konzentrationsmessung in der Standardreihe konnte die Proteinkonzentration der Proben errechnet werden.

## SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Eine Standardmethode zur Auftrennung von Proteinen ist die Gelelektrophorese. Durch die Verwendung von Natriumdodecyl-Sulfat (SDS), welches sich an die Proteine anlagert und ihnen eine einheitliche negative Ladung verleiht, ist eine Auftrennung nach dem Molekulargewicht möglich. Das verwendete Gel bestand aus einem Sammelgel, das die eigentliche Probe in einer Linie konzentriert und dem eigentlichen Trenngel mit höherer Dichte, das der Auftrennung dient.

Zur Gelelektrophorese wurde das SDS-PAGE BioRad Mini-Protean System verwendet. Zunächst wurden zwei Glasplatten mit 70 % (v/v) Ethanol gereinigt und in den vorgesehenen Rahmen gespannt. Dann wurde ein Trenngel gemischt (Tab. 9). Abhängig vom Molekulargewicht des zu detektierenden Proteins wurde für das Trenngel entweder ein niedriger Anteil Acrylamid gewählt, so z.B. bei der Detektion von FYCO1, einem 167 kDa großen Molekül (6 % Gel), oder ein hoher Anteil z.B. bei der Proteinauftrennung von LC3-I oder LC3-II, einem 14 bzw. 16 kDa kleinen Molekül (12 % Gel). Pro Gel wurden 10 ml Trenngellösung in einem 50ml-Falcon hergestellt, wobei die einzelnen Anteile von 30 % Acrylamide/bisacrylamide, 2,5 x Separating Gel Puffer und ddH<sub>2</sub>O Tabelle 9 entnommen werden können. Zuletzt wurde TEMED und 10 % (w/v) APS hinzugefügt, was zur Polymerisation der Lösung führte.

**Tabelle 9 Zusammensetzung von 10 ml Separating-Gels abhängig von der Prozentzahl des Gels**

<b>10ml Separating Gel:</b>				
<b>Percent Gel</b>	<b>Range of Separation</b>	<b>30 % Acrylamide/bis-acrylamide [ml]</b>	<b>2.5 x Separating Gel Buffer [ml]</b>	<b>ddH<sub>2</sub>O [ml]</b>
4		1,3	4,0	4,7
5	57-212 kDa	1,7	4,0	4,3
6		2,0	4,0	4,0
7		2,3	4,0	3,7
7,5	36-94 kDa	2,5	4,0	3,5
8		2,7	4,0	3,3
9		3,0	4,0	3,0
10	16-68 kDa	3,3	4,0	2,7
11		3,7	4,0	2,3
12		4,0	4,0	2,0
13		4,3	4,0	1,7
14		4,7	4,0	1,3
15	12-43 kDa	5,0	4,0	1,0
16		5,3	4,0	0,7
17		5,7	4,0	0,3
TEMED	5 µl			
10 % APS	50 µl			

Zirka 8 ml der Lösung wurden zwischen die beiden Glasplatten gegossen und mit 1 ml Isopropanol überschichtet, um einen geraden Abschluss des Gels zu erhalten. Der Polymerisationsvorgang dauerte etwa 30 Minuten, dann wurde das Isopropanol abgegossen. Anschließend wurden alle Komponenten des Sammelgels zusammenpipettiert, wobei TEMED und 10 % APS wieder zuletzt hinzugefügt wurden. Pro Gel reichte ein Volumen von 2,5 ml, die Anteile der Komponenten sind Tabelle 10 zu entnehmen. Nach gründlichem Mischen wurde die Lösung in den Zwischenraum auf das Trenngel gegossen, bis dieser gefüllt war.

**Tabelle 10 Zusammensetzung von 2,5 ml und 5 ml Sammelgel**

<b>Stacking Gel:</b>	<b>5 ml</b>	<b>2.5 ml</b>
30 % Acrylamide/bis-acrylamide	0,85	0,425
5 x Stacking Gel Buffer	1,00	0,500
dH2O	3,15	1,575
	5 ml	2,5 ml
TEMED [ $\mu$ l]	5	2,5
10 % APS [ $\mu$ l]	25	12,5

Dann wurde ein Kamm mit entsprechender Zahnzahl zur Ausbildung von Probestaschen vorsichtig eingefügt. Das Gel härtete nun für etwa 30 Minuten aus. Anschließend wurde das Gel zwischen den beiden Glasplatten vertikal in eine Elektrophoresekammer eingespannt und die Kammer mit 1 x Elektrophorese-Puffer aufgefüllt. Der Kamm wurde aus dem Gel entfernt und die Taschen mit einer feinen Spritze mit dem Puffer ausgespült.

Pro Probe wurden zwischen 15-30  $\mu$ g Protein in ein Tube vorgelegt, ein entsprechendes Volumen an 4 x Auftragspuffer hinzugefügt und anschließend für 5 Minuten bei 90 °C im Thermoblock inkubiert. Danach wurden die Proben kurz abzentrifugiert und ein entsprechendes Volumen (Tab. 11) in die Geltaschen eingefüllt. Entsprechendes geschah für die Farbmarder.

**Tabelle 11 Das Probenvolumen, das in die Taschen pipetiert wurde, ist abhängig von der Anzahl der Taschen und vom Abstand der beiden Glasplatten, zwischen die das Gel eingefüllt wurde.**

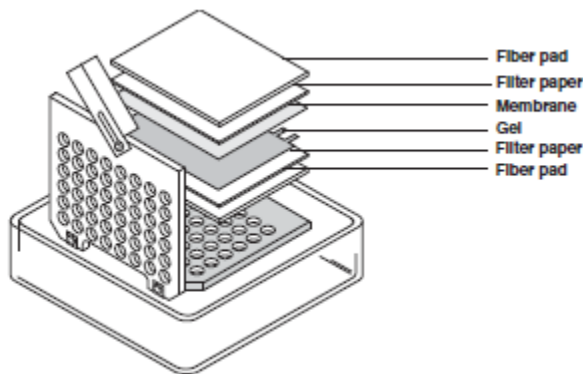
# wells	Well Width [mm]	Sample Volume [ $\mu$ l]		
		0.75 mm	1.0 mm	1.5 mm
5	12,7	70	105	160
9	5,08	33	44	66
10	5,08	33	44	66
15	3,35	20	26	40
<b>Gel Volume</b>		4,2	5,6	8,4

Die Elektrophorese wurde bei 120 V durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Bande die untere Kante der Glasscheibe erreicht hatte. Das Gel wurde aus der Kammer entnommen, das Sammelgel entfernt und das Trenngel zum Immunoblotten weiter verwendet.

## Immunoblotting

### Elektrotransfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran

Zum Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran wurde die Mini Trans-Blot Cell von Bio-Rad verwendet. Das SDS-Polyacrylamid-Gel wurde aus dem Rahmen gelöst, das Sammelgel abgetrennt und in Transferpuffer gelegt. Dann wurde ein „Sandwich“ aus Schwämmen, Filterpapier, PVDF-Membran und Gel in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer nach folgendem Schema (Abb. 9) zusammengebaut. Auf einen Flügel der Transferkassette wurde ein Schwamm gelegt, darauf dann Filterpapier, welches kurz in Transferpuffer eingelegt wurde, und schließlich das Gel. Die PVDF-Membran wurde in 100 % Methanol aktiviert, mit ddH<sub>2</sub>O abgespült und in Transferpuffer gelegt. Anschließend wurde die PVDF-Membran glatt und Luftblasen frei auf das Gel gelegt und mit Filterpapier bedeckt. Mit einer Stabpipette wurden vorsichtig die restlichen Luftblasen zwischen den Schichten durch Rollen entfernt. Zuletzt wurde der Schwamm aufgelegt und die Transferkassette verschlossen.



**Abbildung 9:** Darstellung einer Transferkassette, die beim Western Blot verwendet wurde; zu beachten ist die richtige Reihenfolge beim aufeinander Stapeln der Einzelteile

Die Transferkassette wurde in das Tank-Transfer-System eingespannt, wobei auf die elektrische Stromrichtung geachtet werden musste, und der Tank mit Transferpuffer aufgefüllt. Der elektrophoretische Transfer wurde für 90 Minuten bei 350 mA durchgeführt. Danach wurde die Kassette aus dem Tank genommen, geöffnet und die PVDF-Membran in einer 5 % Magermilchlösung in TBST über Nacht bei 4 °C geblockt.



Immunchemischer Nachweis mit spezifischen Antikörpern

Nachdem die Membran über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln in 5 % Magermilchlösung in TBST geblockt worden war, wurde sie mit dem Primär-Antikörper in 5 % Magermilchpulver, TBST oder 5 % BSA in TBST in eine Plastikfolie eingeschweißt und für 4 Stunden bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran aus der Plastikfolie gelöst und dreimal für 5 Minuten in TBST auf dem Schüttler gewaschen. Dann wurde eine Lösung mit dem entsprechenden Sekundär-Antikörper, der spezifisch gegen den Primär-Antikörper gerichtet war, vorbereitet. Der Sekundär-Antikörper wurde für 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert und die Membran anschließend wieder dreimal gewaschen.

Enhanced-Chemiluminescence-Detektionssystem

Zur Detektion der Antikörper-markierten Proteinbanden auf der PVDF-Membran wurde das Enhanced-Chemiluminescence-System (ECL-System) von GE Life Science verwendet. Dabei wird ein organisches Substrat, das Diacylhydrazid Luminol, von der Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) oxidiert. Dabei wird  $H_2O_2$  zu  $H_2O$  umgewandelt. Das Oxidationsprodukt befindet sich in einem angeregten Zustand und wandelt sich unter Lichtemission in den Grundzustand um. Die Lichtemission wird von der Kamera erfasst und zeigt so ein Abbild der PVDF-Membran. Für die Reaktion wurden zunächst die Detektionslösungen 1 und 2 zu gleichen Anteilen gemischt (0,125 ml/cm<sup>2</sup> Membranfläche). Die Reaktion erreichte circa 5 min nach Substratzugabe das Maximum der Lichtemission bevor die Signalstärke wieder langsam abfiel. Die gewaschene Membran wurde auf eine Frischhaltefolie gelegt und die Detektionslösung mit einer Pipette auf die Membran getropft. Die Inkubation erfolgte für eine Minute, dann wurde die Lösung abgegossen und die Membran auf eine Platte gelegt. Die Platte wurde ins Detektionsgerät gegeben. Es wurden Aufnahmen im 2-Sekunden-Takt durchgeführt, die Lichtabgabe/Reflexion wurde über die Zeit addiert. In Abhängigkeit vom Aufnahmeergebnis wurden kürzere oder längere Belichtungszeiten gewählt. Zur weiteren Aufbewahrung wurden die PVDF-Membranen gewaschen, getrocknet und zwischen Whatman-Papier gelegt.

### 2.2.6 Generierung von miR-FYCO1-Viren

Zur Klonierung eines miR-FYCO1-Virus wurde das BLOCK-IT Expression Vektor Kit von Invitrogen verwendet. Hierbei handelt es sich um synthetische microRNAs, die spezifisch gegen FYCO1 gerichtet sein sollen. Durch die adenovirale Überexpression dieser synthetischen microRNAs soll ein suffizienter „Knockdown“ *in vitro* erreicht werden. Die Sequenz der synthetischen microRNAs wurde

mit Hilfe der Software BLOCK-iT™ RNAi Designer erstellt. Beide komplementären Oligonukleotide wurden bei Eurofins Genomics synthetisiert. Zunächst wurden beide einzelsträngigen DNA-Oligonukleotide durch Hinzufügen von DNase/RNase-freiem H<sub>2</sub>O mit einer Konzentration von 200 µM gelöst. Um einen Doppelstrang zu erhalten, der in den pcDNA6.2-GW-Vektor kloniert werden konnte, mussten die beiden Einzelstrang-Oligonukleotide zu einem Doppelstrang vereint werden. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz pro Oligo-Paar angesetzt:

**Table 12 Reaktionsansatz für die Annealing-Reaktion**

Reagenz	Volumen [µl]
DNase/RNase freies H <sub>2</sub> O	8
10 x Oligo Annealing Puffer	2
top strand Oligo (200 µM)	5
bottom strand Oligo (200 µM)	5
Total Volume	20

Wir verwendeten 4 unterschiedliche Sequenzen, die nach Angaben der Software zu einem „Knockdown“ führen sollten (miR-FYCO1-1138, miR-FYCO1-1788, miR-FYCO1-3457 und miR-FYCO1-2607). Die Oligonukleotide wurden für 4 Minuten bei 95 °C denaturiert. Der Reaktionsansatz wurde anschließend bei RT für 5-10 Minuten abgekühlt, wobei die komplementäre Bindung stattfand.

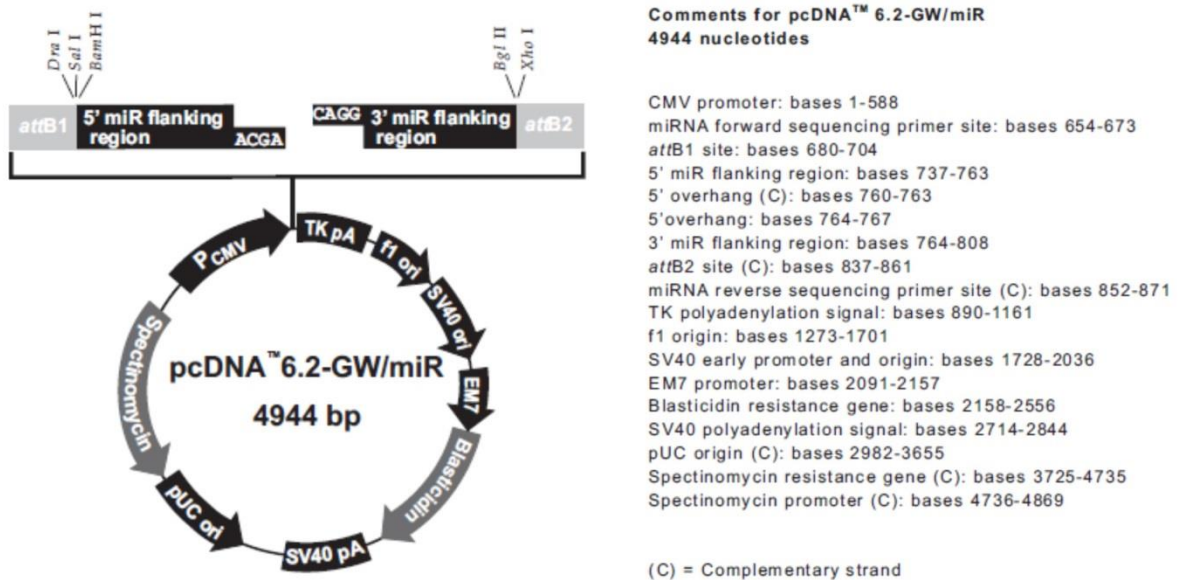
Jetzt lag eine Konzentration von 50 µM doppelsträngiger Oligonukletide vor, die bei - 20 °C gelagert wurde. Ob die Annealingreaktion in allen 4 Ansätzen erfolgt war, wurde in einer Gelanalyse überprüft. Dazu wurden je 6 µl 500nM Doppelstrang-Oligos und 6 µl der entsprechenden Einzelstrang-Oligos im Wechsel in die Taschen eines 4 % Agarosegels gegeben, aufgetrennt und unter dem UV-Licht betrachtet. Die Annealingreaktion war für alle 4 Primerpaare erfolgt.

Zum Einfügen des Doppelstranges in den pcDNA6.2-GW-Vektor wird die Ligationsreaktion (LR-Reaktion) benötigt. Für die folgende Ligationsreaktion wurden die Doppelstrang-Oligos durch eine 100-fache Verdünnung in DNase/RNase freiem Wasser und eine anschließende 50-fache Verdünnung in 10 X Oligo Annealing Puffer auf eine Konzentration von 10 nM verdünnt. Für die Reaktion wurde folgender Ansatz pro Doppelstrang-Oligo (Tab. 13) verwendet.

**Tabelle 13 Reaktionsansatz der LR-Reaktion**

Reagenz	Volumen [µl]
DNase/RNase freies H <sub>2</sub> O	4,5
5 x Ligationspuffer	2,0
pcDNA 6.2-GW-Vektor/miR-Vektor, linearisiert (5 ng/µl)	1,0
T4 DNA Ligase (1 U/µl)	0,5
ds-Oligos (10 nM)	2,0
Total Volume	10,0

Der Ligationsansatz wird durch auf- und abpipettieren gut durchgemischt und bei RT für 30 Minuten inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden die Reaktionsansätze bis zur weiteren Verwendung auf Eis oder bei - 20 °C gelagert. Der DNA-Doppelstrang wurde nun in den pcDNA6.2-GW-Vektor ligiert, d.h. die überhängenden Enden der Doppelstrang-DNA wurden mit den freien Enden des Vektors verknüpft, so dass ein ringförmig geschlossener Vektor entstanden war.



**Abbildung 10: Darstellung des pcDNA6.2-GW/miR Vektors** [aus: User manual BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kits]

In der anschließenden Transformationsreaktion wurde der Vektor in chemisch kompetente E.coli OneShot TOP10 Bakterien eingebracht. Dafür wurden je 2 µl des Ligationsansatzes in je ein Tube mit E.coli-Bakterien gegeben, der Ansatz wurde nicht vermischt. Die 4 Tubes wurden für 10 Minuten auf Eis und anschließend für 30 Sekunden auf 42 °C inkubiert um danach wieder auf Eis gelagert zu werden. Pro Reaktionsansatz wurden 250 µl SOC-Transformationsmedium hinzugefügt. Die Proben wurden in horizontaler Lage im Schüttelschrank bei 200 rpm und 37 °C für 1 h inkubiert. Anschließend wurden pro Ansatz je 150 µl Bakteriensuspension auf einer Spectinomycin-Agarplatte

ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Der restliche Probenansatz wurde bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Am darauf folgenden Morgen wurden je 2 Klone pro Agarplatte gepickt und jeder Klon in je ein Röhrchen mit 5 ml LB-Medium, welches mit Spectinomycin (50 µg/ml) versetzt war, gegeben. Die Bakterien wurden 24 h bei 37 °C im Brutschrank gelagert und vermehrten sich so. Die Agarplatten wurden zunächst bei 4 °C gelagert.

Am folgenden Tag wurden die Plasmide durch das NucleoSpinKit von Marchery Nagel isoliert. Dieses Verfahren wurde unter „Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien in kleinem Maßstab“ erläutert. Um eine korrekte Transformation zu bestätigen, wurden die Plasmide bei Eurofins Genomics sequenziert. Daraus ergab sich eine erfolgreiche Transformation für die Konstrukte #1138 Klon 2, #3457 Klon 1 und #2607 Klon 1. Das Konstrukt #1788 wurde nicht erfolgreich transformiert, so dass weitere 4 Klone (Klon 3-6) gepickt, diese über Nacht angezchtet und die Plasmid-DNA anschließend extrahiert und sequenziert wurde. Klon 3 zeigte sich als erfolgreich transformiert. Zur weiteren Verarbeitung wurden alle Plasmidkonstrukte durch Auffüllen mit EB-Puffer (Tris) auf eine Konzentration von 100 ng/µl verdünnt. Zusätzlich wurde der pDONR201-Vektor auf 100 ng/µl verdünnt. Die Plasmide (100 ng/µl) wurden nun durch die BP-Reaktion in den pDONR201-Vektor überführt. Für die BP-Reaktion wurde folgender Pipettieransatz (Tab. 14) gewählt.

**Tabelle 14 Reaktionsansatz für die BP-Reaktion**

Reagenz	Volumen [µl]
EB-Puffer	4,4
pDONR201	1,8
Plasmid (Einsatz ca. 150 ng)	1,8
BP-Klonase (Zugabe am Schluss)	2,0
Total Volume	10,0

Die 4 Proben wurden für 2 h bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde je Probe 1 µl Proteinase K hinzugegeben und für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Proteinase K sorgt für den Abbau der enzymatischen Bestandteile. Dann wurden alle Proben auf Eis gestellt. Zur Transformation des pDONR201-Plasmid-Vektors in elektrokompetente Bakterien wurden 4 Tubes mit E.coli DH10B Bakterien auf Eis aufgetaut. Jedem Bakterienaliquot wurde jeweils ein Plasmid-Vektor-Konstrukt (1,5 µl) hinzugefügt und einmal vorsichtig untergerührt. Anschließend wurden 60 µl der Plasmid-Vektor-Bakterien-Suspension in eine Küvette gegeben und es erfolgte eine Elektroporation mit 1,8 Volt über 2,9 - 3,1 msec. Die Küvette wurde mit 1 ml LB-Medium ausgespült, die Lösung in ein neues Tube überführt und bei 37 °C und 750 rpm für 1 h im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden 150 µl

pro Probe auf einer Kanamycin enthaltenden Agarplatte ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C inkubiert und dann bei 4 °C gelagert. Pro Konstrukt wurden auf jeder Agarplatte 5 Klone markiert. Um zu überprüfen, ob die Bakterien die Vektoren aufgenommen hatten, wurde eine Kolonie-PCR mit den entsprechenden Primern für den pDONR201 durchgeführt. Für die PCR wurde folgender Reaktionsansatz (Tab. 15) verwendet.

**Tabelle 15 Reaktionsansatz für die Kolonie-PCR, deren PCR-Ergebnis in einem Agarose-Gel eine erfolgreiche Transformation des Vektors in das Bakterium darstellen soll.**

Reagenz	Volumen [ $\mu$ l]
dH <sub>2</sub> O	20,75
10 x PCR-Puffer	2,50
dNTPs (10 mM)	0,50
pDONR201_Forward Primer (10 mM)	0,50
pDONR201_Reverse Primer (10 mM)	0,50
Polymerase Dream Taq	0,25
Total Volume	25,00

Mit einer Pipettenpitze wurden die Klone von der Agarplatte gepickt und diese dann in den PCR-Ansatz eingetaucht. Anschließend wurde die Pipettenspitze mit den restlichen anhaftenden Bakterien in ein vorbereitetes 2 ml Tube gegeben, in dem je 1 ml LB-Medium und 1  $\mu$ l Kanamycin vorgelegt war. Die Tubes wurden bei 37 °C im Schüttler inkubiert, während die PCR im Cycler erfolgte. Die Agarplatten wurden bei 4 °C gelagert. Für die PCR wurde folgendes Temperaturprofil (Tab. 16) verwendet.

**Tabelle 16 Temperaturprofil der PCR**

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Anzahl der Zyklen
95	5	1
95	0,5	
62	0,5	
72	1	35
72	10	1
4	$\infty$	1

Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,5 % Agarose-Gel aufgetragen und aufgetrennt. Unter dem UV-Licht zeigte sich, dass alle Bakterienklone den pDONR201-Vektor enthielten. Für die weiteren Reaktionsschritte wurden die Klone 1 und 2 eines jeden Konstruktes weiter verwendet. Um Plasmid für die weiteren Reaktionsschritte zu gewinnen, wurden die Bakterienkolonien über Nacht bei 37 °C in 5 ml mit Kanamycin (50  $\mu$ g/ml) versetztem LB-Medium kultiviert. Die Plasmide wurden analog zur ersten Plasmidisolierung mit dem NucleoSpinKit von Marchery Nagel isoliert. Für die Sequenzierung

bei Invitrogen wurden 150 ng/ $\mu$ l Plasmid in 15  $\mu$ l Volumen eingeschickt. Die Sequenzierung war für #1138 Klon 1 und 2, #1788 Klon 1 und 2, #2607 Klon 1 und 2 und #3457 Klon 1 positiv ausgefallen.

Für die LR-Reaktion wurden die Plasmide (circa 100 ng/ $\mu$ l) von Klon 1 von Konstrukt #1138, #1788, #2607 und #3457 eingesetzt. Bei der LR-Reaktion werden die Plasmide in den pAd-Vektor eingebracht. Der Reaktionsansatz enthielt folgende Reagenzien (Tab. 17).

**Tabelle 17 Reaktionsansatz für die LR-Reaktion; dabei wird das Plasmid in den pAd-Vektor eingebracht**

Reagenz	Volumen [ $\mu$ l]
pAd (150 ng/ $\mu$ l)	1,5
EB-Puffer	6,0
LR-Clonase	2,0
Plasmid (100 ng/ $\mu$ l)	1,0
Total Volume	10,5

Der Reaktionsansatz wurde bei 25 °C für 8 h inkubiert. Anschließend wurde 1  $\mu$ l Proteinase K pro Probe hinzugegeben, für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert.

Die pAd-Plasmid-Vektor-Konstrukte wurden ebenfalls in elektrokompetente E.coli DH10B Bakterien eingebracht. Dazu wurde je 1,5  $\mu$ l Plasmid-Vektor-Konstrukt zu einer Bakterienkolonie vorsichtig hinzugefügt, die Probe in eine Küvette gegeben und Strom bei einer Spannung von 1,8 Volt für eine Zeitkonstante von 3,4-3,8 msec appliziert. Die Probe wurde mit 1 ml LB-Medium aus der Küvette gespült und in ein neues Tube überführt. Die Bakterienkolonie wurde für 1 h bei 37 °C und 750 rpm im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu$ l der Bakteriensuspension auf einer Carbenicillin-haltigen (50  $\mu$ g/ml) Agarplatte ausgestrichen. Die Agarplatte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert und dann bei 4 °C gelagert.

Für eine erneute Plasmidisolierung wurden je Konstrukt zwei Bakterienkolonien von der Agarplatte gepickt und diese über Nacht bei 37 °C in 5 ml Kulturen angezüchtet. Die Plasmide wurden wie oben beschrieben mit dem NucleoSpinKit von Marchery Nagel isoliert und je Plasmid wurden 150 ng zur Sequenzierung bei Eurofins Genomics gegeben. Die Sequenzierung war erfolgreich für #1788 Klon 2, #2607 Klon 2 und 3457 Klon 2. Für die Klone 1 und 2 von Konstrukt 1138 konnte nicht genug Plasmid isoliert werden. Zur Plasmidgewinnung erfolgte eine Maxi-Präparation mit dem Kit von Qiagen. Dafür wurde eine Vorkultur mit 200 ml LB-Medium angesetzt, die über Nacht bei 37 °C kultiviert wurde. Alle weiteren Schritte werden unter „Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien in großem Maßstab“ erläutert. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde in 200  $\mu$ l 1 x TE resuspendiert und bei - 20 °C gelagert.

Zur Linearisierung der adenoviralen Plasmid-DNA erfolgte ein Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease PAC-I (New England Biolabs). In den PAC-I-Verdau wurden folgende Reagenzien (Tab. 18) eingesetzt.

**Tabelle 18 Reaktionsansatz für den PAC-I-Verdau zur Linearisierung der adenoviralen Plasmid-DNA**

Reagenz	Volumen [ $\mu$ l]
10 x Restriktionspuffer #1	10
BSA 10 x	10
PAC I	1
Plasmid-DNA	50 $\mu$ g
H <sub>2</sub> O	ad 100
Total Volume	100

Der Reaktionsansatz wurde bei 37 °C über Nacht im Thermocycler konserviert.

Am Folgetag erfolgte die Phenol-Chloroform-Extraktion des PAC-I-Verdau. Dieser erfolgte analog der bereits oben beschriebenen Phenol-Chloroform-Extraktion, das DNA-Pellet wurde in 40  $\mu$ l EB-Puffer resuspendiert und die Konzentration der Plasmide für die Konstrukte #1788, #2607 und #3457 bestimmt.

Anschließend erfolgte die Transfektion und Adenovirenproduktion in HEK293A-Zellen. Dazu wurde für jedes Plasmide ein Ansatz 1  $\mu$ g PAC-I-verdautes Plasmid und 250  $\mu$ l DMEM (ohne FCS und Antibiotikum) und ein Ansatz 3  $\mu$ l Lipofectamine 2000 und 250  $\mu$ l DMEM (ohne FCS und Antibiotikum) für 5 Minuten bei RT inkubiert. Die beiden zusammengehörenden Ansätze wurden nach Inkubation vermischt und für weitere 20 Minuten bei RT inkubiert, so dass bei drei Plasmiden drei Proben entstanden waren. Inzwischen wurde ein Medienwechsel auf DMEM mit Glukose und 10 % FCS, jedoch ohne Antibiotikum, bei den vorbereiteten HEK293A-Vorkulturen (500.000 Zellen/Well in einer 6-Well-Platte) durchgeführt. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde jeder Lipofectamine 2000-Plasmid-Ansatz vorsichtig in ein Well hineingetropft. Die Zellen wurden bei 37 °C inkubiert, nach 24 Stunden erfolgte ein Medienwechsel auf DMEM mit Glukose, 10 % FCS und Penicillin/Streptomycin. 48 h nach Infektion der HEK293A-Zellen wurden die Zellen zur Virusproduktion in 75 cm<sup>2</sup> große Kulturflaschen überführt und kultiviert. Die Ernte erfolgte bei offensichtlicher Lysereaktion der Zellen. Dafür wurden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren des vorliegenden Kulturmediums vollständig vom Untergrund abgelöst und schließlich in ein 50 ml Falcon überführt. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 3 ml PBS resuspendiert. Das Probevolumen von 3 ml wurde auf zwei 2 ml Tubes aufgeteilt und der „freeze and thaw“-Technik zum Aufbrechen der Zellwände und Freisetzung des

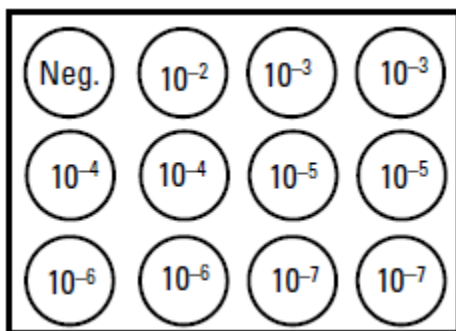
Virus zugeführt. Dabei wurden die Tubes zunächst für 30 Minuten in flüssigem Stickstoff und anschließend für 15 Minuten bei 37 °C gelagert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. So wurde aus der Zellsuspension ein Viruslysate hergestellt und ein Virustiter (Tab. 18) ermittelt. Der Vorgang des Titerns ist unter „Titerbestimmung von Adenoviren in HEK293A-Zellen“ beschrieben.

**Tabelle 19 Titerbestimmung der Viren**

Konstrukt	Datum	Titer [ifu/ml]	Titer
pAd-miRFYCO1_1788	06.11.2010	$1,06 \times 10^9$	$10,6 \times 10^5$
pAd-miRFYCO1_2607	06.11.2010	$1,20 \times 10^7$	$12,0 \times 10^3$
pAd-miRFYCO1_3457	06.11.2010	$3,60 \times 10^9$	$36,0 \times 10^5$

#### Titerbestimmung von Adenoviren in HEK293A-Zellen

Zur Titerbestimmung eines Viruslysates wurden auf einer 12-Well-Platte je 500.000 HEK-Zellen pro Well ausgesät. Diese Zellen wurden direkt mit einer Verdünnungsreihe des Viruslysats infiziert. Hierbei kamen Verdünnungen von  $10^{-2}$  bis  $10^{-7}$  zum Einsatz. Pro Well wurde 100 µl der verdünnten Viruslösung mit 900 µl der Zell-Medium-Suspension nach folgendem Pipettierschema (Abb. 11) auf die Zellen getropft.



**Abbildung 11: Pipettierschema für die Verdünnungsreihen bei der Titerbestimmung von Adenoviren**

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 48 h wurde das Medium abgenommen und die Zellen in der Sterilwerkbank kurz getrocknet. Zur Fixation der Zellen wurde pro Well 1 ml - 20 °C vorgekühltes Methanol vorsichtig hinzugefügt und für 10 Minuten bei - 20 °C inkubiert. Danach wurde das Methanol abgenommen und die Zellen dreimal mit 1 % (w/v) BSA in PBS gewaschen. Um infizierte Zellen zu markieren, kam ein FITC-gekoppelter (Fluorescein isothiocyanate) Anti-Hexon-Antikörper zum Einsatz. Dieser wurde 1:50 in 1 % (w/v) BSA in PBS verdünnt. Pro Well wurden 200 µl der Antikörperverdünnungslösung zur Färbung eingesetzt, wobei sinnvollerweise nur die Verdünnungen  $10^{-4}$  bis  $10^{-6}$  je nach Adhärenz der Zellen angefärbt wurden. Die Zellen wurden für



eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die Anti-Hexon-Antikörperlösung abgenommen und die Zellen dreimal mit 1 % (w/v) BSA in PBS gewaschen. Die Zellen wurden danach mit PBS überschichtet. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden mindestens 5 Gesichtsfelder mit einem 20 x Objektiv ausgezählt. Optimalerweise fanden sich 5-50 Zellen in einem Gesichtsfeld. Anschließend wurde der Titer analog zur folgenden Abbildung (Abb. 12) errechnet.

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

Objektivlinse	Gesichtsfelder/Well		
	12-Well-Platte	24-Well-Platte	96-Well-Platte
	3,8 cm	1,0 cm	0,32 cm
4x	19	10	1,6
5x	30	16	2,6
10x	150	79	12,6
20x	594	313	50

Abbildung 12: Tabelle für die Gesichtsfelder/Well-Angabe zur Berechnung der Titer

### 2.2.7 Tierversuche

#### Haltung der Tiere

Die Tiere waren in der Zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Kiel untergebracht. Freier Zugang zu Trinkwasser und standardisiertem Trockenfutter war immer gewährleistet. Die RT wurde konstant bei  $24 \pm 1$  °C gehalten. Der Hell-Dunkel-Rhythmus betrug jeweils 12 Stunden. Alle Tierversuche wurden durch das Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigt.

#### Echokardiographie

Durch eine Inhalationsnarkose mit Isofluran wurden die Mäuse in einem Behältnis sediert. Die Narkose wurde während der Untersuchung über eine Maske aufrechterhalten. Die Brust der Tiere wurde rasiert. Für die Echokardiographie wurden die Tiere auf einer Wärmematte gelagert und mit Rotlicht beleuchtet, um die Körpertemperatur aufrecht zu erhalten. Für die Untersuchung wurde ein Ultraschallgerät mit einem 14,1 MHz-Schallkopf eingesetzt. Für die Messungen wurde zunächst im B-

Mode eine Schnittebene in der kurzen Achse auf Höhe der Papillarmuskeln aufgesucht. Im M-Mode wurde dann die Stärke des Septums (Interventricular Septum, IVS), der linksventrikuläre Diameter (Left Ventrikular Internal Diameter, LVID) und die Stärke der Hinterwand (Posterior Wall, PW) sowohl diastolisch (IVSd, LVIDd, PWd) als auch systolisch (IVSs, LVIDs, PWs) gemessen.

Für jedes Tier wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt. Der Untersucher war zu jeder Zeit bezüglich des Genotyps und der Behandlung des Tieres geblindet. Aus den echokardiographisch ermittelten Parametern konnte das FS nach folgender Formel errechnet werden.

$$\text{FS in \%} = (\text{LVIDd-LVIDs})/\text{LVIDd}$$

#### Konstriktion der Aorta transversa (TAC)

Die aortale Konstriktion wird im Bereich des Aortenbogens zwischen dem Truncus brachiocephalicus und der A. carotis communis sinistra durchgeführt. Das Tier erhält initial eine Analgesie mit 0,1 mg/kg KG Buprenorphin subcutan. Danach wird die Narkose mit 3 % (v/v) Isofluran in einer Kammer eingeleitet. Um die Operation am offenen Thorax durchführen zu können, wurde eine Intubation mit einem flexiblen Tubus notwendig. Die Beatmung erfolgte mit einem Tidalvolumen von 200 µl und einer Atemfrequenz von 120-130/Minuten. Aufrechterhalten wird die Anästhesie mit Isofluran (2-3 % v/v), das Fell im Bereich des linken Hemithorax mit einem Rasierer entfernt. Der Hemithorax wurde mit einem Wattestäbchen, das in Povidon-Jod getränkt wurde, desinfiziert. Der Hautschnitt erfolgte transversal im Bereich des 2. Interkostalraums (ICR) mit einer Breite von ca. 0,5 cm. Mit einer Pinzette erfolgte eine stumpfe Eröffnung des Thorax links lateral des Sternums im 2. ICR. Unter einem Operationsmikroskop wurde mit zwei anatomischen Pinzetten der Aortenbogen freipräpariert. War dieser ausreichend mobilisiert, wurde ein 6.0 Prolene-Faden unter dem Aortenbogen hindurchgezogen und eine 26 G-Nadel auf dem Aortenbogen platziert. Es folgte eine Ligatur um die 26 G-Nadel und den Aortenbogen. Daraufhin wurde die 26G-Nadel rasch entfernt. Der Durchmesser der Aorta sollte nun an dieser Stelle 26 G (Gauge) betragen. Eine Naht der Muskulatur war nicht erforderlich, da die stumpfe Präparation eine ausreichende Adaptation der Muskulatur erlaubte. Die Hautnaht wurde mit 5.0 Vicryl rapid (Ethicon) durchgeführt. Die gesamte Operationsdauer betrug etwa 15 Minuten. Die Scheinoperation beinhaltete alle Schritte ausschließlich der Obstruktion der Aorta.

Während des gesamten operativen und postoperativen Verlaufes wurde unter fortlaufender rektaler Temperaturkontrolle durch einen wärmbaren Operationstisch über eine automatische Feedbackregulation für eine ausreichende Temperierung der Maus gesorgt.

## Gewebeentnahme

Die Entnahme von Organen, meist das Herz, aber auch Lunge, Leber, Augen und Tibia, wurde entweder in tiefer Narkose oder nach Genickbruch durchgeführt. Die Narkose wurde als Inhalationsnarkose mit Isofluran eingeleitet. Alle Gewebe wurden frisch verarbeitet oder in vorbereiteten Behältnissen gelagert.

## 2.2.8 Histologie

### Immunzytochemie

Für die Immunzytochemie wurden die Kardiomyozyten auf beschichteten Coverslips in einer 12-Well-Platte kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Coverslips wurden mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS für 5 Minuten bei RT zur Fixation der Zellen inkubiert. Anschließend wurden sie zweimal mit PBS gewaschen. Zur besseren Weiterverarbeitung wurden die Coverslips in eine feuchte Kammer, eine mit Parafilm überzogene Glasplatte, die in einer mit feuchtem Whatman-Papier ausgelegten Kammer lag, überführt. Dort wurden die auf den Coverslips fixierten Kardiomyozyten für eine Stunde mit einer Blocklösung bestehend aus 2,5 % BSA in PBS und 0,1 % Triton X-100 inkubiert. Die Lösung wurde mit PBS von den Zellen gewaschen. Der erste Antikörper, der nun im folgenden Schritt aufgetragen wurde, richtete sich gegen die Struktur, die dargestellt werden sollte. Dafür wurde der Antikörper in der nach Hersteller empfohlenen Konzentration in 2,5 % BSA in PBS verdünnt auf die Zellen aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Dann wurde die Antikörperlösung abgenommen und die Coverslips dreimal mit PBS für jeweils 5 Minuten gewaschen. Als Zweitantikörper wurde ein Antikörper verwendet, der gegen das Fc-Fragment des ersten Antikörpers gerichtet war. Der Antikörper wurde in entsprechender Konzentration in 2,5 % BSA in PBS verdünnt auf die Coverslips aufgetragen und für eine Stunde bei RT inkubiert. An den Zweitantikörper war ein Fluoreszenzfarbstoff gebunden. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (1:5000). Anschließend wurde die Antikörperlösung abgenommen und die Zellen dreimal für 5 Minuten mit PBS und zweimal für 5 Minuten mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Objektträger wurden mit je einem Tropfen Mounting Medium vorbereitet und die Coverslips so auf den Objektträgern fixiert. Die Objektträger wurden über Nacht bei 4 °C getrocknet.

### Immunhistochemie

Das Herzgewebe wurde den Mäusen unmittelbar post mortem entnommen, kurz in PBS gewaschen und dann mit feinen Papierhandtüchern getrocknet. Eine kleine Kryomold wurde mit TissueTek,

einem Medium zum Einbetten von Gewebe, befüllt und das Gewebe luftblasenfrei darin ausgerichtet. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Mit einem Kryotom wurden 7 µm dicke Schnitte hergestellt, ca. 3-5 Schnitte auf einen Objektträger überführt und an der Luft getrocknet. Die Schnitte wurden mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt. Zum Entwachsen wurden die Schnitte zweimal für 10 Minuten in Xylen und zur Dehydratation in eine schnell absteigende Ethanolreihe (100 %, 96 %, 70 %) eingetaucht. Anschließend wurden sie in fließendem Wasser gewaschen und 6 Minuten in Mayers Hämatoxylin Lösung getaucht. Darauf erfolgte eine kurze Differenzierung mit Ethanol-Säure und nach wiederholtem Waschen wurden die Schnitte schließlich für 5 Minuten in Eosin gefärbt. Anschließend erfolgte die Waschung in einer schnell aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 96 %, 100 %), dreimal in einem Xylen-Alkohol-Gemisch und dreimal in Xylen. Die Schnitte wurden an der Luft getrocknet. Zur Eindeckelung wurden sie erneut in Xylen getaucht, 1-2 Tropfen Eukitt auf die Schnitte verteilt und ein Deckgläschen blasenfrei auf das Objekt gelegt. Die Objektträger wurden über Nacht getrocknet. Die Färbung wurde in der Routinefärbung in der Klinik für Dermatologie am UKSH, Campus Kiel, durchgeführt.

### 2.2.9 Statistische Auswertung

Für die mathematische Analyse der Ergebnisse wurde die Software SigmaPlot verwendet. Zur statistischen Auswertung wurden zunächst Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt. Für die statistische Analyse wurde bei zwei Gruppen der t-Test verwendet. Zur Analyse von drei oder mehr Gruppen dienten One-Way und Two-Way ANOVA Tests. Als post hoc-Test wurde der Student-Newman-Keuls Test angewendet.

## III. Ergebnisse

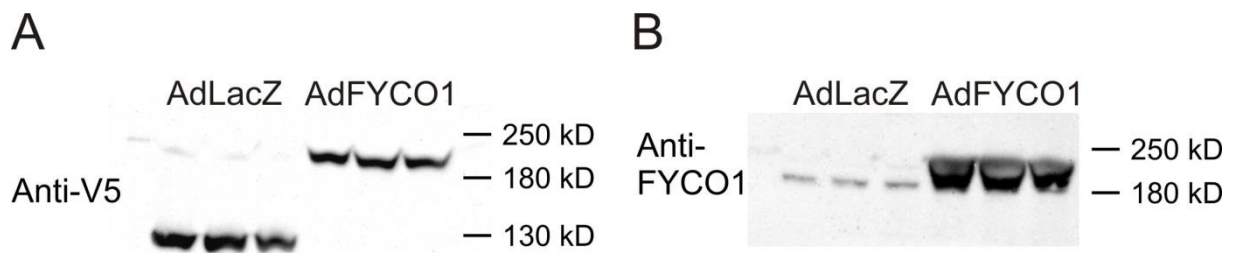
### 3.1 Überexpression von *FYCO1* *in vitro*

#### 3.1.1 Klonierung des *FYCO1*-Adenovirus

Um die Funktion des herz- und skelettmuskelspezifisch exprimierten Gens *FYCO1* auf zellulärer Ebene untersuchen zu können, nutzten wir eine primäre Kultur aus Kardiomyozyten von neonatalen Ratten (NRVCM). Da eine suffiziente Überexpression von *FYCO1* in diesem Modell nicht durch konventionelle Transfektionsreagenzien erreicht werden konnte, nutzten wir einen adenoviralen Gentransfer. Das Adenovirus kodiert für humanes *FYCO1* und trägt einen c-terminalen V5-Tag zur besseren Erkennbarkeit durch spezifische Antikörper (AdFYCO1) [40]. Als Kontrolle diente ein Adenovirus, das das LacZ-Gen trägt und die  $\beta$ -Galaktosidase exprimierte (AdLacZ).

#### 3.1.2 Validierung des AdFYCO1-Virus

Um eine suffiziente Expression der Adenoviren für *FYCO1* zu überprüfen, wurden NRVCMs mit je 25 moi (multiplicity of infection) AdFYCO1 bzw. AdLacZ als Kontrollgruppe infiziert. 72 h nach der Infektion wurden beide Zellenpopulationen geerntet. Die Proteine wurden aus der Zellsuspension durch Aufspaltung der Zellen extrahiert und im Western Blot analysiert. Da sowohl *FYCO1* als auch  $\beta$ -Galaktosidase einen c-terminalen V5-Tag trugen, war es möglich beide Proteine mit Hilfe eines Anti-V5-Antikörpers nachzuweisen (Abb. 13). In einem zweiten Western Blot wurde *FYCO1* mit Hilfe eines Anti-*FYCO1*-Antikörpers nachgewiesen. Dabei ließ sich in der Proteinfraction der Kontroll-Zellen nur das physiologisch vorhandene *FYCO1* nachweisen. In der Proteinauftrennung der mit AdFYCO1-infizierten Zellen zeigte sich dagegen eine starke Anreicherung von *FYCO1*, was eine erfolgreiche adenovirale Überexpression bestätigt.

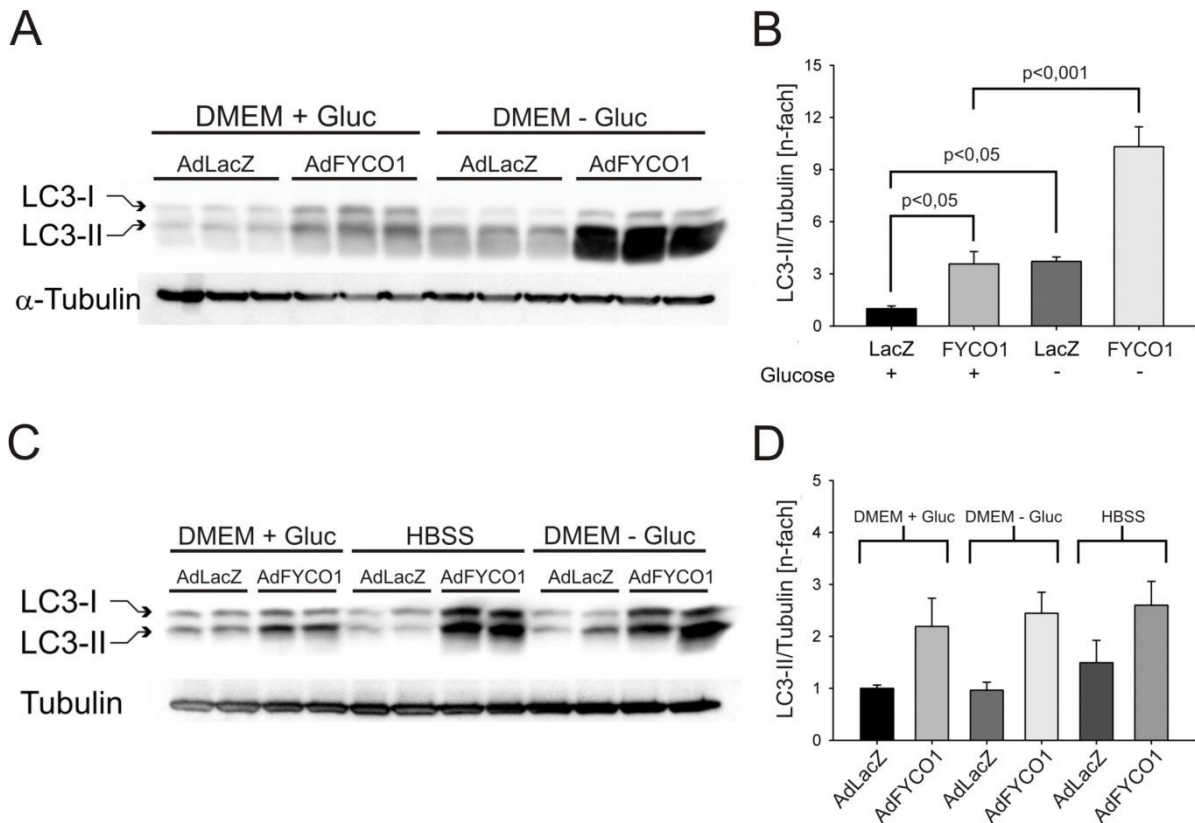


**Abbildung 13: Adenovirale Überexpression von FYCO1 in Kardiomyozyten.** Ob eine erfolgreiche Infektion der Zellen durch die Viren erfolgt und damit eine adenovirale Expression von FYCO1 gegeben war, wurde durch Infektion zweier Zellpopulationen mit jeweils einem Virus [25 moi] gezeigt. A) Darstellung des V5-Tags mit einem anti-V5-Antikörper im Western Blot zum Beweis einer erfolgreichen Infektion der Zellen mit den Viren B) Darstellung von physiologisch vorhandenem FYCO1 in der pAdLacZ-infizierten Zellkontrollpopulation und adenoviral überexprimiertem FYCO1 in der pAdFYCO1-infizierten Zellpopulation im Western Blot.

### 3.1.3 Überexpression von FYCO1 in Kardiomyozyten induziert Autophagie

Zur Identifikation der zellulären Funktion von FYCO1 nutzten wir einen „Yeast Two-Hybrid“-Screen mit FYCO1 als Köder. Mit dem „Yeast Two-Hybrid“-Screen können potentielle Protein-Interaktionspartner identifiziert werden. In der Analyse zeigte sich LC3, das Homolog zu ATG8 in Säugetierzellen, als möglicher Interaktionspartner [46]. LC3/ATG8 ist ein zentrales Protein in der Autophagie und kann als Aktivitätsmarker verwendet werden. Da die Autophagie in allen Zellen auf einem basalen Niveau aktiv ist, aber durch Stress wie Nahrungsentzug aktiviert werden kann, untersuchten wir die Auswirkungen der FYCO1-Überexpression unter beiden Bedingungen. Hierzu infizierten wir Kardiomyozyten mit 25 moi AdFYCO1 und eine Kontrollgruppe mit 25 moi AdLacZ. 48 h nach Infektion wurde der Hälfte der Zellen die Nährstoffe entzogen, in dem ein glukosefreies und FCS-freies Medium zur weiteren Kultivierung der Zellen verwendet wurde. Nach 24 h Nahrungsentzug wurden die Zellen geerntet und die Proteine isoliert. Um den Einfluss von FYCO1 auf die Autophagie zu untersuchen analysierten wir die LC3-Spiegel unter Überexpression von FYCO1 in Kardiomyozyten im Western Blot. Im Autophagieprozess legt LC3 posttranslational auf Grund der Interaktion mit weiteren ATGs einen terminalen Glycinrest frei und wird dann als LC3-I bezeichnet. Durch weitere enzymatisch unterstützte Reaktionsschritte wird LC3-I mit Phosphatidylethanolamin konjugiert und dann als LC3-II bezeichnet. Das lipophile LC3-II ist an der Phagophorenmembran lokalisiert und kennzeichnet so bereits Frühformen von Autophagosomen. Daher wird LC3-II als Korrelat der Autophagieaktivität gemessen [7, 46]. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Sengupta et al. und Matsui et al. konnten wir in der Kontrollgruppe eine 3,7-fache Zunahme ( $p < 0,05$ ) der LC3-II-Spiegel unter Nahrungsdepletion nachweisen (Abb. 14 A, B) [47, 48]. In der mit pAdFYCO1 infizierten Zellpopulation ließ sich bereits unter physiologischen Bedingungen ein 3,6-facher Anstieg ( $p < 0,05$ ) von LC3-II im Vergleich zur Kontrollpopulation nachweisen. Dieser Effekt wurde durch

Glucoseentzug sogar noch verstärkt. Hier konnte der 10,3-fache Anstieg ( $p < 0,001$ ) von LC3-II nachgewiesen werden. In einem zweiten Versuchsaufbau wurde als weiterer Stimulus der Autophagie nicht nur ein Glucoseentzug, sondern auch ein Entzug von Aminosäuren angewendet. Erneut wurden NRVCMs 24 h nach Aussaat entweder mit 25 moi AdLacZ oder mit 25 moi AdFYCO1 infiziert. Weitere 48h später wurde je eine Zellpopulation mit glukosefreiem Nährmedium und je eine mit HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) über 3 h behandelt. Als Kontrollen dienten NRVCM, die weiterhin in DMEM kultiviert wurden. Im Western Blot kam es nach dreistündiger Stimulation in der Kontrollgruppe weder durch das glukosefreie Medium noch durch das aminosäurefreie HBSS zu einem signifikanten Anstieg der LC3-II-Spiegel. In der Kontrollgruppe konnte keine signifikante Induktion der Autophagie erreicht werden. Durch die Überexpression von FYCO1 in den Kardiomyozyten provozierten wir bereits unter physiologischen Bedingungen einen 2,19-fachen, signifikanten Anstieg der LC3-II-Konzentration (Abb. 14 C, D). Eine weitere Exazerbation konnte durch den Entzug von Glucose (2,45-fach) oder Aminosäuren (2,6-fach) jedoch nicht erreicht werden. Es kam lediglich zu einem 2,45-fachen Anstieg von LC3-II unter Glukoseentzug und zu einem 2,6-fachen Anstieg von LC3-II unter Aminosäurenentzug, was statisich nicht signifikant ist (Abb. 14 D).

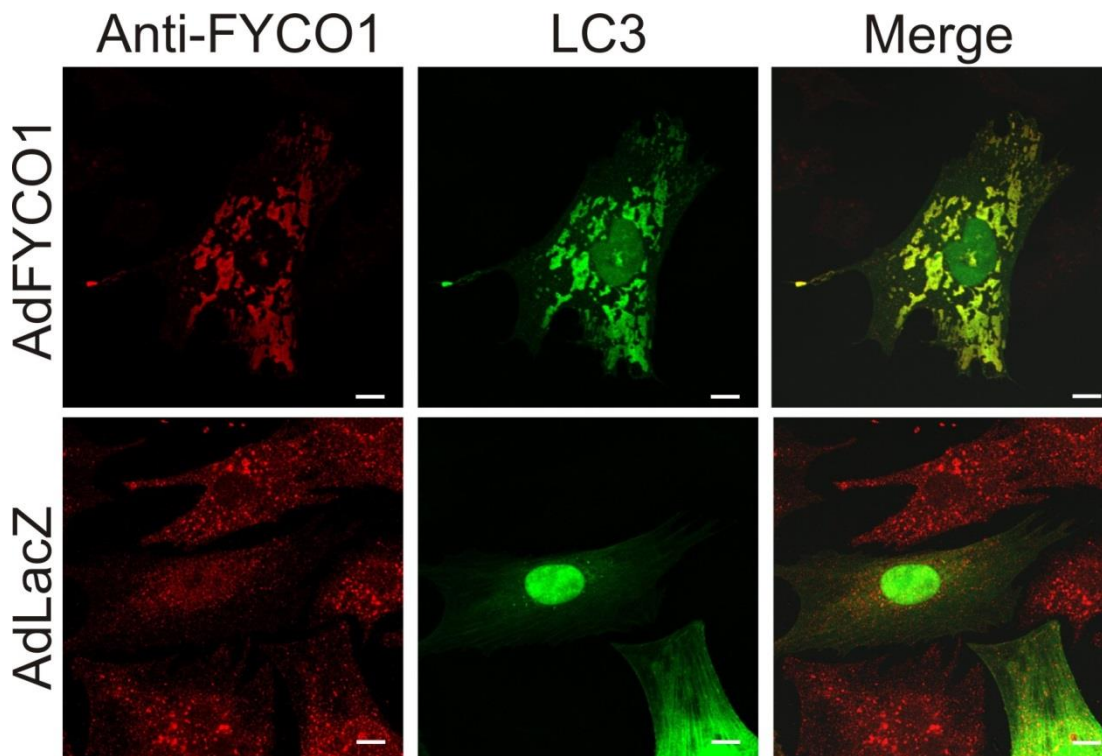


**Abbildung 14: Die Überexpression von FYCO1 induziert Autophagie in Kardiomyozyten.** Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden mit 25 moi AdFYCO1 oder mit 25 moi AdLacZ infiziert. 48 h nach Infektion wurden der Hälfte der Zellen die Nährstoffe als Stressreiz entzogen. A) Im Western Blot zeigte sich eine Zunahme des LC3-II-Spiegels unter Überexpression von FYCO1. Dieser konnte unter Glucoseentzug deutlich gesteigert werden. B) In der statistischen Auswertung konnte ein signifikanter Unterschied der LC3-II-Konzentration von  $p < 0,001$  unter Glucoseentzug in der FYCO1-überexprimierten Zellpopulation ermittelt werden. C) und D) Eine alternative Behandlung mit HBSS, einem aminosäurefreien Kulturmedium, ergab nur geringe Unterschiede.

Um eine mögliche Kollokalisierung und somit potentielle Interaktion von FYCO1 und LC3 nachzuweisen, wurde eine Immunzytologie an NRVCN durchgeführt. Hierzu erfolgte die Infektion von NRVCN mit 25 moi AdFYCO1 und 25 moi Ad-GFP-LC3 (green fluorescent protein). Eine Kontrollpopulation wurde mit 25 moi AdLacZ und 25 moi Ad-GFP-LC3 infiziert. In der Kontrollgruppe zeigte sich eine diffuse Verteilung von endogenem FYCO1 über die Zelle, auch LC3 war diffus verteilt und leuchtete nur vereinzelt auf. In der überlagerten Aufnahme lies sich eine Kollokalisierung der gefärbten Strukturen nicht ausmachen (Abb. 15 untere Bilderreihe). Betrachtete man die Zellen, die FYCO1 durch den adenoviralen Transfer stark überexprimierten, zeigten sich in der FYCO1-Färbung scholligenartige, große Vesikel, die sich um den Kern lagerten. In der LC3-Färbung konnte man ebenfalls eine deutliche Zunahme der gefärbten Strukturen erkennen, diese schienen vereinzelt sogar im Zellkern vorzukommen. In der Überlagerung der Bilder zeigte sich eine Übereinstimmung der FYCO1- und LC3-markierten vesikulären Strukturen (Abb. 15 obere Bilderreihe). Somit ist von einer Kollokalisierung von FYCO1 und LC3 auszugehen. Da LC3 auf der Membran von Autophagosomen



zu finden ist und von einer Kolokalisation von LC3 und FYCO1 auszugehen ist, scheint FYCO1 als lipophiles Membranprotein auch auf Autophagosomen vorzukommen. Dies kann ein Hinweis auf die Rolle von FYCO1 im Transport von Autophagosomen darstellen, welche bereits von Pankiv et al. beschrieben wurde [45].



**Abbildung 15:** Darstellung von NRVCN-Zellen, die entweder mit AdLacZ oder AdFYCO1 infiziert wurden. Maßstabsbalken 10  $\mu\text{m}$ . Während sich in der Kontrollgruppe endogenes FYCO1 oder LC3 kaum darstellen lässt, markiert FYCO1 in der Überexpression schollenartige Vesikel um den Zellkern. Auch LC3 markiert diese schollenartigen Vesikel, sodass von einer Kolokalisation der beiden Proteine auszugehen ist.

### 3.2 Knockdown von FYCO1 *in vitro*

#### 3.2.1 Generierung von synthetischen microRNAs zum „Knockdown“ von FYCO1

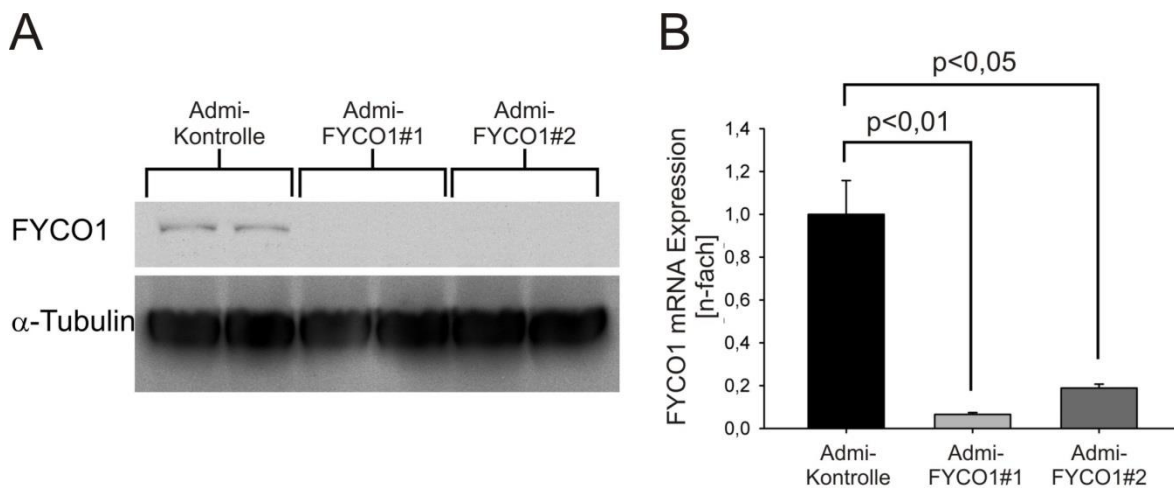
Um den Einfluss der Repression von FYCO1 auf die Autophagie in Kardiomyozyten untersuchen zu können, generierten wir Adenoviren, die für synthetische microRNAs kodieren und gegen FYCO1 gerichtet sind (miR-FYCO1). Das Design der synthetischen microRNAs erfolgte mittels der OligoPerfect Designer Software von Life Technologies. Zur Klonierung eines miR-FYCO1-Virus wurde das BLOCK-IT Expression Vektor Kit von Life Technologies verwendet. Zunächst wurden die synthetisch hergestellten Oligonukleotide kloniert und schließlich über mehrere Zwischenvektoren in den adenoviralen Vektor überführt. Die Plasmidpräparationen erfolgten dabei immer über das

NucleoSpinKit von Marchery Nagel. Nachdem das Plasmid erfolgreich in den pAd-Vektor eingebracht worden war erfolgte eine Maxipräparation mittels Qiagen-Kit zur Erhöhung der Plasmidkonzentration. Um die adenovirale Plasmid-DNA zu linearisieren, erfolgte eine Restriktionsverdau, verwendet wurde dabei ein Kit von New England Biolabs. Schließlich konnte die Transfektion und Adenovirenproduktion in HEK293A-Zellen erfolgen, es wurde ein Viruslysate hergestellt und getitert.

### 3.2.2 Validierung des Knockdown von FYCO1 in Rattenkardiomyozyten

Um die Effizienz der synthetischen microRNAs gegen FYCO1 zu testen, wurden Rattenkardiomyozyten mit 25 moi AdmiR-FYCO1#1 (1788) oder mit 25 moi AdmiR-FYCO1#2 (3457) behandelt. Ein Adenovirus, das für eine synthetische microRNA kodiert, die keine Ziel-Gene im Säugetier haben sollte, diente als Kontrolle. Für beide synthetischen microRNAs konnte ein effizienter Knockdown im Western Blot dokumentiert werden. FYCO1 war auf Proteinebene nach Überexpression von AdmiR-FYCO1#1 und AdmiR-FYCO1#2 in NRVCN nicht mehr nachweisbar.

In der real-time-PCR-Messung konnte durch die Überexpression der synthetischen microRNAs ebenfalls eine signifikante Repression der Transkripte von FYCO1 dokumentiert werden. In der Analyse erzielte die miR-FYCO1#1 einen Knockdown von 93%.

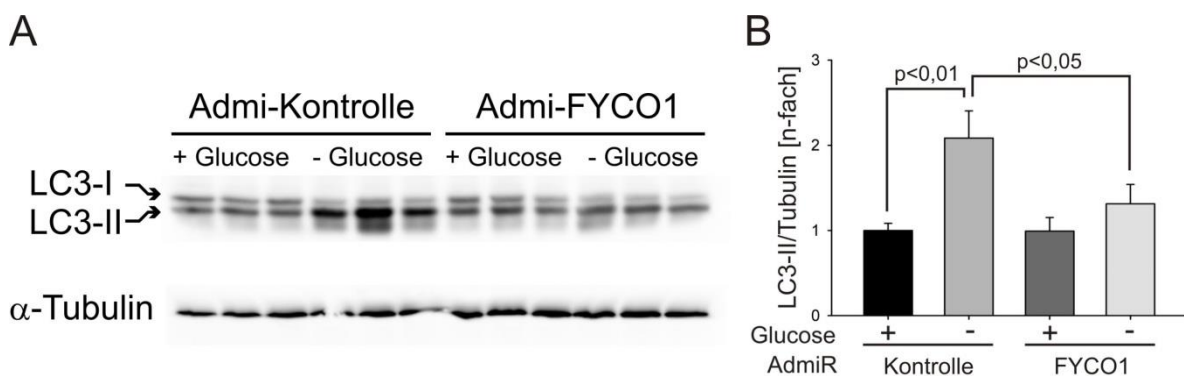


**Abbildung 16: Synthetische microRNAs gegen FYCO1 führen zu einem signifikanten Knockdown.** A) Nach Überexpression von AdmiR-FYCO1#1 und AdmiR-FYCO1#2 in Kardiomyozyten war ein Nachweis von FYCO1 im Western Blot nicht mehr möglich. Der Knockdown war effizient. B) Quantifizierung des Knockdowns von FYCO1 mittels Real Time PCR.

### 3.2.3 Ein Knockdown von FYCO1 verhindert die Induktion von Autophagie in Kardiomyozyten

Zur Evaluation in wie weit FYCO1 in Kardiomyozyten für die Autophagie benötigt wird, untersuchten wir den Einfluss des Knockdowns von FYCO1 unter Autophagie-induzierenden Bedingungen.

Hierzu wurden NRVCMs mit 25 moi AdmiR-FYCO1 infiziert. Nach Kultivierung über 48 h erfolgte der Entzug von Glucose über 24 h. In der Kontrollgruppe kam es zu einem 2,1-fachen Anstieg von LC3-II ( $p < 0,01$ ) nach Glukoseentzug. Nach dem Knockdown von FYCO1 kam es unter Hungerbedingungen in den Kardiomyozyten nur zu einem 1,3-fachen Anstieg von LC3-II, was statistisch nicht signifikant ist. Vergleicht man die beiden Zellpopulationen unter Hungerbedingungen, so zeigte sich ein 0,6-facher Unterschied von LC3-II ( $p < 0,05$ ). Erneut ließ sich in der Kontrollgruppe eine Induktion der Autophagie durch Nahrungsdepletion gemessen durch den Anstieg des Markers LC3 nachweisen. Unter dem Knockdown von FYCO1 hingegen kam es zu keinem Anstieg von LC3 und somit nicht zur Induktion der Autophagie.



**Abbildung 17: Knockdown von FYCO1 verhindert die Induktion von Autophagie in NRVCMs.** A) und B) Darstellung der LC3 Konzentration nach dem Knockdown von FYCO1 und Nahrungsdepletion. Unter Nahrungsdepletion kam es in der Kontrollgruppe zu einem 2,1-fachen Anstieg der LC3-Konzentration. Nach dem Knockdown von FYCO1 kam es unter Nahrungsdepletion nur zu einem 1,3-fachen Anstieg der LC3-Konzentration. Vergleicht man die LC3-Konzentrationen unter Hungerbedingungen, liegt eine 0,6-fache niedrigere Konzentration von LC3 unter dem Knockdown von FYCO1 vor.

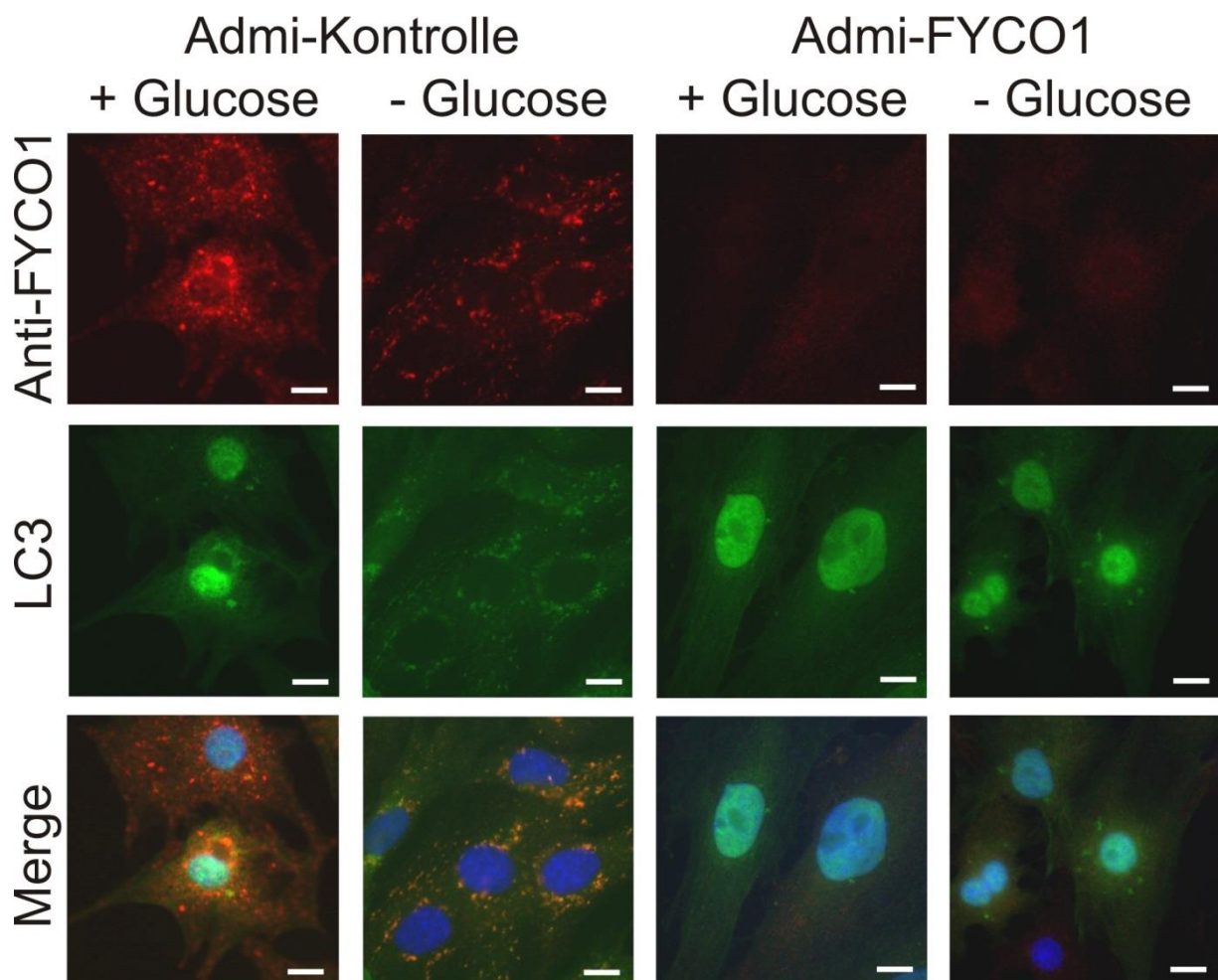
Um die zelluläre Verteilung von LC3 und FYCO1 zu beurteilen wurden immunzytochemische Färbungen an NRVCMs durchgeführt. Nach Kultivierung der Zellen über 24 h erfolgte die Infektion aller Zellen mit 25 moi Ad-GFP-LC3. Zusätzlich wurde eine Hälfte der Zellen mit 20 moi AdmiFYCO1, die andere mit 20 moi AdmiNeg zur Kontrolle infiziert. 48 h nach Infektion erfolgte bei der Hälfte der Zellen ein Glukoseentzug für weitere 24 h.

Unter nährstoffreichen Bedingungen ließ sich in der Kontrollgruppe die physiologische Verteilung von endogenem FYCO1 und GFP-getagtem LC3 darstellen. FYCO1 und LC3 waren dabei um den Zellkern angereichert, in der Peripherie jedoch kaum zu finden. Unter nährstoffreichen Bedingungen findet Autophagie nur auf einem niedrigen Niveau statt. Entzog man diesen Zellen Glukose, so akkumulierte endogenes FYCO1 und GFP-getagtes LC3 um den Zellkern. In der Projektion der Bilder übereinander

demaskierte sich die Kolo-kalisation von FYCO1 und LC3. Die Autophagie wurde durch den Nahrungsentzug aktiviert.

Nach dem Knockdown von FYCO1 war ein Nachweis von endogenem FYCO1 unter nährstoffreichen Bedingungen nicht mehr möglich, die Expression von GFP-getaggttem LC3 befand sich auf einem erniedrigten Niveau. Auch nach Glucoseentzug kam es nicht zu einer Zunahme der FYCO1 und LC3 Expression.

In der Kontrollgruppe konnten LC3 markierte Autophagosomen nach 24-stündigem Glukoseentzug detektiert werden. Im Gegensatz dazu führte ein FYCO1-Knockdown zu einer deutlichen Reduktion der markierten Zellorganellen unter Glucoseentzug. Daher scheint FYCO1 eine Schlüsselrolle in der Bildung von Autophagosomen und damit im Prozess der Autophagie zu spielen.

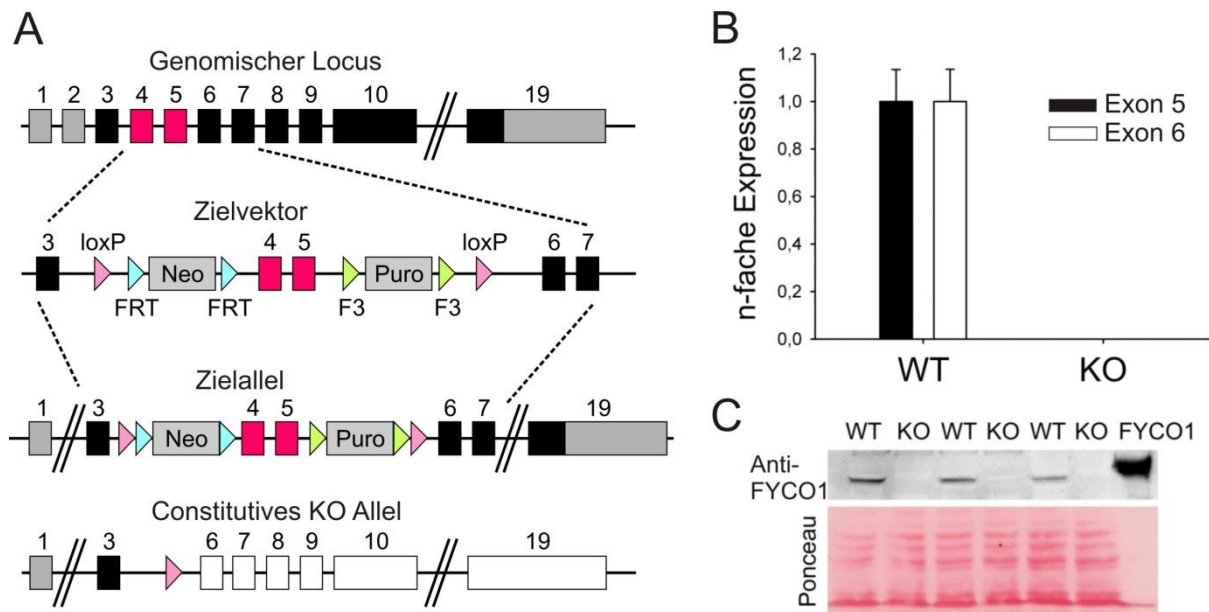


**Abbildung 18: Der Knockdown von FYCO1 verhindert die Bildung von Autophagosomen. Immunzytochemie von Autophagosomen. Maßstab 10 µm.** Bildspalte 1) Darstellung von endogenem FYCO1 und GFP-getaggttem LC3 unter physiologischen Bedingungen. Bildspalte 2) Erhöhtes Vorkommen von endogenem FYCO1 und GFP-getaggttem LC3 unter Hungerbedingungen, was ein erhöhtes Autophagielevel bedeutet. Bildspalte 3) Nach dem Knockdown von FYCO1 war FYCO1 und LC3 kaum noch nachweisbar. Bildspalte 4) Auch Nahrungsentzug löste nur eine geringe Bildung von LC3 aus, was auf eine kaum vorhandene Autophagieaktivität hinweist.

### 3.3 Untersuchungen zu FYCO1 im Mausmodell

#### 3.3.1 Generierung einer FYCO1-defizienten Maus

Um die zelluläre Funktion von FYCO1 *in vivo* zu untersuchen, wurde in Zusammenarbeit mit Taconic Artemis ein konstitutives Knockout-Mausmodell entwickelt. Dazu wurden die Exone 4 und 5 deletiert sowie eine Verschiebung des Leserahmens nach homologer Rekombination herbeigeführt. Die Strategie erlaubte über loxP-Schnittstellen sowohl die Generierung eines konditionellen als auch eines konstitutiven Knockouts.



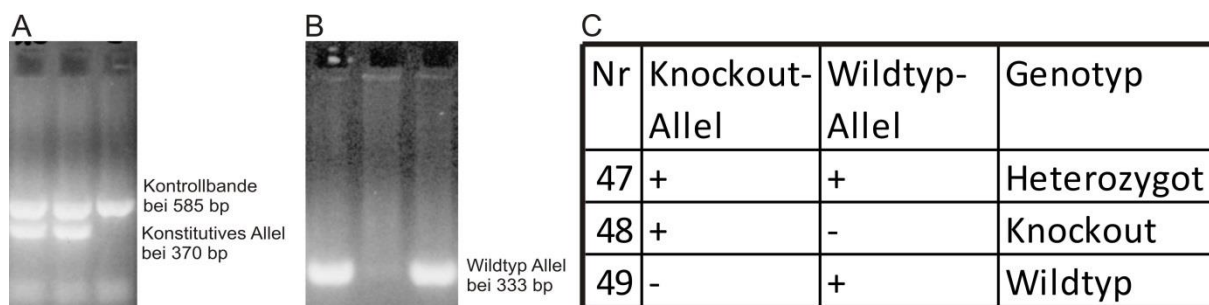
**Abbildung 19:** A) Schematische Darstellung des genomsichen Locus, des Zielvektors und des geschnittenen konstitutiven KO-Allels B) Auf DNA-Ebene wurde mittels einer PCR die einfache Expression der Genabschnitte Exon 5 und Exon 6 von FYCO1 in DNA-Proben von WT-Mäusen nachgewiesen. Bei DNA-Proben aus KO-Mäusen wurden beide Exone nicht mehr nachgewiesen, sodass man von einem kompletten Knockout sprechen kann. C) Nachweis von physiologischem FYCO1 in Proteinproben aus WT-Mäusen mittels eines anti-FYCO1-Antikörpers im Western Blot. In den Proteinproben aus den KO-Mäusen lässt sich kein FYCO1 mehr nachweisen, was ein erfolgreiches Einfügen des Zielvektors beweist.

Zur Generierung eines konstitutiven KO-Tieres fand eine Verpaarung der chimären Maus mit einer sogenannten „Cre-deleter“-Maus (cyclisation recombination) statt. Die „Cre-deleter“-Maus bildet Rekombinasen, die die Spaltung und erneute Verknüpfung von DNA zwischen spezifischen Basensequenzen katalysiert. Als Schnittstelle im Zielvektor diente die Erkennungssequenz loxP, die vor und hinter den Zielgenabschnitt eingefügt wurde. Bei den homozygoten Nachkommen war das FYCO1 auf Proteinebene nicht mehr nachweisbar. Homozygote Tiere wurden in den nach Mendel zu erwartenden Verhältnissen geboren. Exon 5 und 6 waren durch eine rt-PCR in den folgenden Generationen nicht mehr nachweisbar, da die Transkription durch die Deletion abbrach. Auch im Western Blot konnte bei KO-Mäusen das Protein FYCO1 nicht mehr nachgewiesen werden.

### 3.3.2 Basisanalysen der FYCO1-defizienten Maus

#### Genotypisierung der FYCO1-KO-Maus

Zur Genotypisierung jeder Maus wurde mittels PCR eine DNA-Analyse durchgeführt. Von jedem Tier wurde eine Biopsie der Mausschwanzspitze genommen und daraus die DNA extrahiert. Die gewonnene DNA wurde dann in die PCR eingesetzt. Um eine eindeutige Genotypisierung jeder Maus vornehmen zu können wurden zwei PCR-Ansätze benötigt. Schließlich wurden die amplifizierten PCR-Produkte auf ein Ethidiumbromidgel aufgetragen (Abb. 20 A, B). In der ersten Gelanalyse der PCR-Produkte zeigte sich eine Kontrollbande bei 585 bp und eine Bande für das amplifizierte KO-Allel bei 370 bp (Abb. 20 A). In der zweiten Gelanalyse zeigte sich das Wildtyp-Allel bei 333 bp (Abb. 20 B). Die Genotypisierung erfolgte aus der Kombination der Bandenergebnisse (Abb. 20 C).



**Abbildung 20: Beispielhafte Darstellung einer Genotypisierung anhand der Mäuse #47, #48 und #49.** A) Gelbande des konstitutiven Allels bei 370 bp und der Kontrolle bei 585 bp B) Gelbande des WT-Allels bei 333 bp C) Auswertung der Gelbanden und anschließende Bestimmung des Genotyps.

#### Morphometrie der FYCO1-Knockout Maus

Für die Evaluation der pathophysiologischen Effekte durch den Knockout von FYCO1 im Tiermodell wurden morphometrische, echokardiographische und genanalytische Daten an zwei verschiedenen Tierkollektiven mit vier Monaten bzw. einem Jahr erhoben.

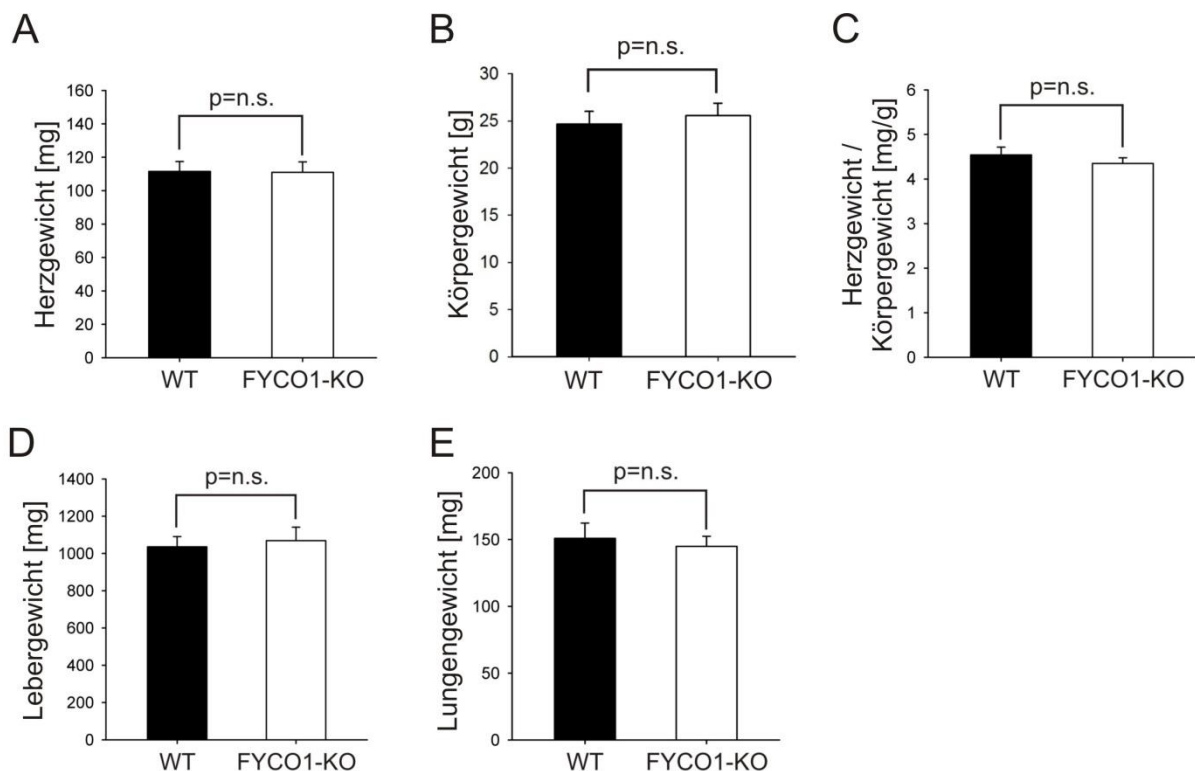
Die zuerst untersuchte Tierpopulation war ungefähr vier Monate alt. Im Tierkollektiv der Knockout-Mäuse (KO-Maus) waren 7 Tiere, 4 Männchen und 3 Weibchen. Als Kontrollgruppe (WT-Maus) wurden 8 Wildtypgeschwister verwendet, je 4 männliche und 4 weibliche Tiere. Die morphometrischen Daten wurden in Tabelle 20 zusammengefasst.

Das Körpergewicht der KO-Tiere betrug im Mittelwert 25,6 g, das ihrer WT-Geschwister 24,7 g. Das Herzgewicht der KO-Tiere betrug im Mittelwert 111 mg, das der Kontrolltiere 111,5 mg. Die Herzgewicht/Körpergewicht-Ratio betrug im Mittelwert bei den KO-Tieren 4,3 mg/g, bei den Wildtyptieren 4,5 mg/g. Bei statistisch nicht signifikanten Unterschieden in Körper- oder Herzgewicht und der Ratio scheint der Knockout von FYCO1 unter physiologischen Bedingungen keinen Einfluss auf die Skelettmuskulatur oder die Kardiomyozyten im Sinne einer Hypertrophie oder Hyperplasie zu

haben. Das Lungengewicht der KO-Tiere betrug im Mittel 144,9 mg, das der WT-Tiere 150,9 mg. Das Lebergewicht betrug bei den KO-Tieren im Mittelwert 1068,9 mg und 1035,5 mg bei den Kontrolltieren. Statistisch zeigten sich auch hier keine signifikanten Unterschiede, sodass keine Hinweise auf eine Linksherz- oder Rechtsherzinsuffizienz bestanden. Die Pumpfunktion des Herzens und damit die Funktionsfähigkeit der Herzmuskelzellen scheint im jungen Alter durch einen Knockout von FYCO1 ebenfalls nicht beeinträchtigt.

**Tabelle 20 Morphometrie der FYCO1-KO-Maus im Alter von 4 Monaten**

gemessener Parameter	Wildtyp-Kollektiv (n=8)	Knockout-Kollektiv (n=7)
Alter [d]	129,4	128,7
Geschlecht [M/W]	4/4	4/3
Körpergewicht [g]	24,7	25,6
Herzgewicht [mg]	111,5	111
Herz-/Körpergewicht [mg/g]	4,5	4,3
Lungengewicht [mg]	150,9	144,9
Lebergewicht [mg]	1035,5	1068,9
Fractional Shortening [%]	56,08	57,33



**Abbildung 21: FYCO1-defiziente Mäuse unterscheiden sich nicht von ihren WT-Geschwistertieren.** Morphometrie der FYCO1 KO-Maus nach 4 Monaten im Vergleich zu einer gleichaltrigen WT-Maus A) Herzgewicht B) Körpergewicht C) Verhältnis Herz- zu Körpergewicht D) Lebergewicht E) Lungengewicht. Die Gruppen zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede in den morphologisch untersuchten Körperteilen.

## Bestimmung der Herzfunktion mittels Echokardiographie

Zur Bestimmung der Herzfunktion wurde eine Echokardiographie an einem Kollektiv von circa vier Monate alten Mäusen durchgeführt. Gemessen wurden das Fractional Shortening (FS), der LVIDd und LVIDs, die IVSd und IVSs, die PWd und PWs und die Herzfrequenz. Folgende Tabelle zeigt eine Auflistung aller Messwerte.

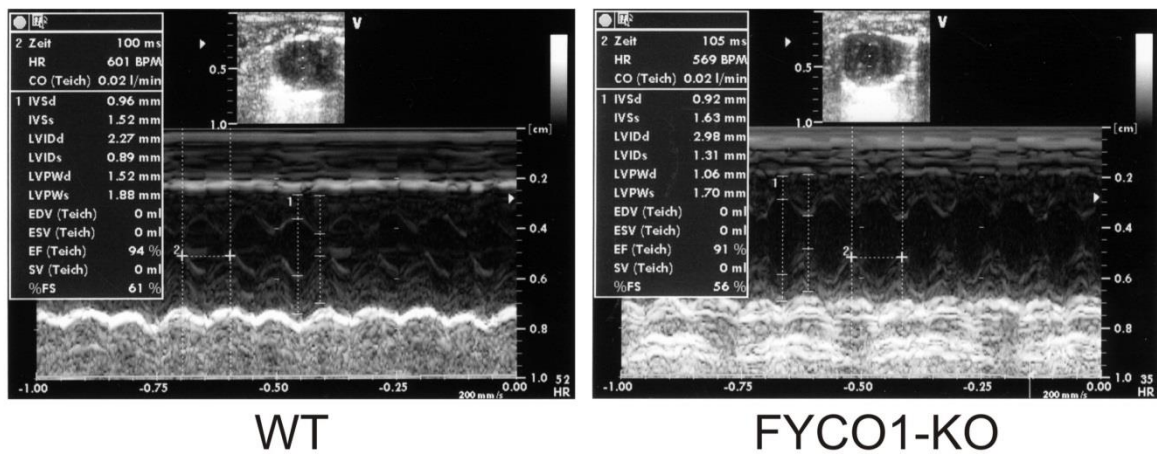
**Tabelle 21 Echokardiographisch ermittelte Herzfunktion im Alter von 4 Monaten**

<b>gemessener Parameter</b>	<b>Wildtyp-Kollektiv (n=8)</b>	<b>Knockout-Kollektiv (n=7)</b>
Herzfrequenz [bpm]	551,92	563,74
Fractional Shortening [%]	56,08	57,33
LVIDd [mm]	2,65	2,66
LVIDs [mm]	1,18	1,14
IVSd [mm]	0,92	0,89
IVSs [mm]	1,10	1,17
PWd [mm]	1,00	1,08
PWs [mm]	1,47	8,56

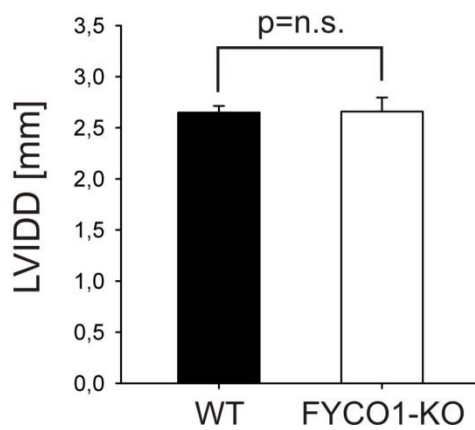
In keiner der Untersuchungen konnte ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden. Der Knockout von FYCO1 hat im Alter von 4 Monaten bei Mäusen keinen Einfluss auf die Herzfunktion.



A



B



C

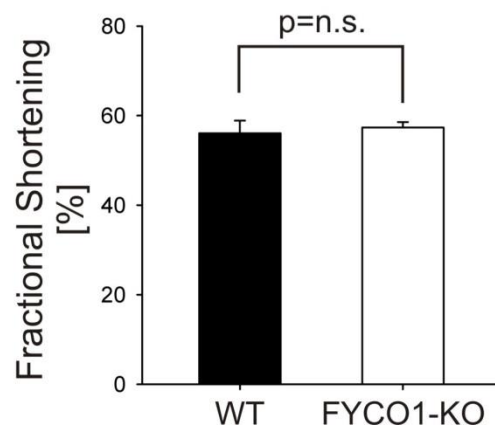


Abbildung 22: Echokardiographie A) Echokardiographische Untersuchung und Darstellung der ermittelten Messwerte B) LVIDD [mm] C) Fractional Shortening [%]

### Morphometrie und Herzfunktion der FYCO1-KO-Maus im Alter

Um die morphologischen Daten zu bestätigen bzw. eine Veränderung im Laufe des Lebens zu erkennen, wurde eine zweite Tierpopulation mit einem Alter von circa einem Jahr gezüchtet. In der Kontrollgruppe befanden sich 5 weibliche Mäuse, in der KO-Gruppe 8 weibliche. Es wurden das Herz- und Körpergewicht ermittelt und die Ratio errechnet, das Gewicht des linken Ventrikels ermittelt und die Ratio zum Körpergewicht berechnet und das Fractional Shortening mittels Ultraschall bestimmt. In der statistischen Analyse zeigte sich auch nach einem Jahr Lebensdauer bei keinem der verglichenen Messwerte ein signifikanter Unterschied.

Tabelle 22 Morphometrie und Fractional Shortening der FYCO1-KO-Maus im Alter von einem Jahr

gemessener Parameter	Wildtyp-Kollektiv (n=5)	Knockout-Kollektiv (n=8)
Alter [w]	53	53,4
Geschlecht [M/W]	0/5	0/8
Körpergewicht [g]	29,3	27,9
Herzgewicht [mg]	124,6	121,9
Herz-/Körpergewicht [mg/g]	4,3	4,4
Lungengewicht [mg]	100,4	102,1
Lungen-/Körpergewicht [mg]	3,4	3,7
Fractional Shortening [%]	42,10	37,6

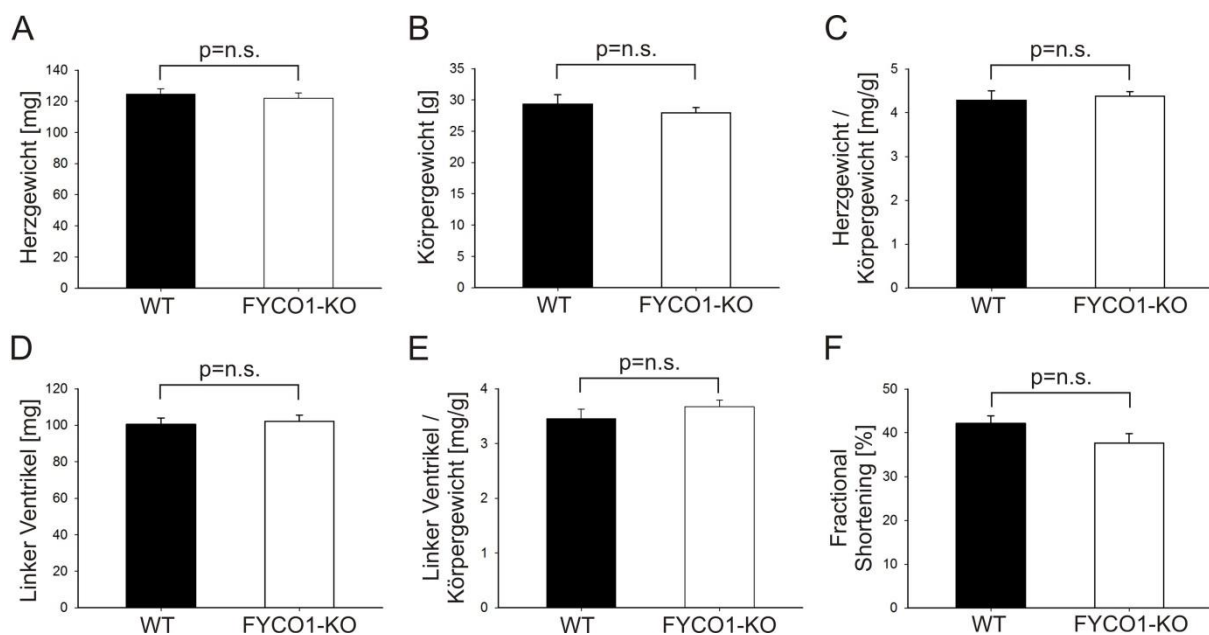
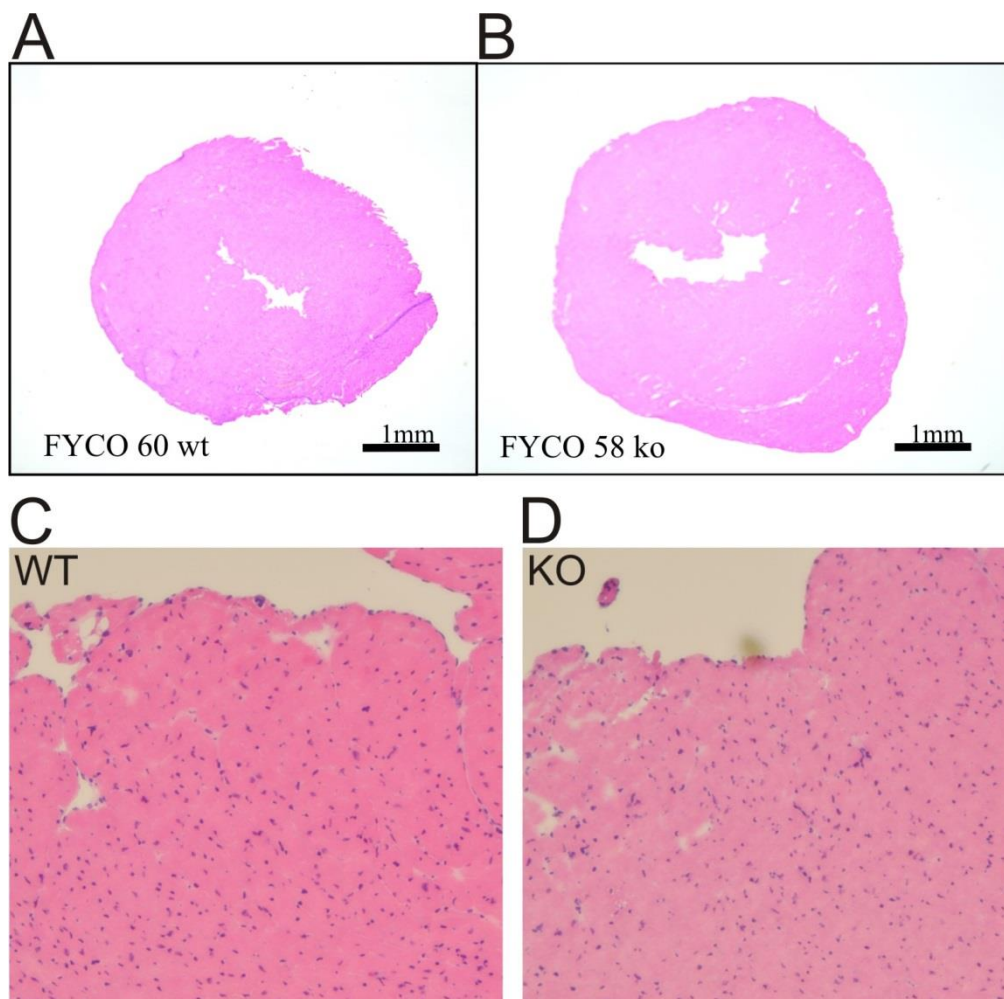


Abbildung 23: Morphometrie der FYCO1-KO-Maus nach einem Jahr im Vergleich zu einer gleichaltrigen WT-Maus. A) Herzgewicht B) Körpergewicht C) Verhältnis Herz- zu Körpergewicht D) Gewicht des linken Ventrikels E) Verhältnis linker Ventrikel zu Körpergewicht F) Fractional Shortening. Die beiden Mäusepopulationen zeigen auch nach einer Lebensdauer von einem Jahr keine statistisch signifikanten Unterschiede in den morphologisch untersuchten Körperteilen.

#### Histologie des Herzens bei FYCO1-KO-Mäusen

Um weitere morphologische Unterschiede zu finden, wurden histologische Schnitte aus dem Herzgewebe der 4 Monate alten Tiere erstellt. Dazu wurde KO- und WT-Mäusen post mortem das Herz entnommen und zu Kryoschnitten aufgearbeitet. Exemplarisch werden hier zwei Kryoschnitte von zwei genotypisch unterschiedlichen Tieren dargestellt (Abb. 24). Histologisch konnte in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung bei Betrachten des Herzgewebes der KO-Tiere keine Veränderung im Vergleich zum Herzgewebe der Kontrolltiere festgestellt werden.



**Abbildung 24: Histologie des Herzen mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung** A) Querschnitt des Herzens einer WT-Maus B) Querschnitt des Herzens einer KO-Maus C) und D) Ausschnittsvergrößerung aus den Übersichtsaufnahmen.

#### Genexpressionsanalysen bei FYCO1-KO-Mäusen mittels quantitativer Real Time PCR

Um eine möglicherweise veränderte Expression verschiedener Gene, besonders derer, die bei kardialer Hypertrophie bekanntermaßen im Herzen hochreguliert werden, bei FYCO1-KO-Tieren insbesondere im Herzen zu ermitteln, führten wir eine quantitative Real Time PCR durch. Zielgene waren Nppa (ANP) und Nppb (BNP). In der FYCO1-KO-Gruppe zeigte sich eine 1,16-fache Expression von Nppa und eine 1,25-fache Expression von Nppb. In der Analyse zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Genexpression von Nppa oder Nppb bei WT- versus KO-Mäusen.

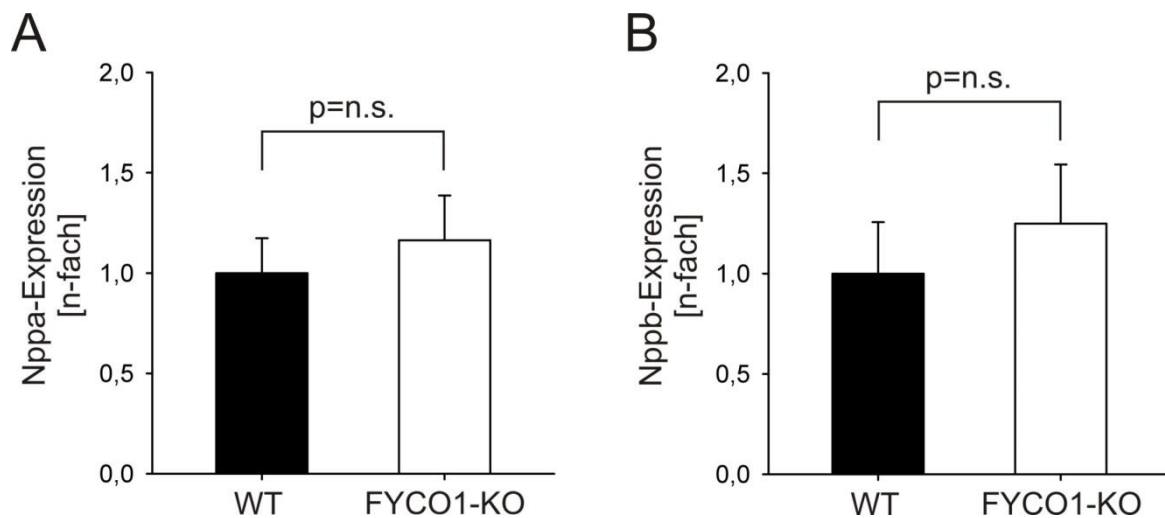


Abbildung 25: Genexpressionsprofil von Nppa (ANF) und Nppb (BNP) bei FYCO1-KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen.

### 3.3.3 Analyse der FYCO1-defizienten Maus unter Stressbedingungen

#### Morphologische Veränderungen bei den FYCO1-KO-Mäusen unter Hungerbedingungen

In den vorausgegangenen Versuchen zeigten sich keine Unterschiede zwischen den WT- und KO-Tieren bezüglich ihrer quantitativen und qualitativen Herzfunktion unter basalen Bedingungen. Um mehr über die Eigenschaften und Funktionen von FYCO1 zu erfahren, wurden die Tiere Stress ausgesetzt, um eine Stimulation der Genexpression zu erreichen. Nahrungsentzug ist ein solcher Stressfaktor. In der zu untersuchenden Mäusepopulation wurde den Tieren die Nahrung für 48 h entzogen, bevor eine Echokardiographie durchgeführt wurde.

5 WT- und 4 KO-Mäuse als Kontrollpopulation erhielten Nahrung, 5 WT- und 5 KO-Mäuse als Testpopulation wurden dem Nahrungsentzug ausgesetzt. Die Tiere waren zwischen 8,1 und 9,3 Wochen alt und alle weiblichen Geschlechts.

Beim Vergleich der Herzgewichte der vier Tiergruppen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Populationen. Vergleicht man dagegen das Körpergewicht, so findet sich ein signifikanter Unterschied von  $p < 0,05$  in der WT-Population zwischen den Gruppen mit unterschiedlicher Futterbedingung. In der KO-Gruppe lässt sich dieser Effekt nicht in demselben Ausmaß zeigen.

Tabelle 23 Morphometrie der FYCO1-KO-Maus im Vergleich zur WT-Maus unter Hungerbedingungen

gemessener Parameter	Wildtyp-Kollektiv (n=10)		Knockout-Kollektiv (n=9)	
	Nahrung (n=5)	Hunger (n=5)	Nahrung (n=4)	Hunger (n=5)
Alter [w]	8,5	8,5	8,7	9,2
Behandlung [d]	2	2	2	2
Geschlecht [M/W]	0/5	0/5	0/4	0/5
Körpergewicht [g]	17,5	14,1	16,2	13,9
Herzgewicht [mg]	88	82,9	81,8	80,4
Herz-/Körpergewicht [mg/g]	5	5,9	5,1	5,8

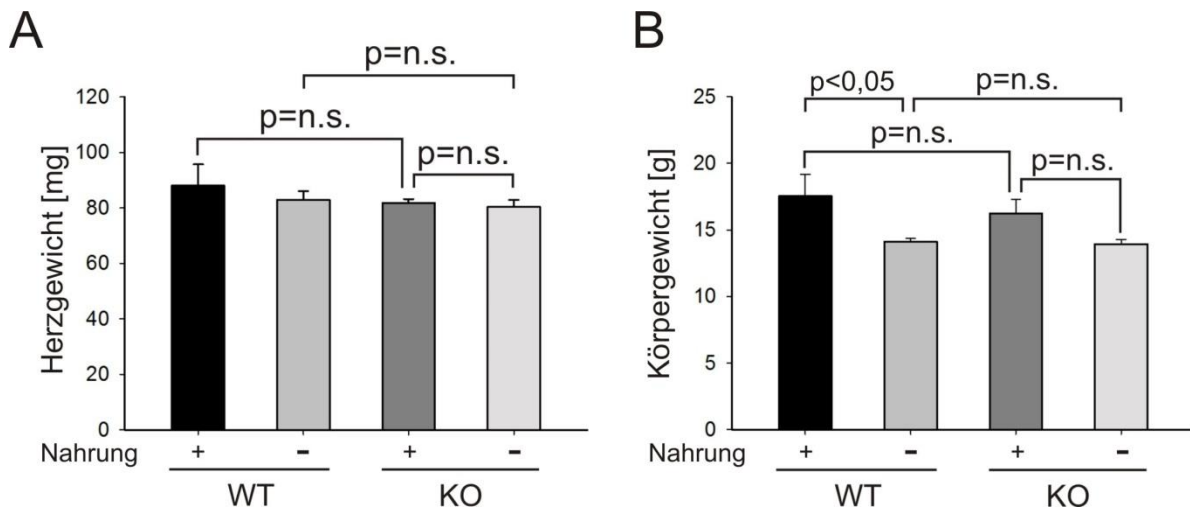


Abbildung 26: Morphometrie der FYCO1-KO-Maus im Vergleich zur WT-Maus unter Hungerbedingungen A) Herzgewicht B) Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht

#### Echokardiographische Analyse der FYCO1-KO-Maus unter Hungerbedingungen

Um die Herzfunktion der Mäuse beurteilen zu können, insbesondere auch unter Stressbedingung für das Myokardgewebe hervorgerufen durch einen zellulären Nährstoffmangel, und eine mögliche Beeinflussung durch das Fehlen des Proteins FYCO1 erfassen zu können, wurde eine Echokardiographie an FYCO1-defizienten Mäusen durchgeführt. Die Hungerperiode betrug 48 h. In der Echokardiographie wurde das Fractional Shortening als Maß für die Auswurfleistung des linken Ventrikels gemessen. Weiterhin wurde der LVIDd, die IVSd und der LVPWd bestimmt.

Das Fractional Shortening wurde bei den WT-Tieren unter basalen Bedingungen mit 50,2%, bei den WT-Tieren unter Nahrungsentzug mit 49,7 % gemessen. In der KO-Gruppe wurde ein Fractional Shortening von 52,3 % unter basalen Bedingungen und 37,9 % unter Nahrungsentzug ermittelt (Tab. 24). Es zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied von  $p < 0,05$  innerhalb der KO-Gruppe und im Vergleich von WT- und KO-Mäusen unter Hungerbedingungen. Dies bedeutet dass die Auswurfleistung des Herzens bei FYCO1-KO-Mäusen unter Hungerbedingungen eingeschränkt ist.

Die Messergebnisse der anderen kardiologischen Funktionsparameter ergaben in der statistischen Untersuchung keine signifikanten Unterschiede (Tab. 24).

Tabelle 24 Echokardiographische Daten der FYCO1-KO-Maus im Vergleich zur WT-Maus unter Hungerbedingungen

gemessener Parameter	Wildtyp-Kollektiv (n=10)		Knockout-Kollektiv (n=9)	
	Nahrung (n=5)	Hunger (n=5)	Nahrung (n=4)	Hunger (n=5)
Fractional Shortening [%]	50,2	49,7	52,3	37,9
LVEDd [mm]	2,8	2,9	2,8	2,9
IVSd [mm]	0,7	0,8	0,8	0,8
LVPWd [mm]	0,6	0,6	0,7	0,7

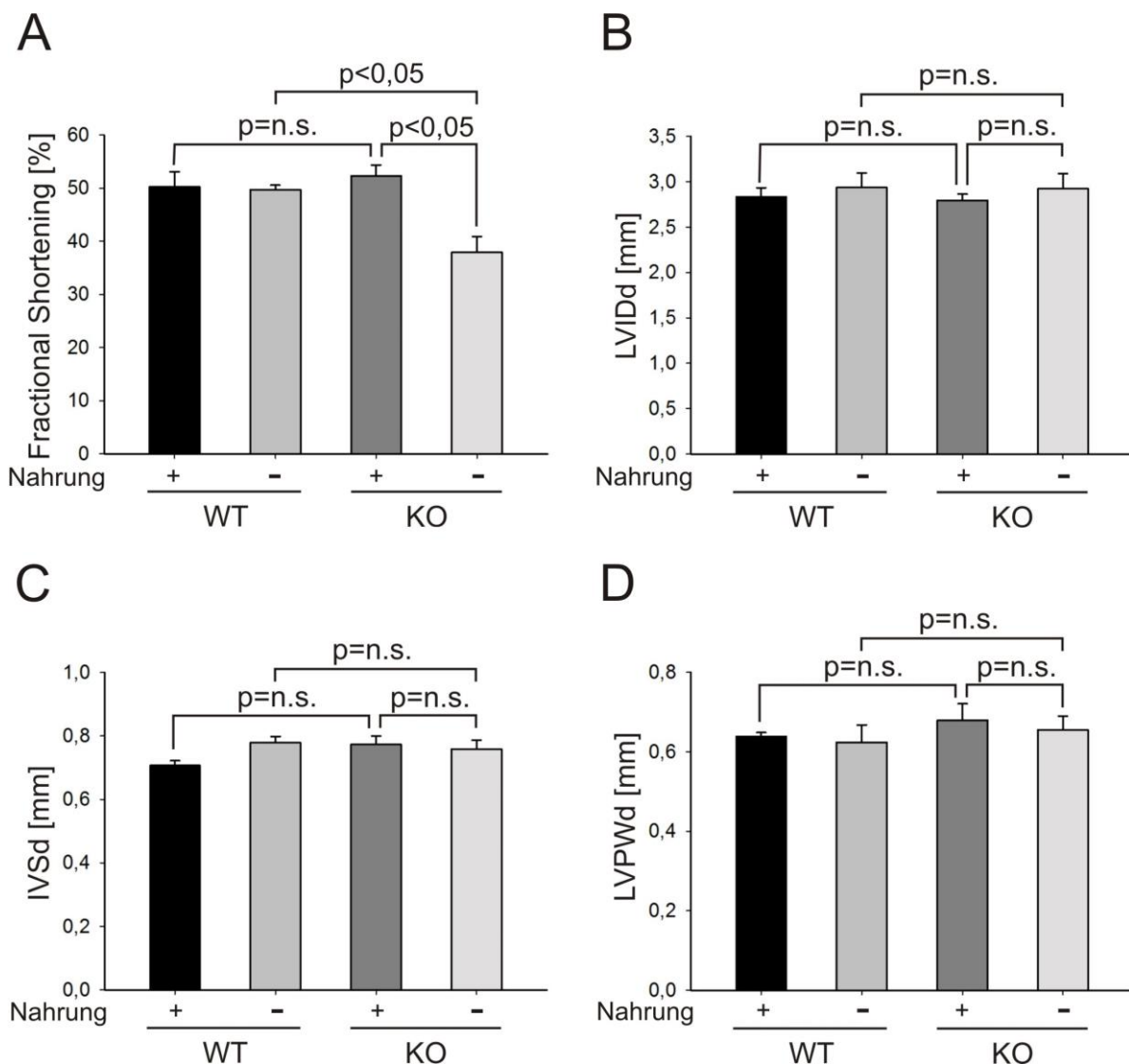


Abbildung 27: Hungerperioden über 48 h führen bei FYCO1-KO-Mäusen zu einer eingeschränkten Herzfunktion. A) In der WT-Maus lässt sich auch unter 48-stündiger Nahrungskarenz keine Einschränkung der Herzfunktion ermitteln. Bei FYCO1-KO-Mäusen dagegen ist eine Abnahme des Fractional Shortenings um 14,4% auf 37,9% messbar. Dies stellt einen statistisch signifikanten Unterschied von  $p < 0,05$  dar. B), C) und D) Keine statistisch signifikanten Unterschiede zeigen sich dagegen in LVIDd, IVSd und LVPWd.

FYCO1 scheint daher im Stoffwechsel der Kardiomyozyten eine Funktion zu erfüllen, die unter zellulärem Stress nicht durch andere Mechanismen kompensiert werden kann.

#### Autophagie in FYCO1-KO-Mäusen unter Hungerbedingungen

Um auf zellulärer Ebene den Einfluss von FYCO1 unter Stressbedingungen auf die Autophagie im Herzen und damit LC3 als Marker zu untersuchen, wurde allen Tieren post mortem Herzgewebe entnommen. Aus dem Herzgewebe wurde Protein extrahiert und im Western-Blot aufgetragen.

In der quantitativen Analyse lässt sich eine 1,78-fache Expression von LC3-II in der hungernden WT-Gruppe ermitteln bezogen auf die Expression von LC3-II in der WT-Gruppe unter basalen Bedingungen ( $p < 0,001$ ). In der KO-Gruppe ist die LC3-II-Konzentration 0,45-fach vermindert. Ist die KO-Population Nährstoffmangel ausgesetzt, kann kein Anstieg der LC3-II-Konzentration gemessen werden ( $p = n.s.$ ).

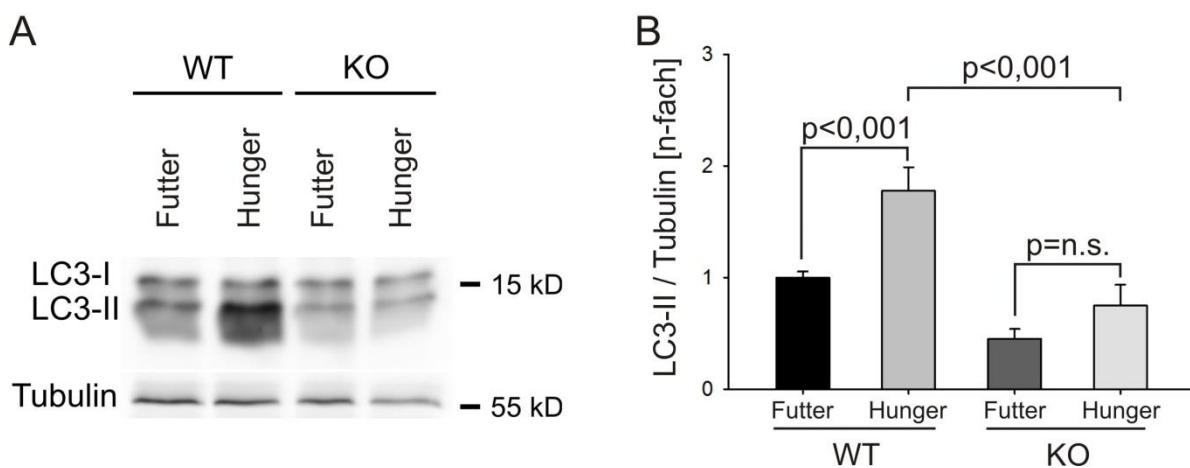


Abbildung 28: A) Darstellung von LC3 bei WT-Mäusen und KO-Mäusen nach einer Hungerperiode von 48 h im Western Blot; die Tubulinkontrolle zeigt eine gleichmäßige Beladung an. B) Statistische Auswertung der LC3-II-Konzentration gemessen im Western Blot mit hohen signifikanten Unterschieden innerhalb der WT-Population und im Vergleich beider hungernder Gruppen.

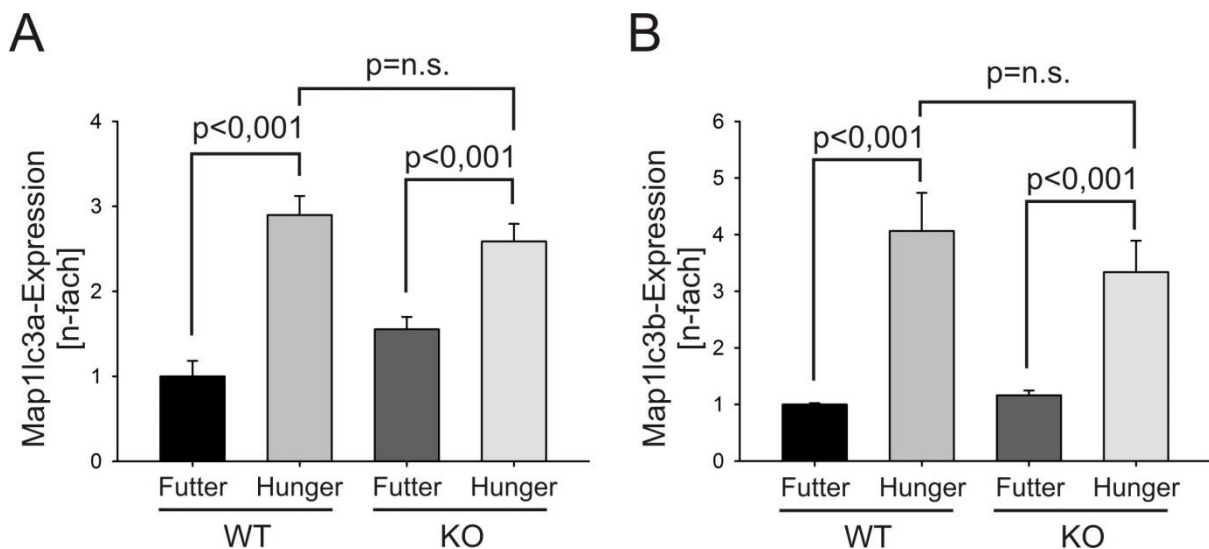
#### Genexpression von Map1lc3a und Map1lc3b in FYCO1-KO-Mäusen unter Hungerbedingungen

Wie unsere vorangegangenen Ergebnisse zeigen, steigt bei WT-Mäusen unter Nahrungsdepletion die Proteinkonzentration von LC3 in Myokardzellen an und die Autophagie wird induziert. Bei FYCO1-KO-Mäusen ist dieser Anstieg der LC3-Konzentration nicht nachzuvollziehen. Um daher den Einfluss von FYCO1 auf das Expressionsprofil anderer Gene in Myokardzellen, insbesondere derer, die für Proteine kodieren, die in der Autophagie eine Rolle spielen, auf molekularer Ebene zu untersuchen, führten

wir eine rt-PCR durch. Unter anderem wurde das Expressionsprofil von LC3 (Map1lc3a und Map1lc3b) als Marker der Autophagie ermittelt. Untersucht wurde die Kardiomyozyten-DNA aus WT- und KO-Mäusen, wobei eine Population einer Nahrungskarenz von 48 h ausgesetzt war.

In der rt-PCR ließ sich ausgehend von einer einfachen Expression von LC3a in der gefütterten WT-Gruppe eine 2,9-fach erhöhte LC3a-Genexpression in der WT-Gruppe mit Nahrungsentzug messen. In der KO-Gruppe wurde eine 1,55-fach erhöhte LC3a-Konzentration unter basalen Bedingungen gemessen, die sich durch Nährstoffentzug auf eine 2,59-fache Genexpression erhöhte. Analog dazu ließ sich ausgehend von einer einfachen Expression von LC3b in der gefütterten WT-Gruppe eine 4,06-fach erhöhte Genexpression unter Nahrungsentzug messen. In der KO-Population konnte eine 1,16-fach erhöhte LC3b-Konzentration unter basalen Bedingungen und eine 3,34-fach erhöhte Konzentration unter Nahrungsdepletion ermittelt werden.

In der statistischen Analyse ergab sich sowohl für die LC3a als auch für die LC3b Genexpression ein signifikanter Unterschied von  $p < 0,001$  im Vergleich der gefütterten zu den hungernden Tieren jeweils innerhalb eines Genotyps. Vergleicht man jedoch die beiden hungernden Gruppen, lässt sich kein statistisch signifikanter Unterschied erkennen. Das Ergebnis eines gesteigerten Expressionsprofils von LC3 auf DNA-Ebene steht im Kontrast zu einer nahezu konstanten Proteinkonzentration von LC3 unter Hungerbedingungen im KO-Modell. Daher sind die niedrigen Proteinkonzentrationen von LC3 nicht auf ein vermindertes Expressionsprofil zurück zu führen, sondern weisen auf einen erhöhten Umsatz oder Abbau von LC3 hin.



**Abbildung 29: Quantitatives Expressionsprofil von LC3 in Myokardzellen gemessen mit der rt-PCR** A) LC3a-Genexpression B) LC3b-Genexpression



### 3.3.4 Konstriktion der Aorta transversa zur experimentellen Nachlasterhöhung im FYCO1-KO-Mausmodell

Morphometrische Basisanalyse des FYCO1-KO-Mausmodelles nach Konstriktion der Aorta transversa  
Um mehr über die Rolle von FYCO1 in der kardialen Hypertrophie und Autophagie zu erfahren, induzierten wir bei einer Mauspopulation eine kardiale Hypertrophie. Die kardiale Hypertrophie wurde durch eine transthorakale Konstriktion der Aorta transversa, im Folgenden als TAC abgekürzt, provoziert. Die Mauspopulation, die eine Konstriktion erhalten hatte, wurde als TAC-Gruppe bezeichnet. Die Sham-Gruppe, die zwar ebenfalls eine Eröffnung des Brustkorbes und Darstellung des Aortenbogens, jedoch keine Konstriktion erhalten hatte, diente als Vergleichspopulation. Die TAC-Operation wurde freundlicherweise von Dr. med. C. Kuhn durchgeführt.

In dieser Population waren alle Tiere weiblich und zwischen 11,9 und 14,3 Wochen alt. Die Konstriktion wurde für 7 Tage durchgeführt. 6 WT-Tiere erhielten eine Sham-Operation, 7 WT-Tiere erhielten eine TAC-Operation. Bei 7 KO-Tieren wurde eine Sham-Operation durchgeführt, bei 10 KO-Tieren wurde eine TAC-Operation durchgeführt. Nach der 7-tägigen Konstriktion erfolgte eine Echokardiographie und anschließende Tötung der Mäuse mit Organentnahme.

Das Körpergewicht der Mäuse betrug im Mittel bei den WT/Sham-Tieren 20,43 g, bei den WT/TAC-Tieren 19,9 g, bei den KO/Sham-Tieren 20,41 g und bei den KO/TAC-Tieren 20,42 g. Statistisch signifikante Unterschiede bestanden nicht.

Das Herzgewicht der WT/Sham-Mäuse betrug 102,45 mg, das der WT/TAC-Mäuse 132,47 mg, was einer 1,29-fachen Zunahme entspricht. Das Herzgewicht der KO/Sham-Mäuse betrug 100,5 mg und das der KO/TAC-Mäuse 136,49 mg, welches einer 1,36-fachen Zunahme entspricht.

Die Herzgewicht/Körpergewicht-Ratio zeigte sich nach TAC-Operation in der WT-Gruppe 1,3-fach und in der KO-Gruppe 1,36-fach erhöht.

Weiterhin wurde das Gewicht des linken Ventrikels bestimmt und der Quotient aus linkem Ventrikelgewicht zum Körpergewicht errechnet (Tab. 25).

Bei der statistischen Untersuchung wurde ein hoher signifikanter Unterschied von  $p < 0,001$  sowohl im Hinblick auf das Herzgewicht, wie auch auf das Gewicht des linken Ventrikels, die Herzgewicht zu Körpergewicht Ratio und die linker Ventrikel zu Körpergewicht Ratio im Vergleich beider WT-Populationen und beider KO-Gruppen miteinander festgestellt. Die erhöhte Herzgewicht zu Körpergewicht Ratio aufgrund eines erhöhten Herzgewichtes bei konstant gebliebenem Körpergewicht ließ auf eine kardiale Hypertrophie schließen. Die kardiale Hypertrophie ließ sich gleichermaßen bei beiden Genotypen auslösen.

Tabelle 25 Morphometrie der FYCO1-KO-Maus, die einer TAC-Operation unterzogen wurde

gemessener Parameter	Wildtyp-Kollektiv (n=13)		Knockout-Kollektiv (n=17)	
	Sham (n=6)	TAC (n=7)	Sham (n=7)	TAC (n=10)
Alter [w]	14,2	12,8	14,2	13,9
Behandlung [d]	7	7	7	7
Geschlecht [M/W]	0/6	0/7	0/7	0/10
Körpergewicht [g]	20,43	19,9	20,41	20,42
Herzgewicht [mg]	102,45	132,47	100,5	136,49
Herz-/Körpergewicht [mg/g]	5,01	6,66	4,92	6,68
Linker Ventrikel [mg]	75,67	102,16	73,27	105,94
Linker Ventrikel/Körpergewicht [mg/g]	3,7	5,14	6,59	5,19
Tibia [mm]	16,02	15,96	15,9	16,14

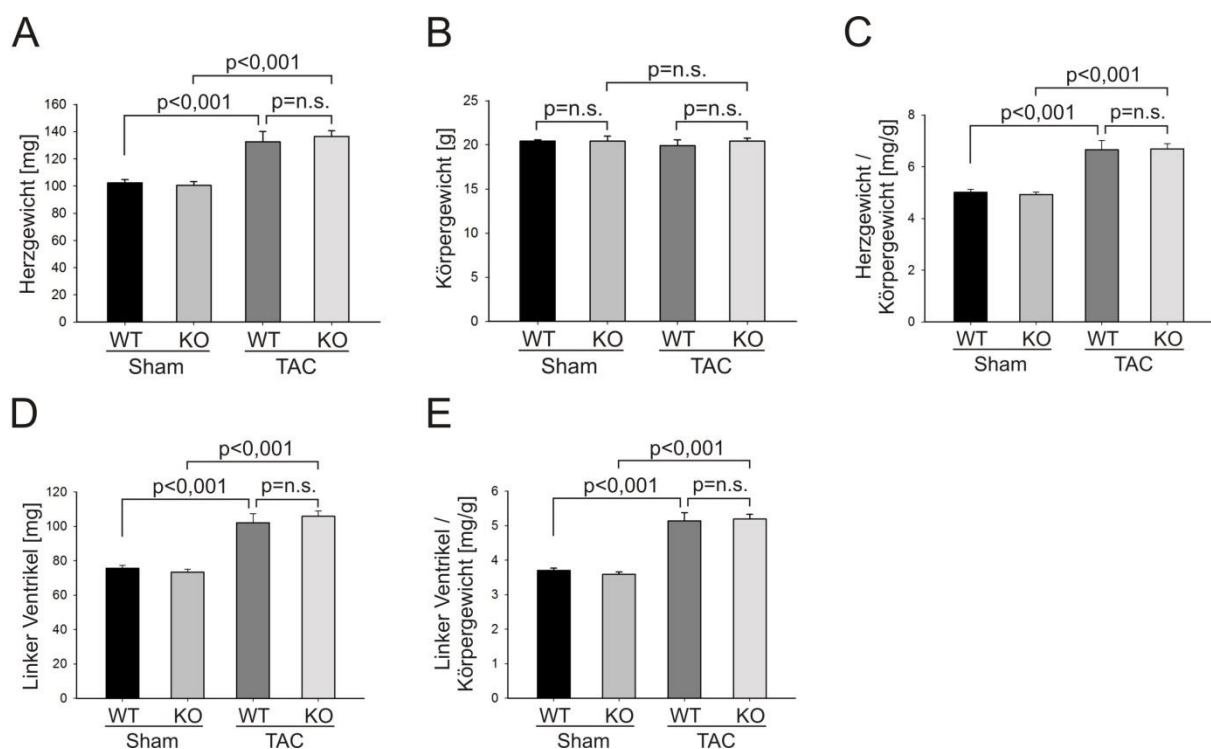


Abbildung 30: Morphometrie der FYCO1-KO-Mäuse, die einer TAC-Operation unterzogen wurden. Die Messwerte wurden nach einer 7-tägigen Konstriktion erhoben. Verglichen wurden A) Herzgewicht B) Körpergewicht C) Verhältnis Herz- zu Körpergewicht D) Linksventrikuläres Gewicht E) Verhältnis Linksventrikuläres Gewicht zu Körpergewicht

#### Echokardiographische Untersuchung bei TAC-behandelten Mäusen

Die echokardiographische Untersuchung wurde 7 Tage nach der TAC-Operation durch einen bezüglich des Genotyps geblindeten Untersucher durchgeführt. Die Tiere wurden inhalativ mit 1,5% Isofluran sediert. Gemessen wurde das Fractional Shortening, was der Auswurfleistung des linken Ventrikels entspricht, der LVIDd, die IVSd und die LVPWd.

Das Fractional Shortening beträgt in der WT/Sham-Gruppe im Mittel 46,1 %, in der WT/TAC-Gruppe 34,19 %. In der KO/Sham-Gruppe wurde im Mittel ein Fractional Shortening von 50,19 % gemessen, in der KO/TAC-Gruppe eines von 23,87 %. In der statistischen Untersuchung fand sich ein signifikanter Unterschied von  $p < 0,05$  beim Vergleich beider WT-Gruppen. Ein hoher signifikanter Unterschied von  $p < 0,001$  fand sich im Vergleich beider KO-Gruppen.

Bei der WT/Sham-Gruppe wurde im Mittel ein LVIDd von 2,9 mm, bei der WT/TAC-Gruppe ein LVIDd von 3,49 mm ermittelt. In der KO/Sham-Gruppe betrug das LVIDd im Mittel 2,95 mm, bei der KO/TAC-Gruppe betrug es 3,51 mm. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied von  $p < 0,05$  im Vergleich beider WT-Gruppen und beider KO-Gruppen.

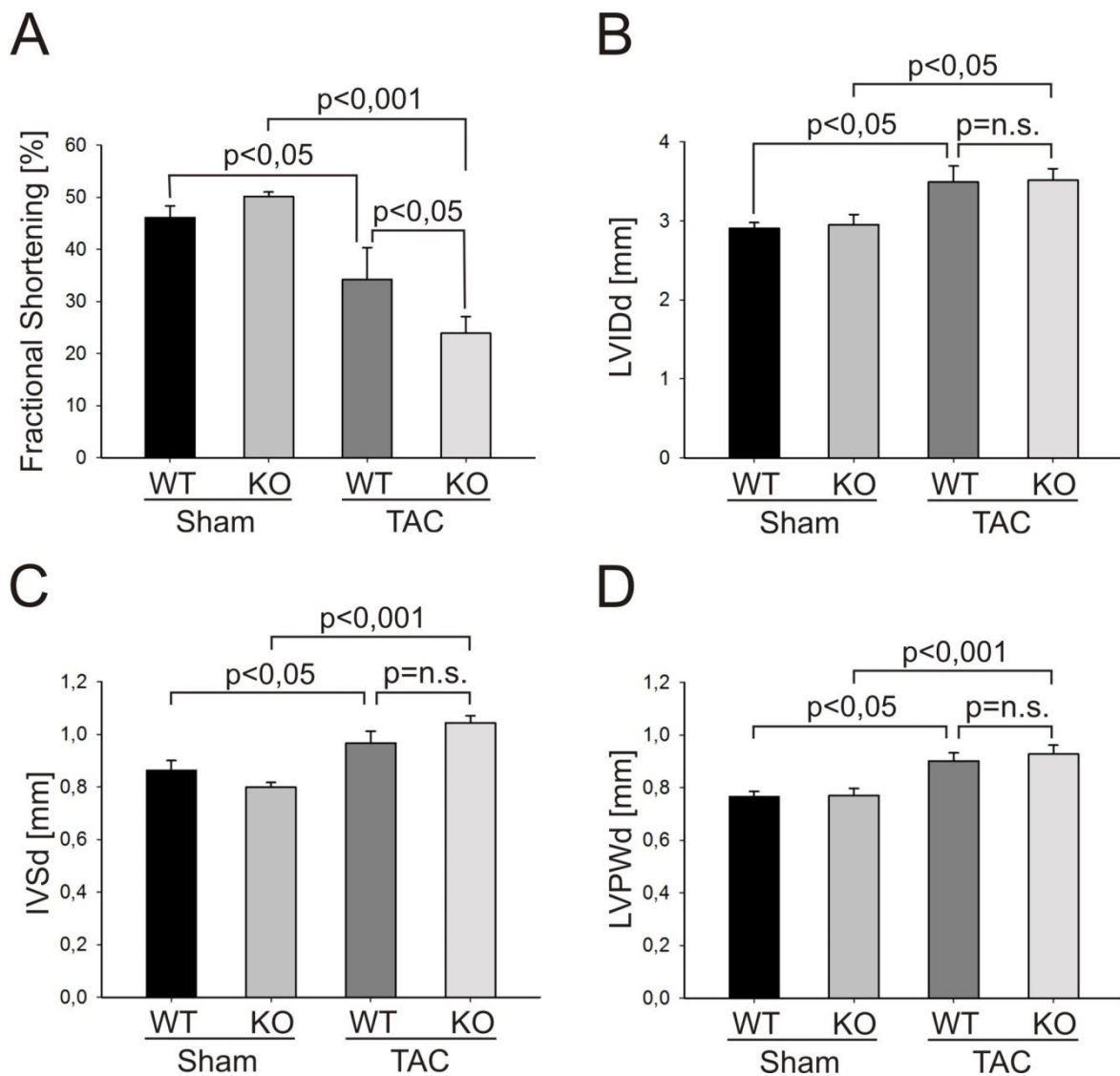
Bei der WT/Sham-Gruppe wurde im Mittel ein ISVd von 0,9 mm gemessen, bei der WT/TAC-Gruppe ein ISVd von 0,97 mm. In der KO/Sham-Gruppe wurde ein ISVd von 0,8 mm, bei der KO/TAC-Gruppe ein ISVd von 1,04 mm ermittelt. In der statistischen Untersuchung zeigte sich ein signifikanter Unterschied von  $p < 0,05$  im Vergleich beider WT-Gruppen und ein Unterschied von  $p < 0,001$  im Vergleich beider KO-Gruppen.

In der WT/Sham-Gruppe wurde ein LVPWd von 0,8 mm gemessen, in der WT/TAC-Gruppe ein LVPWd von 0,9 mm im Mittel. In der KO/Sham-Gruppe wurde ein LVPWd von 0,77 mm im Mittel ermittelt, in der KO/TAC-Gruppe ein LVPWd von 0,93 mm. In der statistischen Untersuchung ergab sich ein signifikanter Unterschied von  $p < 0,05$  im Vergleich der beiden WT-Gruppen und ein hoher signifikanter Unterschied von  $p < 0,001$  zwischen den beiden KO-Gruppen.

Nach TAC-Operation zeigte sich in der WT-Gruppe ein signifikanter Abfall des Fractional Shortenings im Vergleich zum Kontrollkollektiv, welches auf eine Dilatation des Ventrikels und damit auf eine eingeschränkte Pumpfunktion/Auswurfleistung hinwies. Dieser Unterschied zeigte sich noch deutlicher bei der FYCO1-KO-Population, in der das Fractional Shortening am geringsten ausgeprägt war. Betrachtete man den linksventrikulären Durchmesser, zeigte sich in der Mäusepopulation nach TAC-Operation eine deutliche Zunahme, jedoch ohne Unterschiede im Vergleich der WT- zur KO-Maus. Dies beschreibt die Dilatation des linken Ventrikels.

**Tabelle 26 Echokardiographische Messergebnisse nach Sham- und TAC-Operation**

gemessener Parameter	Wildtyp-Kollektiv (n=13)		Knockout-Kollektiv (n=17)	
	Sham (n=6)	TAC (n=7)	Sham (n=7)	TAC (n=10)
Fractional Shortening [%]	46,1	34,19	50,19	23,87
LVIDd [mm]	2,9	3,49	2,95	3,51
IVSd [mm]	0,9	0,97	0,8	1,04
LVPWd [mm]	0,8	0,9	0,77	0,93



**Abbildung 31: Statistische Darstellung der echokardiographisch ermittelten Messwerte.** Ermittelt wurden folgende Werte: A) Fractional Shortening B) LVIDd C) IVSd D) LVPWd

#### Genexpression in FYCO1-defizienten Mäusen nach einer TAC-Operation

Zur Verifizierung der Auswirkungen einer TAC-Operation auf die Genexpression in Herzmuskelzellen führten wir eine rt-PCR durch. Zielgene waren dabei bekannte Marker kardialer Hypertrophie wie Nppa, Nppb und MyH7. Zur Normalisierung der Genexpression verwendeten wir das Gen Rpl32, die Expression der Gene Nppa, Nppb und MyH7 verglichen wir mit der Expression in der WT/Sham-Gruppe. Für die rt-PCR wurde die cDNA von jeweils 6 Tieren pro Gruppe verwendet.

In der rt-PCR zeigte sich ein 8,41-facher Anstieg der Nppa-Expression im Vergleich zur WT/TAC-Gruppe. In der KO/TAC-Gruppe stieg Nppa nur um ein 5,51-faches an.

In der MyH7-Genexpressionsanalyse zeigte sich in der WT/TAC-Gruppe eine 11,18-fache Expression und in der KO/TAC-Gruppe eine 7,2-fache Expression. Bei beiden Analysen fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der TAC-Gruppe zwischen WT- und KO-Tieren.

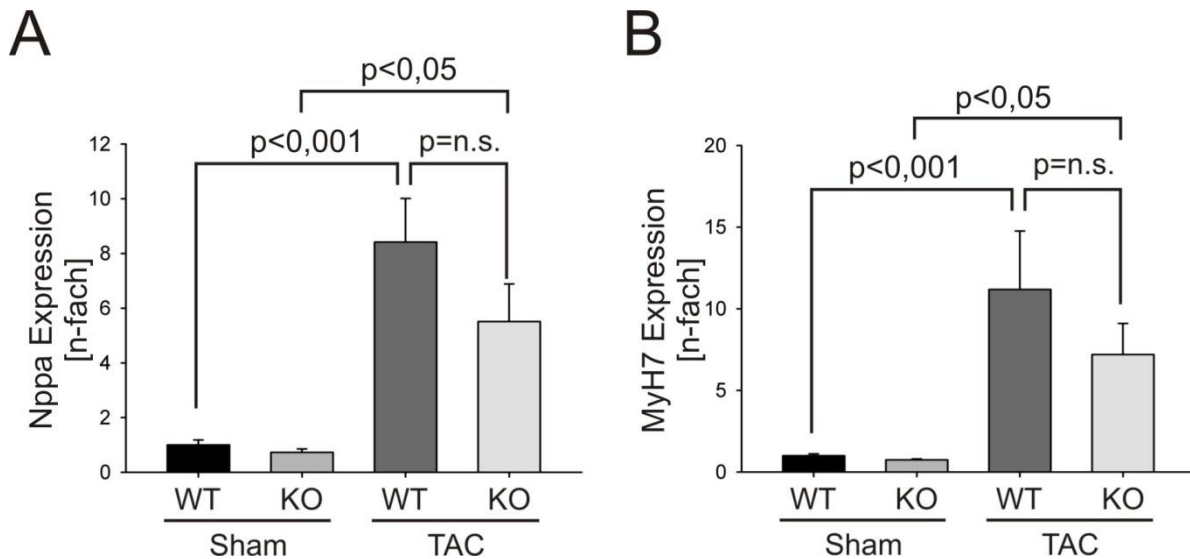


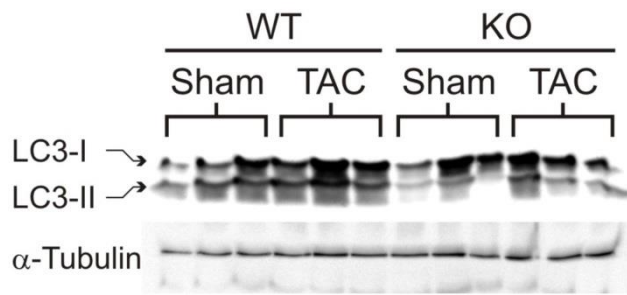
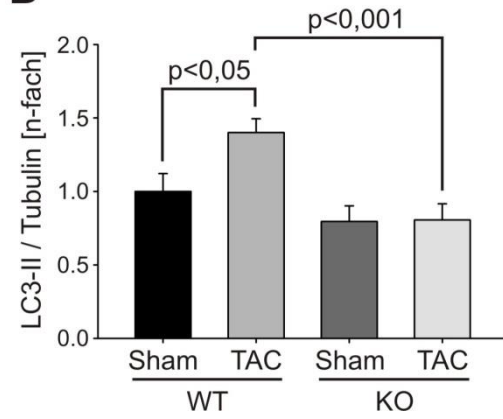
Abbildung 32: Genexpressionsprofil von Nppa und MyH7 in Myokardzellen 7 Tage nach einer TAC-Operation.

#### LC3-Proteinanalyse in Myokardgewebe aus FYCO1-defizienten Mäusen nach einer TAC-Operation

Die Genexpressionsanalyse innerhalb der WT-Gruppe ergab eine 1,4-fache Expression von LC3-II in der TAC-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe. In der KO-Gruppe ergab sich für das Sham-Kollektiv eine 0,8-fache Expression, im TAC-Kollektiv ebenfalls eine 0,8-fache Expression.

In der statistischen Untersuchung ergab sich ein signifikanter Unterschied von  $p < 0,05$  im Vergleich beider WT-Gruppen. Ein hoher signifikanter Unterschied von  $p < 0,001$  ergab sich im Vergleich beider TAC-Gruppen auf LC3-II. Kein statistisch signifikanter Unterschied zeigt sich beim Vergleich der LC3-II Konzentration in der KO-Gruppe.

Diese Ergebnisse zeigten, dass zellulärer Stress, induziert durch eine Druckbelastung des Herzens, zur Induktion der Autophagie in WT-Mäusen führt. Bei FYCO1-KO-Tieren ist die Autophagieaktivität unter physiologischen Bedingungen bereits geringer als im Kontrollkollektiv. Durch zellulären Stress erfolgt in FYCO1-KO-Mäusen somit keine Induktion der Autophagie.

**A****B**

**Abbildung 33:** A) Im Western Blot wurde Protein aus Myokardgewebe von Sham- oder TAC-operierten WT- oder KO-Mäusen aufgetragen. Detektiert wurde LC3, Tubulin diente als Ladekontrolle B) Statistische Auswertung der LC3-II Konzentration; auffällig war ein signifikanter Unterschied von  $p < 0,05$  innerhalb der WT-Gruppe und ein Unterschied von  $p < 0,001$  innerhalb der KO-Gruppe.

## IV. Diskussion

### 4.1 Ein FYCO1-abhängiger Stoffwechselweg kontrolliert Autophagie im Herzen

Autophagie ist ein Degradationsmechanismus in allen eukaryotischen Zellen und stellt einen essentiellen Regulationsmechanismus zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase dar [1]. Unter physiologischen Bedingungen lässt sich Autophagie auf niedrigem Niveau in allen Zellen nachweisen [34]. Autophagie ist jedoch auch eine Überlebensstrategie der Zelle und kann durch zellulären Stress, wie Nährstoffmangel, induziert werden [1, 34].

FYCO1 ist ein Gen, welches im Rahmen der Dissertation von Raphael Zeller in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. N. Frey am Universitätsklinikum Heidelberg identifiziert wurde und eine hohe Genexpression in Herz- und Skelettmuskel aufweist (Abb. 4, Abb. 5) [40]. Wir identifizierten LC3 in einem Yeast-two-hybrid Screen als einen potentiellen direkten Interaktionspartner von FYCO1. LC3, das Homolog zu ATG8 in Säugetierzellen, gilt als Aktivitätsmarker der Autophagie [40, 46]. FYCO1 als Interaktionspartner von LC3 nimmt so möglicherweise Einfluss auf den Prozess der Autophagie. Pankiv et. al. konnte kürzlich die Interaktion von FYCO1 mit LC3, Rab7 und PI3P bestätigen und impliziert damit ebenfalls eine Rolle von FYCO1 im Prozess der Autophagie [41]. Weiterhin konnten sie eine Kolokalisation von FYCO1 und LC3 in HeLa-Zellen beschreiben [41]. In Kardiomyozyten konnten wir durch einen adenoviralen Gentransfer die Überexpression von FYCO1 erzielen (Abb. 13) und immunzytochemisch ebenfalls eine Kolokalisation darstellen (Abb. 15).

### 4.2 Die Bedeutung der Autophagie im Herzen

Selbst unter basalen Bedingungen ist Autophagie für die einzelne Herzmuskelzelle essentiell und damit zur Aufrechterhaltung der gesamten Herzfunktion entscheidend. Komatsu et al. konnten zeigen, dass ATG7-defiziente Mäuse innerhalb eines Tages nach der Geburt versterben. In der Histologie der wesentlichen Organe ließen sich keine pathologischen Auffälligkeiten nachweisen, dennoch ist diese Entwicklung möglicherweise auf einen fehlerhaften oder mangelnden Autophagieprozess zurück [32]. Ein homozygoter Knockout von Beclin1, dem Homolog von ATG6 in Säugetierzellen, führt bei Mäusen bereits embryonal zum Tod [20].

Fehlt ATG5 spezifisch im Herzen von adulten Mäusen, zeigt sich histologisch eine unorganisierte Sarkomerstruktur und eine Aggregation von Mitochondrien, erniedrigte LC3-II-Level sind messbar [49]. Die Tiere weisen eine altersbezogene Kardiomyopathie mit kardialer Hypertrophie, linksventrikulärer Dilatation und kontraktile Dysfunktion auf [34, 49].

Auch in adulten Mäusen, die durch genetische Rekombination eine Tamoxifen-induzierte spezifische kardiale ATG5-Defizienz aufweisen, zeigt sich 7 Tage nach Tamoxifengabe echokardiographisch eine linksventrikuläre Dilatation und eine schwere kontraktile Dysfunktion. Histologisch lassen sich keine Auffälligkeiten finden [34]. Autophagie scheint daher selbst unter physiologischen Bedingungen ein unverzichtbarer Mechanismus in der Homöostase in Kardiomyozyten zu sein und damit zur Aufrechterhaltung der kardialen Funktion beizutragen.

Nahrungsentzug ist ein Stressfaktor, der unspezifisch auf viele Organe des Körpers wirkt und zur Aktivierung der Autophagie führt [1]. Verursacht man eine pharmakologische Hemmung der Autophagie mit Bafilomycin 1A, kommt es bei hungrigen Mäusen zur kardialen Dysfunktion [39].

Während der Embryogenese sind nur niedrige Level an Autophagie nachweisbar. Unmittelbar nach der Geburt wird die Autophagieaktivität in vielen Geweben jedoch für 3-12 h stark hochreguliert und kehrt erst nach ein bis zwei Tagen auf ein basales Niveau zurück [31].

Komatsu et al. konnten zeigen, dass ATG7-defiziente Mäuse durch Nahrungsentzug unmittelbar nach der Geburt früher starben als die Kontrollgruppe ohne Nahrungsentzug. In ATG7-defizienten Mäusen konnten niedrigere Konzentrationen an Aminosäuren gemessen werden. Möglicherweise ist das Versterben der Tiere auf eine Hemmung der Autophagie und somit das Recycling von Aminosäuren durch das Fehlen von ATG7 zurückzuführen [32].

ATG5-defiziente Tiere scheinen bei Geburt normal zu sein, sterben aber innerhalb eines Tages nach der Geburt. Erfolgt ein Nahrungsentzug nach der Geburt, sterben auch diese Tiere früher als in der Kontrollgruppe. Erfolgt jedoch eine forcierte Fütterung, überleben diese Tiere einen längeren Zeitraum. ATG5-defiziente Tiere weisen geringere Konzentrationen an Aminosäuren im Blut und Gewebe und Zeichen des Energiemangels auf, was darauf hinweist, dass die Produktion von Aminosäuren durch die Degradation von Proteinen im Autophagieprozess essentiell für das Überleben während der Hungerperiode ist [31].

Beclin1-haploinsuffiziente Mäuse ( $Beclin1^{+/-}$ ) entwickeln unter Nahrungsentzug eine kontraktile Dysfunktion, auch bei homozygot FoxO1-defizienten Tieren lässt sich dieser Phänotyp nachweisen [50]. FoxO sind Transkriptionsfaktoren, die die Autophagie im Skelettmuskel unterstützen, und zusätzlich die Regulation der Zellgröße, Proliferation und den Metabolismus beeinflussen. Ihre Regulation erfolgt über eine Phosphorylierung [47]. Einen vergleichbaren Phänotyp weisen Mäuse nach einer Hungerperiode auf, die eine mutierte Form von FoxO1 herzspezifisch überexprimieren, die nicht phosphoryliert werden kann [50].

Nahrungsentzug ist ein Stressfaktor, der unspezifisch auf viele Organe des Körpers wirkt und zur Aktivierung der Autophagie führt [1]. Auch herzspezifische Stimuli, wie z. B. eine Erhöhung der Nachlast, greifen in den Regulationsmechanismus der Autophagieaktivität ein. So induziert die



experimentelle Erhöhung der Nachlast durch eine aortale Konstriktion im Mausmodell die Autophagie [4].

Während eine herzwegewebspezifische Defizienz von ATG5 in der frühen Kardiogenese unter physiologischen Bedingungen zu keinem kardialen Phänotyp führt, kommt es eine Woche nach TAC-Operation zur ventrikulären Dilatation und die Tiere versterben an einer kardialen Dysfunktion und Herzversagen [34].

Konträr zu den bisher diskutierten Ergebnissen stehen die Untersuchungen von Zhu et al.. Auch in Beclin1-haploinsuffizienten Tieren kommt es nach aortaler Konstriktion zu einer Abnahme des Fractional Shortenings, diese ist jedoch nicht so stark ausgeprägt wie in der Kontrollgruppe. Interessanterweise unterschied sich jedoch das Ausmaß der kardialen Hypertrophie zwischen Wildtyp- und Beclin1<sup>+/-</sup>-Mäusen nach TAC-Operation gemessen an einer ähnlichen Herzgewicht- zu Körpergewicht- Ratio nicht. Auch eine herzspezifische Überexpression von Beclin1 führte nach einer TAC-Operation zu einem reduzierten Fractional Shortening und somit zu einer schlechteren kardialen Funktion [4]. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass die Aktivierung der Autophagie auch ein maladaptiver Prozess sein kann.

Insgesamt bleibt es unklar, ob die Hemmung der Autophagie bei kardialen Erkrankungen einen positiven oder einen negativen Einfluss hat. Wahrscheinlich ist das Aktivitätslevel der Autophagie entscheidend. Ein komplettes Ausschalten des Degradationsprozesses scheint sich ebenso nachteilig auszuwirken wie eine überschießende Aktivierung.

### 4.3 Die Bedeutung von FYCO1 in der Autophagie des Herzens

Der Knockout von FYCO1 im Mausmodell führt unter physiologischen Bedingungen selbst nach einem Lebensjahr nicht zu morphologischen Auffälligkeiten oder zur kardialen Dysfunktion (Abb. 23). Auch unter Nährstoffentzug zeigt sich keine Veränderung in der Morphometrie bei FYCO1-defizienten Mäusen, die kardiale Funktion ist, gemessen durch das Fractional Shortening, eingeschränkt (Abb. 26, Abb. 27). Unter Nährstoffentzug ist eine verminderte LC3-Protein-Konzentration bei gleicher LC3-Gen-Expression in FYCO1-defizienten Tieren zu detektieren, was auf einen erhöhten Umsatz und somit auf eine erhöhte Autophagieaktivität schließen lässt (Abb. 28). FYCO1 ist daher möglicherweise für einen späteren Reaktionsschritt im Prozess der Autophagie verantwortlich. Pankiv et. al. beschrieb die Rolle von FYCO1 in der Autophagie als Rab7-Effektor, der an LC3 und PI3P bindet, um den Mikrotubulus vermittelten Transport von Vesikeln zu ermöglichen [41, 45].

Nach 7-tägiger Nachlasterhöhung durch eine TAC-Operation weisen die FYCO1-defizienten Tiere zur Vergleichspopulation eine kardiale Hypertrophie auf (Abb. 30). Die Herzfunktion ist bei FYCO1-defizienten Tieren nach TAC-Operation deutlich eingeschränkt (Abb. 31). Durch die TAC-Operation

kam es zu einer Zunahme der LC3-Expression, die jedoch deutlich geringer ausfiel als bei WT-Tieren (Abb. 33). Gleiche LC3-Level bei den FYCO1-defizienten Mäusen lassen daher entweder auf eine fehlende Induktion der Autophagie oder auf einen erhöhten Umsatz von LC3 in operierten Tieren schließen. Dies würde bedeuten, dass FYCO1 zu einem späteren Zeitpunkt in den Autophagieprozess eingreift.

Wir sehen Autophagie eher als eine mögliche Adaptation des Kardiomyozyten und des Herzens auf zellulären Stress, da die Störung des Autophagieprozesses zur zunehmenden kardialen Dysfunktion führt.

#### 4.4 Fehlerhafte Autophagieprozesse als Ursache von Erkrankungen

Im Pathomechanismus der Herzinsuffizienz wurde der Autophagieprozess mehrfach als verursachend beschrieben [51, 52]. In Herzgewebe von 27 Patienten mit idiopatischer dilatativer Kardiomyopathie konnten elektronenmikroskopisch große Vakuolen mit intrazytoplasmatischen Organellen nachgewiesen werden, woraufhin vermutet wurde, dass Autophagie ein wesentlicher Mechanismus im Rahmen der Herzinsuffizienzentwicklung sein könnte [53].

Im Hamstermodell für humane dilatative Kardiomyopathien entwickeln die Tiere ein schnelles Herzversagen und weisen eine Mortalitätsrate von 50 % im Alter von 30 Wochen auf. Untersuchungen zeigten, dass viele der Herzmuskelzellen Vakuolen im Autophagieprozess enthielten. Eine Behandlung der Hamster mit G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor), einem Zytokin das der Regeneration oder Reparatur von Zellen dient, führte zu einer verbesserten ventrikulären Pumpfunktion, optimiertem Remodelling und verlängertem Überleben. Daneben wurde eine Reduktion der Fibrose und des Autophagieprozesses beschrieben, sodass der nützliche Effekt von G-CSF auf eine Reduktion des Autophagieprozesses zurückgeführt wurde [54].

In der Herzinsuffizienz scheint Autophagie ein anpassender Prozess zu sein. 9 Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie im Endstadium wurde zum Zeitpunkt einer LVAD-Implantation und zum Zeitpunkt der Transplantation Gewebeproben entnommen. Um die Aktivitätslevel der Autophagie unter mechanischer Entlastung zu bestimmen, wurden Autophagiemarker vor und nach Implantation in den Gewebeproben bestimmt. Nach der Implantation waren die Autophagiemarker Atg5-Atg12-Komplex, Beclin1 und LC3-II deutlich verringert [55].

Das Vivi-Syndrom, erstmalig 1988 beschrieben, ist eine seltene, autosomal rezessive Erkrankung [56]. Die Patienten sind durch Albinismus und einen Katarakt gekennzeichnet, außerdem bestehen eine Kardiomyopathie, Agenesie des Corpus callosum, psychomotorische Retardierung, epileptische Krämpfe und Immundefizite mit schweren Infektionen [57]. 2013 konnte bei diesen Patienten eine

Mutation im EPG5-Gen (ectopic P-granules autophagy protein 5) nachgewiesen werden. EPG5 kodiert für einen wichtigen Regulator des Autophagie-Signalwegs, das Autophagie-Protein-5, welches die Formation der Lysosomen beeinflusst [58].

Neben einer mentalen Retardierung und einer Skelettmuskulomyopathie weisen Patienten mit M. Danon eine Kardiomyopathie auf [26]. Durch eine Mutation im lysosomalen Protein LAMP-2 kommt es zu einer starken Akkumulation von Autophagosomen, da eine Fusion von Autophagosom und Lysosom nicht erfolgen kann [59]. Auf Grund der schnellen Ausprägung der Kardiomyopathie ist eine Herztransplantation derzeit die Therapie der Wahl [27].

Autosomal-rezessiv vererbte kongenitale Katarakt ist eine Erkrankung der kristallinen Linse, die klinisch unterschiedlich ausgeprägt ist und der eine genetisch heterogene Ursache zu Grunde liegt [60]. Mutationen in 30 verschiedenen Loci werden mit der Katarakterkrankung in Verbindung gebracht, Gene aus mehr als 20 verschiedenen Loci konnten bereits identifiziert werden, was eine große Spannbreite an zellulären Prozessen betrifft [61]. In 12 pakistanischen und einer arabischen Familie konnten Mutationen im Gen, welches für FYCO1 kodiert, ermittelt werden. FYCO1 wird in Epithelzellen menschlicher Linsen exprimiert und ist mit Autophagosomen und Mikrotubuli kolokalisiert. FYCO1 ist an der Entwicklung der Linse und deren Transparenz beteiligt. Mutationen des für FYCO1 kodierenden Gens sind die häufigste Ursache für kongenitalen Katarakt in der pakistanischen Bevölkerung. Bei 44 Betroffenen aus 13 Familien konnten 9 verschiedene Mutationen im FYCO1 kodierenden Gen ermittelt werden [42].

#### 4.5 Therapieoptionen durch die Modulation der Autophagie

Autophagie kommt in Herzmuskelzellen auf einem niedrigen Level zur Aufrechterhaltung der essentiellen Lebensmechanismen vor, um die kardiale Funktion und Morphologie zu gewährleisten [62]. Verändern sich die physiologischen Umstände, ändert sich auch die Autophagieaktivität [63, 64]. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass Autophagie ein Überlebensmechanismus darstellt [39]. Auch wenn noch kein eindeutiger Signalweg für Autophagie-vermittelten Zelltod identifiziert werden konnte, konnte dennoch gezeigt werden, dass eine zu geringe oder zu hohe Autophagierate zu kardialer Dysfunktion und Herzversagen führt [63, 65].

Auch wenn die genaue Rolle von Autophagie in den unterschiedlichen kardialen Erkrankungen nicht geklärt ist, beinhaltet die Möglichkeit Autophagieaktivität zu beeinflussen neue Therapieansätze, kardialen Erkrankungen vorzubeugen oder diese zu behandeln [66]. Autophagie ist in vielen kardialen Erkrankungen hochreguliert, abhängig von der Erkrankung und vom Zeitpunkt mit möglicherweise

protektivem, unter Umständen aber auch schädlichem Effekt. Eine mögliche pharmakologische Modulation des Autophagieprozesses stellt einen neuen therapeutischen Zugang dar.

Rapamycin, ein mTOR-Inhibitor, ist ein starker Aktivator der Autophagie und wurde im Mausmodell sowohl als Schutz vor Druck-induzierter Hypertrophie und Schäden durch Ischämie und Reperfusion beschrieben [67, 68], als auch zur Verbesserung der Herzfunktion in diabetischen Mäusen [69].

Auch an anderen, bereits bekannten Medikamenten, konnte die Aktivierung der Autophagie als ein Nebeneffekt entdeckt werden [66]. Die antimikrobiellen Präparate Chloramphenicol und Sulfaphenazole aktivieren Autophagie, was mit einem Schutz bei Ischämie- und Reperfusionsschäden korreliert [70, 71]. Kürzlich konnten Studien zeigen dass Statine, welche als HMG-Co-A-Reduktase-Inhibitoren zur Cholesterinsenkung beitragen, ebenfalls die Autophagie in Makrophagen und Krebszellen der Prostata aktivieren [72, 73]. Resveratrol, ein Antioxidans welches die Autophagie über die Aktivierung von Sirtuin [74] und AMPK (AMP-aktivierte Proteinkinase) [75] steigert, reduziert Apoptose und verbessert die kardiale Funktion in Mäusen mit diabetischer Kardiomyopathie [76]. Eine Kombination aus Nahrungsrestriktion und Resveratrolbehandlung in alternden Ratten verbessert die Autophagie und schützt vor Doxorubicin-induzierter Kardiomyopathie [77].

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung der Autophagie zu vorteilhaften Effekten in der Herzmuskelzelle führt. Gegensätzliche Studien zeigen, dass eine unangepasste Aktivierung der Autophagie zu nachteilhaften Effekten führt und somit eine Hemmung der Autophagie kardioprotektiv sein kann [4, 48]. An bei Ratten induziertem Herzversagen durch Doxorubicin konnte gezeigt werden, dass durch den Autophagieinhibitor 3-Methyladenin der Zelluntergang von Herzmuskelgewebe reduziert und so die kardiale Funktion verbessert werden kann [78]. Dies widerspricht jedoch den Ergebnissen von Dutta et al, welcher zeigen konnte, dass die Aktivierung der Autophagie vor Doxorubicin-induzierter Kardiotoxizität schützt [77].

All die bisherig diskutierten Medikamente beeinflussen Autophagie nicht an einem spezifischen Abschnitt der Signalkaskade sondern wirken sich auf viele zelluläre Prozesse aus, sodass es schwierig ist zu unterscheiden, welcher der Signalwege genau zu dem gewünschten protektiven Effekt führt. Daher ist es erstrebenswert Pharmaka zu entwickeln, die auf spezifische Proteine der Autophagiesignalkaskade abzielen [66].

Erhöhte Expression einzelner Autophagieproteine führt zwar zur Zunahme der Autophagieaktivität in Herzmuskelzellen, jedoch nicht zu Pathologien oder gar der Einschränkung der Herzfunktion [66]. Transgene Mäuse mit einer moderaten Überexpression von ATG5 weisen in den meisten Geweben, auch im Herz, eine erhöhte Autophagieaktivität auf. Diese Mäuse leben im Vergleich zum Wildtyp

länger und deren Herzen weisen eine geringere Fibroserate auf [79]. Herzspezifisch transgene ATG7-Mäuse weisen eine mildere durch Desmin verursachte Kardiomyopathie und damit ein verlängertes Überleben auf, da die Beseitigung von Proteinaggregaten verstärkt erfolgt [80].

FYCO1 bindet an LC3 und PI3P, um so den Mikrotubulus-vermittelten Transport von Autophagosomen zu gewährleisten [41]. Wir konnten eine Kolo-kalisation von FYCO1 und LC3 in Kardiomyozyten nachweisen, bei Knockdown von FYCO1 jedoch kaum noch LC3 nachweisen, was darauf hindeutet, dass FYCO1 bei der Bildung von Autophagosomen und somit im Autophagieprozess eine wesentlich Rolle spielt.

Im FYCO1-KO-Mausmodell konnte nach Nahrungsentzug oder TAC-Operation eine deutlich eingeschränkte Herzfunktion ermittelt werden. Es ergaben sich ebenfalls deutlich verminderte LC3-Konzentrationen in den Kardiomyozyten, was zunächst auf einen eingeschränkten Autophagieprozess schließen lässt. Ein erhöhtes Genexpressionsprofil von LC3 in der Population unter Nahrungsentzug lässt jedoch auf einen vermehrten Umsatz schließen.

Es bleibt weiterhin offen, unter welchen Umständen FYCO1 auf welche Art die Autophagie beeinflusst. Weitere Untersuchungen müssen die Frage klären, unter welchen Umständen eine FYCO1-Überexpression oder ein Knockdown von FYCO1 sich protektiv auf die Physiologie eines Kardiomyozyten auswirkt. Dann kann FYCO1 möglicherweise als Modulator der Autophagie Einfluss auf den Progress nicht nur kardialer Erkrankungen nehmen.

## V. Zusammenfassung

Autophagie ist ein wesentlicher Abbauprozess von Zellbestandteilen zur Aufrechterhaltung der Homöostase. Zusammenhänge zwischen Fehlregulationen der Autophagie und einzelnen Krankheitsbildern wurden beschrieben. Auch bei kardialen Erkrankungen wie Kardiomyopathien, kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz wurden bereits Veränderungen im Aktivitätsgrad der Autophagie beschrieben. Wir konnten zeigen, dass FYCO1 eine essentielle Rolle in der Autophagie des Herzens besonders unter Stimulationsbedingungen spielt und somit Einfluss auf die Pathogenese verschiedener Herzerkrankungen nimmt.

In Kardiomyozyten konnten wir durch eine Überexpression von FYCO1 erhöhte LC3-II-Konzentrationen als Hinweis auf eine vermehrte Autophagieaktivität nachweisen. Unter Stimulationsbedingungen, nämlich Nahrungsentzug als zellulärer Stressfaktor, konnte dieser Effekt verstärkt werden. Zusätzlich konnten wir in der Immunzytologie eine Kolo-kalisation von FYCO1 und LC3 nachweisen, welche eine Interaktion der Proteine vermuten lässt. FYCO1 nimmt somit direkt Einfluss auf die Aktivität des Autophagieprozess in der Herzmuskelzelle.

In *in vitro* Kardiomyozyten konnten wir ferner durch einen Knockdown des physiologisch exprimiertem FYCO1 stark erniedrige LC3-Konzentrationen nachweisen. Auch unter Stimulationsbedingungen wurde die Autophagie nicht induziert. Während es unter physiologischen FYCO1-Konzentrationen und Nährstoffentzug der Zelle zu einer Anreicherung von LC3-markierten Vesikeln um den Zellkern kommt, können diese Vesikel unter einem Knockdown von FYCO1 nicht nachgewiesen werden. Dies legt nahe, dass FYCO1 für die Bildung oder Formation der Autophagosomen essentiell ist.

Im *in vivo* KO-Mausmodell warfen die Ergebnisse neue Fragestellungen auf. Unter physiologischen Bedingungen wiesen die FYCO1-defizienten Tiere auch im höheren Alter keine veränderte Herzmorphologie oder Beeinträchtigung der Herzfunktion auf. Unter Nahrungsentzug konnte jedoch eine signifikant eingeschränkte Pumpfunktion bei vergleichbarer Ventrikelgröße ermittelt werden.

Um die eingeschränkte Pumpfunktion in Zusammenhang mit der Autophagie zu stellen wurde neben der Proteinkonzentration auch das Genexpressionsprofil von LC3 in den Kardiomyozyten ermittelt. Bei unveränderter LC3-Proteinkonzentration in der Gruppe der FYCO1-defizienten Tiere konnte unerwarteterweise eine vermehrte Genexpression dargestellt werden, was auf einen deutlich erhöhten Umsatz von LC3 deutet und nicht die bisher unterstellte fehlende Expression bestätigt.

Bei Mäusen mit durch eine TAC-Operation induzierter kardialer Hypertrophie konnte ebenfalls eine eingeschränkte Pumpfunktion nachgewiesen werden, wobei diese bei KO-Mäusen deutlich stärker ausgeprägt war. Das Genexpressionsprofil bekannter kardialer Hypertrophiemarker zeigte jedoch

keine Unterschiede in der TAC-Gruppe, was zunächst auf einen fehlenden Einfluss von FYCO1 auf die Ausprägung der kardialen Hypertrophie hinweist. Dennoch lässt sich auch in der operierten KO-Population eine verminderte LC3-Konzentration ermitteln. Offen bleibt hier, ob ein vermehrter Abbau oder eine verminderte Expression zu Grunde liegt.

Das Fehlen von FYCO1 begünstigt besonders unter Stressfaktoren die Einschränkung der Herzfunktion. Eine Kolo-kalisation von FYCO1 und LC3, einem Marker der Autophagie, lässt auf eine Interaktion und somit einen Einfluss von FYCO1 auf die Autophagie schließen. Bei erhöhtem Genexpressionsprofil aber niedrigen Proteinkonzentrationen von LC3 bleibt zunächst unklar, inwiefern FYCO1 auf den Autophagieprozess Einfluss nimmt. Kann ein genauer Signalweg und die Bedeutung von FYCO1 in diesem bestimmt werden, kann FYCO1 als therapeutisches Zielmolekül zur Beeinflussung des Autophagieprozesses verwendet werden. So kann durch FYCO1 Einfluss auf den Autophagieprozess genommen werden und die Ausprägung oder Entstehung von Erkrankungen gemindert oder verhindert werden.

## VI. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Autophagie mit Darstellung des Reifungsvorganges von Phagophoren zu Autolysosomen (aus: [2]) .....	6
Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Autophagosomen. (A) Fusion von Autophagosomen mit Endosomen in einer Rattenleberzelle. (B) Fusion von Autophagosomen mit Hefevakuole (aus: [2]) .....	6
Abbildung 3: Regulationsmechanismen auf zellulärer Ebene bei Autophagie (aus: [7]) .....	7
Abbildung 4: Expressionsprofil von <i>FYCO1</i> A) Durch Datenbankanalysen ermitteltes <i>FYCO1</i> -Expressionsprofil in humanen Geweben (Abb. Modifiziert nach [40]) B) Validierung des Expressionsprofils von <i>FYCO1</i> in humanen Geweben mit Hilfe von quantitativer real-time PCR (Abb. Modifiziert nach [40]) .....	11
Abbildung 5: Untersuchung der <i>FYCO1</i> -Expression mittels Northern-Blot Hybridisierung. Spuren: 1) Gehirn, 2) Herzmuskel, 3) Skelettmuskel, 4) Dickdarm, 5) Thymus, 6) Milz, 7) Niere, 8) Leber, 9) Dünndarm, 10) Plazenta, 11) Lunge, 12) Periphere Blutleukozyten A) Northern-Blot B) Mathematische Auswertung .....	11
Abbildung 6: Darstellung der Gradienten vor und nach der Zentrifugation .....	25
Abbildung 7: A) Darstellung der Neubauer-Zählkammer B) Schema zum Auszählen der Zellen .....	26
Abbildung 8: Beispiel für die Auswertung einer realtime PCR. Gemessen wurde 18S und Nppa. Die blauen Kurven stehen für die Messung in einer Wildtierpopulation, die roten Kurven für Messungen in <i>FYCO1</i> -KO-Mäusen. Die grüne Linie gibt den Threshold Cycle an .....	35
Abbildung 9: Darstellung einer Transferkassette, die beim Western Blot verwendet wurde; zu beachten ist die richtige Reihenfolge beim aufeinander Stapeln der Einzelteile .....	39
Abbildung 10: Darstellung des pcDNA6.2-GW/miR Vektors [aus: User manual BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kits] .....	42
Abbildung 11: Pipettierschema für die Verdünnungsreihen bei der Titerbestimmung von Adenoviren .....	47
Abbildung 12: Tabelle für die Gesichtsfelder/Well-Angabe zur Berechnung der Titer .....	48
Abbildung 13: Adenovirale Überexpression von <i>FYCO1</i> in Kardiomyozyten. Ob eine erfolgreiche Infektion der Zellen durch die Viren erfolgt und damit eine adenovirale Expression von <i>FYCO1</i> gegeben war, wurde durch Infektion zweier Zellpopulationen mit jeweils einem Virus [25 moi] gezeigt. A) Darstellung des V5-Tags mit einem anti-V5-Antikörper im Western Blot zum Beweis einer erfolgreichen Infektion der Zellen mit den Viren B) Darstellung von physiologisch vorhandenem <i>FYCO1</i> in der pAdLacZ-infizierten Zellkontrollpopulation und adenoviral überexprimiertem <i>FYCO1</i> in der pAd <i>FYCO1</i> -infizierten Zellpopulation im Western Blot. ....	53
Abbildung 14: Die Überexpression von <i>FYCO1</i> induziert Autophagie in Kardiomyozyten. Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden mit 25 moi Ad <i>FYCO1</i> oder mit 25 moi AdLacZ infiziert. 48 h nach Infektion wurden der Hälfte der Zellen die Nährstoffe als Stressreiz entzogen. A) Im Western Blot zeigte sich eine Zunahme des LC3-II-Spiegels unter Überexpression von <i>FYCO1</i> . Dieser konnte unter Glucoseentzug deutlich gesteigert werden. B) In der statistischen Auswertung konnte ein signifikanter Unterschied der LC3-II-Konzentration von $p < 0,001$ unter Glucoseentzug in der <i>FYCO1</i> -überexprimierten Zellpopulation ermittelt werden. C) und D) Eine alternative Behandlung mit HBSS, einem aminosäurefreien Kulturmedium, ergab nur geringe Unterschiede .....	55



Abbildung 15: Darstellung von NRVCN-Zellen, die entweder mit AdLacZ oder AdFYCO1 infiziert wurden. Maßstabsbalken 10 µm. Während sich in der Kontrollgruppe endogenes FYCO1 oder LC3 kaum darstellen lässt, markiert FYCO1 in der Überexpression schollenartige Vesikel um den Zellkern. Auch LC3 markiert diese schollenartigen Vesikel, sodass von einer Kollokalisierung der beiden Proteine auszugehen ist..... 56

Abbildung 16: Synthetische microRNAs gegen FYCO1 führen zu einem signifikanten Knockdown. A) Nach Überexpression von AdmiR-FYCO1#1 und AdmiR-FYCO1#2 in Kardiomyozyten war ein Nachweis von FYCO1 im Western Blot nicht mehr möglich. Der Knockdown war effizient. B) Quantifizierung des Knockdowns von FYCO1 mittels Real Time PCR..... 57

Abbildung 17: Knockdown von FYCO1 verhindert die Induktion von Autophagie in NRVCN. A) und B) Darstellung der LC3 Konzentration nach dem Knockdown von FYCO1 und Nahrungsdepletion. Unter Nahrungsdepletion kam es in der Kontrollgruppe zu einem 2,1-fachen Anstieg der LC3-Konzentration. Nach dem Knockdown von FYCO1 kam es unter Nahrungsdepletion nur zu einem 1,3-fachen Anstieg der LC3-Konzentration. Vergleicht man die LC3-Konzentrationen unter Hungerbedingungen, liegt eine 0,6-fache niedrigere Konzentration von LC3 unter dem Knockdown von FYCO1 vor. .... 58

Abbildung 18: Der Knockdown von FYCO1 verhindert die Bildung von Autophagosomen. Immunzytochemie von Autophagosomen. Maßstab 10 µm. Bildspalte 1) Darstellung von endogenem FYCO1 und GFP-getaggttem LC3 unter physiologischen Bedingungen. Bildspalte 2) Erhöhtes Vorkommen von endogenem FYCO1 und GFP-getaggttem LC3 unter Hungerbedingungen, was ein erhöhtes Autophagielevel bedeutet. Bildspalte 3) Nach dem Knockdown von FYCO1 war FYCO1 und LC3 kaum noch nachweisbar. Bildspalte 4) Auch Nahrungsentzug löste nur eine geringe Bildung von LC3 aus, was auf eine kaum vorhandene Autophagieaktivität hinweist..... 59

Abbildung 19: A) Schematische Darstellung des genomischen Lokus, des Zielvektors und des geschnittenen konstitutiven KO-Allels B) Auf DNA-Ebene wurde mittels einer PCR die einfache Expression der Genabschnitte Exon 5 und Exon 6 von FYCO1 in DNA-Proben von WT-Mäusen nachgewiesen. Bei DNA-Proben aus KO-Mäusen wurden beide Exone nicht mehr nachgewiesen, sodass man von einem kompletten Knockout sprechen kann. C) Nachweis von physiologischem FYCO1 in Proteinproben aus WT-Mäusen mittels eines anti-FYCO1-Antikörpers im Western Blot. In den Proteinproben aus den KO-Mäusen lässt sich kein FYCO1 mehr nachweisen, was ein erfolgreiches Einfügen des Zielvektors beweist..... 60

Abbildung 20: Beispielhafte Darstellung einer Genotypisierung anhand der Mäuse #47, #48 und #49. A) Gelbande des konstitutiven Allels bei 370 bp und der Kontrolle bei 585 bp B) Gelbande des WT-Allels bei 333 bp C) Auswertung der Gelbanden und anschließende Bestimmung des Genotyps. .... 61

Abbildung 21: FYCO1-defiziente Mäuse unterscheiden sich nicht von ihren WT-Geschwistertieren. Morphometrie der FYCO1 KO-Maus nach 4 Monaten im Vergleich zu einer gleichaltrigen WT-Maus A) Herzgewicht B) Körpergewicht C) Verhältnis Herz- zu Körpergewicht D) Lebergewicht E) Lungengewicht. Die Gruppen zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede in den morphologisch untersuchten Körperteilen..... 62

Abbildung 22: Echokardiographie A) Echokardiographische Untersuchung und Darstellung der ermittelten Messwerte B) LVIDd [mm] C) Fractional Shortening [%]..... 64

Abbildung 23: Morphometrie der FYCO1-KO-Maus nach einem Jahr im Vergleich zu einer gleichaltrigen WT-Maus. A) Herzgewicht B) Körpergewicht C) Verhältnis Herz- zu Körpergewicht D) Gewicht des linken Ventrikels E) Verhältnis linker Ventrikel zu Körpergewicht F) Fractional

Shortening. Die beiden Mäusepopulationen zeigen auch nach einer Lebensdauer von einem Jahr keine statistisch signifikanten Unterschiede in den morphologisch untersuchten Körperteilen.....	65
Abbildung 24: Histologie des Herzen mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung A) Querschnitt des Herzens einer WT-Maus B) Querschnitt des Herzens einer KO-Maus C) und D) Ausschnittsvergrößerung aus den Übersichtsaufnahmen. ....	66
Abbildung 25: Genexpressionsprofil von Nppa (ANF) und Nppb (BNP) bei FYCO1-KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen.....	67
Abbildung 26: Morphometrie der FYCO1-KO-Maus im Vergleich zur WT-Maus unter Hungerbedingungen A) Herzgewicht B) Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht.....	68
Abbildung 27: Hungerperioden über 48 h führen bei FYCO1-KO-Mäusen zu einer eingeschränkten Herzfunktion. A) In der WT-Maus lässt sich auch unter 48-stündiger Nahrungskarenz keine Einschränkung der Herzfunktion ermitteln. Bei FYCO1-KO-Mäusen dagegen ist eine Abnahme des Fractional Shortenings um 14,4% auf 37,9% messbar. Dies stellt einen statistisch signifikanten Unterschied von $p < 0,05$ dar. B), C) und D) Keine statistisch signifikanten Unterschiede zeigen sich dagegen in LVIDd, IVSd und LVPWd.....	69
Abbildung 28: A) Darstellung von LC3 bei WT-Mäusen und KO-Mäusen nach einer Hungerperiode von 48 h im Western Blot; die Tubulinkontrolle zeigt eine gleichmäßige Beladung an. B) Statistische Auswertung der LC3-II-Konzentration gemessen im Western Blot mit hohen signifikanten Unterschieden innerhalb der WT-Population und im Vergleich beider hungernder Gruppen. ....	70
Abbildung 29: Quantitatives Expressionsprofil von LC3 in Myokardzellen gemessen mit der rt-PCR A) LC3a-Genexpression B) LC3b-Genexpression.....	71
Abbildung 30: Morphometrie der FYCO1-KO-Mäuse, die einer TAC-Operation unterzogen wurden. Die Messwerte wurden nach einer 7-tägigen Konstriktion erhoben. Verglichen wurden A) Herzgewicht B) Körpergewicht C) Verhältnis Herz- zu Körpergewicht D) Linksventrikuläres Gewicht E) Verhältnis Linksventrikuläres Gewicht zu Körpergewicht.....	73
Abbildung 31: Statistische Darstellung der echokardiographisch ermittelten Messwerte. Ermittelt wurden folgende Werte: A) Fractional Shortening B) LVIDd C) IVSd D) LVPWd.....	75
Abbildung 32: Genexpressionsprofil von Nppa und MyH7 in Myokardzellen 7 Tage nach einer TAC-Operation. ....	76
Abbildung 33: A) Im Western Blot wurde Protein aus Myokardgewebe von Sham- oder TAC-operierten WT- oder KO-Mäusen aufgetragen. Detektiert wurde LC3, Tubulin diente als Ladekontrolle B) Statistische Auswertung der LC3-II Konzentration; auffällig war ein signifikanter Unterschied von $p < 0,05$ innerhalb der WT-Gruppe und ein Unterschied von $p < 0,001$ innerhalb der KO-Gruppe.....	77

## VII. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Reaktionsansatz der PCR .....	29
Tabelle 2 Temperaturprofil der PCR.....	29
Tabelle 3 Reaktionsansatz für Schritt 1 der reversen Transkription .....	32
Tabelle 4 Reaktionsansatz für Schritt 2 der reversen Transkription .....	33
Tabelle 5 Temperaturprofil für die reverse Transkription .....	33
Tabelle 6 Reaktionsansatz für die Real Time PCR .....	34
Tabelle 7 Temperaturprofil für die Real Time PCR.....	34
Tabelle 8 Pipettierschema für die Proteinmessung nach Bradford. Dabei werden der Standard STD1-STD4 und alle Proben P1-P27 im Triplet gemessen. Die drei Messwerte der Proteinkonzentration werden gemittelt.....	36
Tabelle 9 Zusammensetzung von 10 ml Separating-Gels abhängig von der Prozentzahl des Gels .....	37
Tabelle 10 Zusammensetzung von 2,5 ml und 5 ml Sammelgel .....	38
Tabelle 11 Das Probenvolumen, das in die Taschen pipetiert wurde, ist abhängig von der Anzahl der Taschen und vom Abstand der beiden Glasplatten, zwischen die das Gel eingefüllt wurde. ....	38
Tabelle 12 Reaktionsansatz für die Annealing-Reaktion.....	41
Tabelle 13 Reaktionsansatz der LR-Reaktion .....	42
Tabelle 14 Reaktionsansatz für die BP-Reaktion.....	43
Tabelle 15 Reaktionsansatz für die Kolonie-PCR, deren PCR-Ergebnis in einem Agarose-Gel eine erfolgreiche Transformation des Vektors in das Bakterium darstellen soll.....	44
Tabelle 16 Temperaturprofil der PCR.....	44
Tabelle 17 Reaktionsansatz für die LR-Reaktion; dabei wird das Plasmid in den pAd-Vektor eingebracht.....	45
Tabelle 18 Reaktionsansatz für den PAC-I-Verdau zur Linearisierung der adenoviralen Plasmid-DNA	46
Tabelle 19 Titerbestimmung der Viren .....	47
Tabelle 20 Morphometrie der FYCO1-KO-Maus im Alter von 4 Monaten.....	62
Tabelle 21 Echokardiographisch ermittelte Herzfunktion im Alter von 4 Monaten.....	63
Tabelle 22 Morphometrie und Fractional Shortening der FYCO1-KO-Maus im Alter von einem Jahr .	65
Tabelle 23 Morphometrie der FYCO1-KO-Maus im Vergleich zur WT-Maus unter Hungerbedingungen .....	68
Tabelle 24 Echokardiographische Daten der FYCO1-KO-Maus im Vergleich zur WT-Maus unter Hungerbedingungen.....	69
Tabelle 25 Morphometrie der FYCO1-KO-Maus, die einer TAC-Operation unterzogen wurde .....	73
Tabelle 26 Echokardiographische Messergebnisse nach Sham- und TAC-Operation .....	74

## VIII. Abkürzungsverzeichnis

AdFYCO1	Adenovirus, das für humanes <i>FYCO1</i> kodiert
AKT	Gen für das Enzym Proteinkinase B
AMPK	AMP-activated protein kinase, AMP-aktivierte Proteinkinase
AMPS	2-Acrylamido-2-methylpropansulfonsäure, Acrylmonomer
ANOVA	analysis of variance, Varianzanalyse
ATG	autophagy related genes, der Autophagie zugehörige Gene
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
Bpm	beats per minute, Herzfrequenz
BP-Reaktion	Erzeugung eines Entryklons, Austausch des im Donor-Vektor enthaltenen <i>ccdB</i> -Gens gegen das PCR-Produkt
BSA	Bovines Serumalbumin
B-Mode	brightness modulation, andere Darstellung der Amplitude, bei der die Echointensität in eine Helligkeit umgesetzt wird
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid oder Kohlendioxid
Cre	cyclisation recombination
CT	Threshold Cycle, Schwellenzyklus
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol, Fluoreszenzfarbstoff
DEPC	Diethylcarbonat, Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium, standardisiertes Nährmedium für die Zellkultur, benannt nach Renato Dulbecco und Harry Eagle
DMSO	Dimethylsulfoxid, Sulfoxid, organisches Lösungsmittel
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
ECL	Enhanced-Chemiluminescence, Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure bzw. Ethylendiamintetraacetat, Komplexbildner
EPG5	ectopic P-granules autophagy protein 5, kodiert für einen Schlüssel-Regulator in der Autophagy, humanes Homolog eines metazoan-spezifischen Autophagiegens
EST	Expressed Sequence Tags, kurze DNA-Sequenzen von meist 100–800 Basenpaaren Länge
FCS	Fetal Calf Serum, fetales Kälberserum
Fc-Fragment	crystallisable fragment, Teil eines Antikörpers
FIP200	Fusion Inhibiting Peptide 200
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FYCO1	FYVE and coiled-coil domain containing 1
g	Beschleunigung als Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung
G	Gauge, Feinheit des Außendurchmessers einer Kanüle
GFP	green fluorescent protein, isoliertes Protein aus der Qualle <i>Aequorea victoria</i>

G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor, Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HEK	Human Embryonic Kidney, menschliche embryonale Nierenzellen
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettich-Peroxidase
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
ICR	Interkostalraum
IGF-1	insulin-like growth factor 1, insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IVS	interventricular septum, Septumstärke
IVSd	diastolic interventricular septum, diastolische Septumstärke
IVSs	systolic interventricular septum, systolische Septumstärke
KO	Knockout
LAMP-2	Lysosome-associated Membrane Protein 2, Lysosomen-assoziiertes Membranprotein 2
LB-Medium	lysogeny broth, komplexes Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien, enthält Hefeextrakt, Trypton und Natriumchlorid
LC3	Light Chain 3, im Stoffwechselweg der Autophagie beteiligt, Autophagiemarker
LGMD 2B	Limb-girdle Muscular Dystrophy Type 2B, Gliedergürteldystrophie Typ 2B
LR-Reaktion	Erzeugung des Expressionsvektors, Reaktion zwischen Entry Clone und Ziel-Vektor
LVID	left ventricular internal diameter, linksventrikulärer Diameter
LVIDd	left ventricular internal diameter diastolic, linksventrikulärer diastolischer Diameter
LVIDs	left ventricular internal diameter systolic, linksventrikulärer systolischer Diameter
miR, miRNA	microRNA
moi	multiplicity of infection, Multiplizität der Infektion, zahlenmäßiges Verhältnis von infektiösen Agenzien zu deren Zielzellen
mTOR	mammalian target of rapamycine
MyH7	Gen, das für Myosin kodiert
M-Mode	(time) motion, eindimensionale Darstellung von Bewegungsabläufen
NCS	Newborn Calf Serum, fetales Kälberserum
Nppa, ANP	Atriales natriuretisches Peptid, atrialer natriuretischer Faktor
Nppb, BNP	Brain Natriuretic Peptide, natriuretisches Peptid Typ B
NRVCM	Neonatal rat ventricular cardiac myocyte
n.s.	not significant, nicht signifikant
PAC-I	Restriktionsendonuklease, PAC-I-Gen aus Pseudomonas alcaligenes
PBS	Phosphate buffered saline, Pufferlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
rt-PCR, q-PCR	Real-time PCR (Echtzeit-PCR) oder quantitative PCR
rt-PCT	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin

PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PI3P	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PVDF	Polyvinylidenfluorid, opaker, teilkristalliner, thermoplastischer Fluorkunststoff
PW	posterior wall, Stärke der Hinterwand
PWd, LVPWd	diastolic posterior wall, Stärke der Hinterwand diastolisch
PWs	systolic posterior wall, Stärke der Hinterwand systolisch
Rab7	Ras-related in brain, monomere G-Proteine (GTPasen)
Rlp32	Receptor like protein 32
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	revolutions per minute, Drehzahl
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecyl-Sulfat
Sham	Täuschung
STD	Standard
TRIzol	Reagenz zur RNA-Isolierung
SOC-Medium	Super Optimal Broth, komplexes Nährmedium zur Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien
SV-40	Simian-Virus 40, Affenvirus 40, Virus der Familie Polyomviren
TAB	transthoracic aortic banding, transthorakales aortales Banding
TBST	TBS-Tween, Tris-Buffered Saline und Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin, aliphatisches Amin
ULK1	Pendant von ATG1
UV-Licht	Ultraviolettstrahlung
Vps	Vacuolar Protein Sorting, Klasse III Phosphatidylinositol-3-OH Kinase Komplex
WT	wildtype, Wildtyp

## IX. Literaturverzeichnis

1. Levine, B. and D.J. Klionsky, *Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy*. Dev Cell, 2004. **6**(4): p. 463-77.
2. Klionsky, D.J., *Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(11): p. 931-7.
3. Klionsky, D.J. and S.D. Emr, *Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation*. Science, 2000. **290**(5497): p. 1717-21.
4. Zhu, H., et al., *Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress*. J Clin Invest, 2007. **117**(7): p. 1782-93.
5. Shintani, T. and D.J. Klionsky, *Autophagy in health and disease: a double-edged sword*. Science, 2004. **306**(5698): p. 990-5.
6. Gustafsson, A.B. and R.A. Gottlieb, *Recycle or die: the role of autophagy in cardioprotection*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **44**(4): p. 654-61.
7. Wang, Z.V., B.A. Rothermel, and J.A. Hill, *Autophagy in hypertensive heart disease*. J Biol Chem. **285**(12): p. 8509-14.
8. Levine, B. and G. Kroemer, *Autophagy in the pathogenesis of disease*. Cell, 2008. **132**(1): p. 27-42.
9. Mizushima, N., et al., *In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(3): p. 1101-11.
10. Cecconi, F. and B. Levine, *The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death*. Dev Cell, 2008. **15**(3): p. 344-57.
11. Klionsky, D.J., *The molecular machinery of autophagy: unanswered questions*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 1): p. 7-18.
12. Wang, C.W. and D.J. Klionsky, *The molecular mechanism of autophagy*. Mol Med, 2003. **9**(3-4): p. 65-76.
13. Xie, Z. and D.J. Klionsky, *Autophagosome formation: core machinery and adaptations*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(10): p. 1102-9.
14. Kanki, T., et al., *Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy*. Dev Cell, 2009. **17**(1): p. 98-109.
15. Kamada, Y., T. Sekito, and Y. Ohsumi, *Autophagy in yeast: a TOR-mediated response to nutrient starvation*. Curr Top Microbiol Immunol, 2004. **279**: p. 73-84.
16. Kamada, Y., et al., *Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex*. J Cell Biol, 2000. **150**(6): p. 1507-13.
17. Chan, E.Y., *mTORC1 phosphorylates the ULK1-mAtg13-FIP200 autophagy regulatory complex*. Sci Signal, 2009. **2**(84): p. pe51.
18. Hara, T., et al., *Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice*. Nature, 2006. **441**(7095): p. 885-9.
19. Komatsu, M., et al., *Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice*. Nature, 2006. **441**(7095): p. 880-4.
20. Qu, X., et al., *Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1809-20.
21. Liang, X.H., et al., *Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1*. Nature, 1999. **402**(6762): p. 672-6.
22. Liang, C., et al., *Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(7): p. 688-99.
23. Gutierrez, M.G., et al., *Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages*. Cell, 2004. **119**(6): p. 753-66.

24. Shreider, E.V., et al., [*Glycogen storage disease: danon syndrome*]. *Kardiologija*, 2012. **52**(1): p. 91-6.
25. Catovic, S. and P. Otasevic, [*Danon disease: a case report and literature overview*]. *Srp Arh Celok Lek*, 2007. **135**(3-4): p. 197-200.
26. He, J.Q., et al., [*Clinical characterization of patients with Danon disease*]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*, 2013. **41**(7): p. 594-7.
27. Cheng, Z. and Q. Fang, *Danon disease: focusing on heart*. *J Hum Genet*, 2012. **57**(7): p. 407-10.
28. Bolanos-Meade, J., et al., *Hydroxychloroquine causes severe vacuolar myopathy in a patient with chronic graft-versus-host disease*. *Am J Hematol*, 2005. **78**(4): p. 306-9.
29. Askanas, V. and W.K. Engel, *Inclusion-body myositis: a myodegenerative conformational disorder associated with Abeta, protein misfolding, and proteasome inhibition*. *Neurology*, 2006. **66**(2 Suppl 1): p. S39-48.
30. Terman, A. and U.T. Brunk, *Autophagy in cardiac myocyte homeostasis, aging, and pathology*. *Cardiovasc Res*, 2005. **68**(3): p. 355-65.
31. Kuma, A., et al., *The role of autophagy during the early neonatal starvation period*. *Nature*, 2004. **432**(7020): p. 1032-6.
32. Komatsu, M., et al., *Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice*. *J Cell Biol*, 2005. **169**(3): p. 425-34.
33. Mizushima, N., et al., *A protein conjugation system essential for autophagy*. *Nature*, 1998. **395**(6700): p. 395-8.
34. Nakai, A., et al., *The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress*. *Nat Med*, 2007. **13**(5): p. 619-24.
35. Masiero, E. and M. Sandri, *Autophagy inhibition induces atrophy and myopathy in adult skeletal muscles*. *Autophagy*, 2010. **6**(2): p. 307-9.
36. Kihara, A., et al., *Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae**. *J Cell Biol*, 2001. **152**(3): p. 519-30.
37. Yue, Z., et al., *Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(25): p. 15077-82.
38. Hill, J.A., et al., *Cardiac hypertrophy is not a required compensatory response to short-term pressure overload*. *Circulation*, 2000. **101**(24): p. 2863-9.
39. Kanamori, H., et al., *Functional significance and morphological characterization of starvation-induced autophagy in the adult heart*. *Am J Pathol*, 2009. **174**(5): p. 1705-14.
40. Zeller, R., *Identifizierung und Charakterisierung neuer Mutationen in bekannten und neuen Kandidatengenen für die Kardiomyopathie*.
41. Pankiv, S., et al., *FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport*. *J Cell Biol*. **188**(2): p. 253-69.
42. Chen, J., et al., *Mutations in FYCO1 cause autosomal-recessive congenital cataracts*. *Am J Hum Genet*, 2011. **88**(6): p. 827-38.
43. Kiss, H., et al., *Comparative human/murine sequence analysis of the common eliminated region 1 from human 3p21.3*. *Mamm Genome*, 2002. **13**(11): p. 646-55.
44. Kiss, H., et al., *The transcriptional map of the common eliminated region 1 (C3CER1) in 3p21.3*. *Eur J Hum Genet*, 2002. **10**(1): p. 52-61.
45. Pankiv, S. and T. Johansen, *FYCO1: Linking autophagosomes to microtubule plus end-directing molecular motors*. *Autophagy*. **6**(4).
46. Kabeya, Y., et al., *LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing*. *EMBO J*, 2000. **19**(21): p. 5720-8.
47. Sengupta, A., J.D. Molkenkin, and K.E. Yutzey, *FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(41): p. 28319-31.



48. Matsui, Y., et al., *Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy*. *Circ Res*, 2007. **100**(6): p. 914-22.
49. Taneike, M., et al., *Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy*. *Autophagy*. **6**(5).
50. Hariharan, N., et al., *Deacetylation of FoxO by Sirt1 Plays an Essential Role in Mediating Starvation-Induced Autophagy in Cardiac Myocytes*. *Circ Res*, 2010. **107**(12): p. 1470-82.
51. Chaanine, A.H., et al., *JNK modulates FOXO3a for the expression of the mitochondrial death and mitophagy marker BNIP3 in pathological hypertrophy and in heart failure*. *Cell Death Dis*, 2012. **3**: p. 265.
52. Givvimani, S., et al., *Mitochondrial division/mitophagy inhibitor (Mdivi) ameliorates pressure overload induced heart failure*. *PLoS One*, 2012. **7**(3): p. e32388.
53. Shimomura, H., et al., *Autophagic degeneration as a possible mechanism of myocardial cell death in dilated cardiomyopathy*. *Jpn Circ J*, 2001. **65**(11): p. 965-8.
54. Miyata, S., et al., *Autophagic cardiomyocyte death in cardiomyopathic hamsters and its prevention by granulocyte colony-stimulating factor*. *Am J Pathol*, 2006. **168**(2): p. 386-97.
55. Nishida, K., O. Yamaguchi, and K. Otsu, *Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease*. *Circ Res*, 2008. **103**(4): p. 343-51.
56. Dionisi Vici, C., et al., *Agenesis of the corpus callosum, combined immunodeficiency, bilateral cataract, and hypopigmentation in two brothers*. *Am J Med Genet*, 1988. **29**(1): p. 1-8.
57. Chiyonobu, T., et al., *Sister and brother with Vici syndrome: agenesis of the corpus callosum, albinism, and recurrent infections*. *Am J Med Genet*, 2002. **109**(1): p. 61-6.
58. Cullup, T., et al., *Recessive mutations in EPG5 cause Vici syndrome, a multisystem disorder with defective autophagy*. *Nat Genet*, 2013. **45**(1): p. 83-7.
59. Boustany, R.M., *Lysosomal storage diseases--the horizon expands*. *Nat Rev Neurol*, 2013. **9**(10): p. 583-98.
60. Huang, B. and W. He, *Molecular characteristics of inherited congenital cataracts*. *Eur J Med Genet*, 2010. **53**(6): p. 347-57.
61. Aldahmesh, M.A., et al., *Genomic analysis of pediatric cataract in Saudi Arabia reveals novel candidate disease genes*. *Genet Med*, 2012. **14**(12): p. 955-62.
62. De Meyer, G.R., et al., *Autophagy in vascular disease*. *Circ Res*, 2015. **116**(3): p. 468-79.
63. Rothermel, B.A. and J.A. Hill, *Autophagy in load-induced heart disease*. *Circ Res*, 2008. **103**(12): p. 1363-9.
64. Gustafsson, A.B. and R.A. Gottlieb, *Autophagy in ischemic heart disease*. *Circ Res*, 2009. **104**(2): p. 150-8.
65. Rothermel, B.A. and J.A. Hill, *Myocyte autophagy in heart disease: friend or foe?* *Autophagy*, 2007. **3**(6): p. 632-4.
66. Orogo, A.M. and A.B. Gustafsson, *Therapeutic targeting of autophagy: potential and concerns in treating cardiovascular disease*. *Circ Res*, 2015. **116**(3): p. 489-503.
67. McMullen, J.R., et al., *Inhibition of mTOR signaling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload*. *Circulation*, 2004. **109**(24): p. 3050-5.
68. Das, A., et al., *Rapamycin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through JAK2-STAT3 signaling pathway*. *J Mol Cell Cardiol*, 2012. **53**(6): p. 858-69.
69. Das, A., et al., *Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition with rapamycin improves cardiac function in type 2 diabetic mice: potential role of attenuated oxidative stress and altered contractile protein expression*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(7): p. 4145-60.
70. Huang, C., et al., *Autophagy and protein kinase C are required for cardioprotection by sulfaphenazole*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010. **298**(2): p. H570-9.
71. Sala-Mercado, J.A., et al., *Profound cardioprotection with chloramphenicol succinate in the swine model of myocardial ischemia-reperfusion injury*. *Circulation*, 2010. **122**(11 Suppl): p. S179-84.

72. Parihar, S.P., et al., *Statin therapy reduces the mycobacterium tuberculosis burden in human macrophages and in mice by enhancing autophagy and phagosome maturation*. J Infect Dis, 2014. **209**(5): p. 754-63.
73. Peng, X., et al., *Inhibition of proliferation and induction of autophagy by atorvastatin in PC3 prostate cancer cells correlate with downregulation of Bcl2 and upregulation of miR-182 and p21*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e70442.
74. Wu, Y., et al., *Resveratrol-activated AMPK/SIRT1/autophagy in cellular models of Parkinson's disease*. Neurosignals, 2011. **19**(3): p. 163-74.
75. Chan, A.Y., et al., *Resveratrol inhibits cardiac hypertrophy via AMP-activated protein kinase and Akt*. J Biol Chem, 2008. **283**(35): p. 24194-201.
76. Wang, B., et al., *Resveratrol-enhanced autophagic flux ameliorates myocardial oxidative stress injury in diabetic mice*. J Cell Mol Med, 2014. **18**(8): p. 1599-611.
77. Dutta, D., et al., *Calorie restriction combined with resveratrol induces autophagy and protects 26-month-old rat hearts from doxorubicin-induced toxicity*. Free Radic Biol Med, 2014. **74**: p. 252-62.
78. Lu, L., et al., *Adriamycin-induced autophagic cardiomyocyte death plays a pathogenic role in a rat model of heart failure*. Int J Cardiol, 2009. **134**(1): p. 82-90.
79. Pyo, J.O., et al., *Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2300.
80. Bhuiyan, M.S., et al., *Enhanced autophagy ameliorates cardiac proteinopathy*. J Clin Invest, 2013. **123**(12): p. 5284-97.

## X. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben:

Mein Dank gilt Prof. Dr. med. N. Frey für die Möglichkeit zur Verfassung der Dissertation und Dr. med. C. Kuhn für die Betreuung und Bereitstellung des Themas.

Vielen Dank an Susanne Hille, Gabriele Brunke und Franziska Dierck für die praktische Hilfe im Labor.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. med. A. Claviez, der bei der Fertigstellung der Dissertation zum Gelingen beigetragen hat.

In aller erster Linie möchte ich jedoch meinen Eltern danken, die mir mein Studium ermöglicht und meinen beruflichen Werdegang immer mit viel Verständnis unterstützt haben.

## XI. Lebenslauf

Claudia Eva Mack

Geboren am 08.01.1986 in Tübingen

### Beruflicher Werdegang

---

Seit 09/2013 Assistenzärztin am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie

### Studium

---

#### Prüfungen

05/2013 **Approbation**  
04/2013 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2011 **Stipendium** der Christian-Albrechts-Universität und Kieler Volksbank  
03/2008 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
seit 10/2005 Studium der Medizin an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel

#### Lehre und Wissenschaft

01/2010 **Wissenschaftliche Weiterbildung:** Tierschutz und Versuchstiere in der Forschung  
01-02/2008 **Lehre:** Betreuung des Anatomie-Kurses des Anatomischen Institutes der Christian-Albrechts-Universität in Kiel unter Prof. Dr. Dr. med. M. Schünke

#### Klinische Tätigkeit

02/2013-08/2013 **Operationsassistentin** bei PD Dr. med. C. Seif im Urologischen Zentrum Kiel  
08/2011-07/2012 **Praktisches Jahr (PJ)**  
Urologie: Klinik für Urologie und Kinderurologie am UKSH, Kiel, Prof. Dr. med. K.-P. Jünemann  
Chirurgie: Taranaki Base Hospital, New Plymouth, Neuseeland, Dr. med. F.El-Haddawi  
Innere Medizin: Städtisches Krankenhaus Kiel, Prof. Dr. med. J. Strotmann  
04/2005-08/2009 **Famulaturen und Pflegepraktikum**  
08/2009 Klinik für Kardiologie und Angiologie am UKSH, Kiel, Prof. Dr. med. N. Frey  
02/2009 Nephrologische Klinik des Universitätsklinikum Mannheim, Prof. Dr. med. P. Schnülle  
03/2009 Dermatologische Klinik des Universitätsklinikum Mannheim, Prof. Dr. med. S. Goerdts

08-09/2008	Chirurgische Klinik des Universitätsklinikum Mannheim, Prof. Dr. med. S. Post
04-05/2005 und 09-10/2005	Pflegepraktikum in der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Mannheim, Prof. Dr. med. P. Schmiedek

## Schulbildung

---

	<b>Gymnasiale Ausbildung</b>
1996-2005	am Geschwister-Scholl-Gymnasium in Ludwigshafen am Rhein Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife – Abitur
	<b>Grundschule</b>
1994-1996	Alfred-Delp-Grundschule in Ludwigshafen am Rhein
1992-1994	Grundschule in Meckenheim

## Auslandsaufenthalte

---

12/2011-03/2012	Chirurgisches PJ-Tertial in New Plymouth, Neuseeland
06-08/2005	Kinderbetreuung im Girls Scout Camp in Texas, USA

## Publikationen

---

Posterpräsentation	Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie 2011 C. Kuhn, <b>C. Mack</b> , R. Zeller, R. Will, M. Koegl, S. Wiemann, H. A. Katus, N. Frey Titel: Das muskelspezifische Protein ZFYVE7 ist assoziiert mit Autophagie
Posterpräsentation	Jahrestagung der American Heart Association 2011 C. Kuhn, <b>C. Mack</b> , R. Will, G. Brunke, S. Wiedemann, M. Koegl, H. A. Katus, N. Frey Titel: ZFYVE7 promotes autophagy in cardiomyocytes Circulation 2011. 124 A13519
Posterpräsentation	Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie 2012 C. Kuhn, <b>C. Mack</b> , R. Will, S. Wiemann, M. Koegl, H. A. Katus, N. Frey Titel: Das neue muskelspezifische FYCO1 induziert Autophagie in Kardiomyozyten