

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

In vitro- und in vivo-Charakterisierung von Myomasp/LRRC39, einem
neuen, dehnungssensitiven M-Banden-Protein und seine Bedeutung für
kardiale Hypertrophie

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

vorgelegt von

Philip Alexander Usinger

aus **Hannover**

Kiel, **2016**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Norbert Frey

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Baukrowitz

Tag der mündlichen Prüfung: 05.03.2018

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

gez.:

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	HERZINSUFFIZIENZ UND HYPERTROPHIE.....	1
1.2	DAS SARKOMER.....	4
1.3	DAS FETALE GENPROGRAMM	6
1.4	DER SRF-SIGNALWEG	7
1.5	DER CALCINEURIN-NFAT-SIGNALWEG	9
1.6	MYOMASP/LRRC39.....	10
1.7	PROBLEMSTELLUNG DIESER ARBEIT	12
1.7.1	<i>Charakterisierung des Einflusses von Myomasp/LRRC39 auf die Hypertrophieentstehung in Kardiomyozyten in vitro</i>	<i>13</i>
1.7.2	<i>Phänotypisierung der Myomasp/LRRC39-Knockout-Maus</i>	<i>13</i>
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	MATERIAL	14
2.1.1	<i>Geräte und Verbrauchsmaterialien.....</i>	<i>14</i>
2.1.2	<i>Chemikalien.....</i>	<i>15</i>
2.1.3	<i>Enzyme.....</i>	<i>17</i>
2.1.4	<i>Antikörper</i>	<i>17</i>
2.1.5	<i>Kits</i>	<i>18</i>
2.1.6	<i>Oligonukleotide.....</i>	<i>18</i>
2.1.7	<i>Puffer und Lösungen</i>	<i>20</i>
2.1.8	<i>Medien.....</i>	<i>21</i>
2.1.9	<i>Versuchstiere.....</i>	<i>22</i>
2.1.10	<i>Adenoviren.....</i>	<i>22</i>
2.2	METHODEN	23
2.2.1	<i>Isolation neonataler Rattenkardiomyozyten.....</i>	<i>23</i>
2.2.2	<i>Vermehrung von Adenoviren in HEK-293T-Zellen und Titerbestimmung</i>	<i>25</i>
2.2.3	<i>Hypertrophieinduktion in NRVCN unter Überexpression und Knockdown von Myomasp/LRRC39</i>	<i>26</i>
2.2.4	<i>RNA-Isolation aus NRVCN und adulten Mausherzen.....</i>	<i>28</i>
2.2.5	<i>cDNA-Synthese und quantitative Realtime-PCR.....</i>	<i>30</i>
2.2.6	<i>Proteinisolation aus NRVCN und adulten Mausherzen</i>	<i>34</i>
2.2.7	<i>Proteinkonzentrationsbestimmung (Bio-Rad DC Protein-Assay).....</i>	<i>35</i>
2.2.8	<i>SDS-PAGE und Western Blot</i>	<i>36</i>
2.2.9	<i>Firefly-Luciferase Assay.....</i>	<i>41</i>
2.2.10	<i>Immunzytochemie in NRVCN.....</i>	<i>43</i>
2.2.11	<i>Zellgrößenbestimmung</i>	<i>44</i>
2.2.12	<i>Genotypisierung der Myomasp/LRRC39-Knockout-Maus.....</i>	<i>45</i>
2.2.13	<i>Echokardiographische Untersuchung der Mausherzen.....</i>	<i>47</i>
2.2.14	<i>Tötung der Myomasp/LRRC39-Knockout-Mäuse und Organentnahme.....</i>	<i>48</i>

2.2.15	<i>Fixierung adulter Mäuse und Transmissionselektronen- mikroskopie</i>	49
2.2.16	<i>Statistische Auswertung</i>	49
3	ERGEBNISSE	51
3.1	IN-VITRO-ERGEBNISSE	51
3.1.1	<i>Myomasp/LRRC39-Überexpression und –Knockdown beeinflussen die Hypertrophieinduktion durch Phenylephrin in NRVCN</i>	51
3.1.2	<i>Myomasp/LRRC39-Überexpression induziert den SRF-Signalweg in NRVCN</i>	53
3.1.3	<i>Myomasp/LRRC39-Überexpression und -Knockdown beeinflussen den Calcineurin-NFAT-Signalweg in NRVCN</i>	54
3.2	IN-VIVO-ERGEBNISSE.....	55
3.2.1	<i>Myomasp/LRRC39-Knockout-Mäuse zeigen unter basalen Bedingungen keine kardiale Dysfunktion, Hypertrophie oder Fibrose</i>	55
3.2.2	<i>Myomasp/LRRC39-Knockout-Mäuse zeigen geschlechtsabhängig veränderte Genexpressionen und Hinweise auf eine Supprimierung von SRF</i>	59
3.2.3	<i>Myomasp/LRRC39-Knockout-Mäuse zeigen keine veränderte Ultrastruktur ihrer Kardiomyozyten</i>	61
4	DISKUSSION	63
4.1	MYOMASP/LRRC39 WIRKT ANTIHYPERTROPH ÜBER DIE INHIBIERUNG DES CALCINEURIN-NFAT-SIGNALWEGES	63
4.2	MYOMASP/LRRC39 INDUZIERT DEN SRF-SIGNALWEG MÖGLICHERWEISE ÜBER EINE ERHÖHUNG DER STABILITÄT DES TK-NBR1-P62-MURF2-KOMPLEXES	66
4.3	DER KNOCKOUT VON MYOMASP/LRRC39 IN VIVO BEWIRKT EINE LATENTE VERÄNDERUNG DER M-BANDEN-ARCHITEKTUR OHNE FUNKTIONELLE ODER MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN UNTER BASALEN BEDINGUNGEN	67
5	ZUSAMMENFASSUNG	72
6	LITERATURVERZEICHNIS	74
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	79
8	TABELLENVERZEICHNIS	80
9	LEBENS LAUF	81

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz und Hypertrophie

Weltweit sind über 20 Millionen Menschen an einer Herzinsuffizienz erkrankt. Die Gesamtprävalenz in den Industrienationen beträgt etwa 2%, im Alter zwischen 70 und 80 Jahren sogar 10 bis 20% (Dickstein, Cohen-Solal et al. 2008). Die Patienten leiden aufgrund erworbener oder angeborener Veränderungen der Herzstruktur und/oder -funktion an Symptomen wie Luftnot und Leistungsminderung und haben eine zum Teil stark eingeschränkte Lebensqualität und Lebenserwartung. Das klinische Ausmaß einer Herzinsuffizienz wird in der klinischen Praxis eingeteilt in vier Stadien nach der New York Heart Association (NYHA) und korreliert direkt mit der Letalität: So beträgt die 1-Jahresletalität im NYHA-Stadium II (Beschwerden erst bei schwerer körperlicher Belastung) etwa 15%, im NYHA-Stadium IV (Beschwerden in Ruhe) etwa 50%. Herz-Kreislaufkrankungen stellen die häufigste Todesursache in Deutschland dar und ihre sozioökonomische Bedeutung ist immens: 2008 entstanden in Deutschland laut statistischem Bundesamt mit 37 Milliarden Euro höhere Kosten durch Herz-Kreislaufkrankungen als durch alle anderen Erkrankungen (Statistisches Bundesamt, 2010).

Die komplexen Mechanismen bei der Entstehung und Progression einer Herzinsuffizienz sind nur teilweise verstanden. Ein anerkanntes Konzept ist, dass initial ein Indexereignis zu einer Schädigung des Herzmuskels führt. Dieses Indexereignis kann eine akute Schädigung sein, wie ein Myokardinfarkt, oder ein andauernder Zustand, wie eine Aortenklappenstenose. Hierdurch treten eine Reihe von kompensatorischen Mechanismen in Kraft, wie die Aktivierung adrenerger Nervenbahnen und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems sowie eine vermehrte Ausschüttung der natriuretischen Peptide und anderer, vasoaktiver Substanzen. Es kommt zu komplexen Veränderungen auf allen Ebenen des Myokards, die zusammenfassend als Remodeling bezeichnet werden und über oft Monate oder Jahre dazu führen, dass die Herzkraft aufrechterhalten bzw. ein Progress der Herzinsuffizienz verhindert wird. Jedoch schlagen die adaptiven Veränderungen, aus noch unzureichend verstandenen Gründen, nach Monaten bis Jahren um in eine Maladaptation und es kommt zu einem Progress der Herzinsuffizienz (Frey and Olson 2003).

Eine zentrale Rolle unter den adaptiven Mechanismen scheint die Hypertrophie des Herzmuskels zu spielen. Diese ist gekennzeichnet durch eine Größenzunahme der einzelnen Kardiomyozyten, welche es vorübergehend ermöglichen kann, einen Pumpkraftverlust zu kompensieren oder, falls notwendig, die Pumpkraft sogar zu erhöhen.

Steht die Hypertrophie im Vordergrund des myokardialen Remodelings, etwa durch eine Druckbelastung des linken Ventrikels aufgrund einer Aortenklappenstenose (dem häufigsten erworbenen Klappenvitium im Erwachsenenalter in den Industrienationen) oder eines anhaltenden Bluthochdrucks, kommt es oft zu einer speziellen Form der Herzinsuffizienz: der Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (heart failure with preserved ejection fraction, HFpEF). Diese ist charakterisiert durch eine erhöhte, linksventrikuläre Muskelmasse mit verminderter Compliance des linken Ventrikels bei erhaltener Ejektionsfraktion. Zusätzlich zu der behinderten Ventrikelfüllung kann durch die zunehmende Wandstärke eine relative Koronarinsuffizienz auftreten, die zu einer Unterversorgung insbesondere des subendokardialen Myokards führt.

Die HFpEF stellt den Arzt vor eine besondere therapeutische Herausforderung, da ein Großteil der etablierten und evidenzbasierten Therapien auf Patienten mit eingeschränkter Pumpfunktion ausgelegt und bei der diastolischen Herzinsuffizienz unwirksam sind.

Ähnlich verhält es sich bei angeborenen Kardiomyopathien, bei denen es primär zu einer Hypertrophie des Myokards kommt. Hierzu zählen die hypertrophe, nicht obstruktive Kardiomyopathie (HCM) sowie die hypertrophe, obstruktive Kardiomyopathie (HOCM). Hier liegt der Hypertrophie keine Erhöhung der Nachlast sondern eine genomische Mutation zugrunde. Meist sind Proteine betroffen, die Bestandteil des Sarkomers oder des Zytoskeletts sind.

Die molekularen Mechanismen der Entstehung von Hypertrophie sind seit einigen Jahren zentraler Bestandteil der kardiovaskulären Grundlagenforschung. So konnten diverse Signalkaskaden identifiziert werden, die an der Hypertrophieregulation in Herzmuskelzellen beteiligt sind. Einen Überblick über diese Signalkaskaden gibt Abbildung 1.

die natriuretischen Peptide degradiert, die Mortalität durch ein kardiovaskuläres Ereignis im Vergleich zu einer Therapie mit Enalapril um weitere 20% reduziert (McMurray, Packer et al.).

Dennoch ist die Mortalität weiterhin hoch und in der weit überwiegenden Zahl der Fälle keine Heilung der Patienten möglich. Ziel der kardiologischen Grundlagenforschung und somit auch dieser Arbeit ist es, ein umfassendes Verständnis von der Hypertrophieentstehung im Herzmuskel zu erhalten und dadurch langfristig neue Therapieoptionen zu gewinnen, kardiale Hypertrophie und Insuffizienz kurativ zu behandeln und effektiv vorzubeugen.

1.2 Das Sarkomer

Die Hypertrophie einer Herzmuskelzelle geht insbesondere mit der Vermehrung der kleinsten funktionellen Einheit der Muskelzelle einher – dem Sarkomer. Es besteht im Wesentlichen aus den an der Z-Scheibe verankerten Aktinfilamenten und den an der M-Bande verankerten Myosinfilamenten. Von der Z-Scheibe bis zur M-Bande erstreckt sich das mit etwa 3600 kDa größte Protein des Menschen: Titin (auch Connectin genannt) (s. Abbildung 2).

Innerhalb der M-Bande sind elektronenmikroskopisch die sogenannten M-Lines erkennbar (Luther and Squire 1980, Carlsson and Thornell 1987). Diese werden als M6', M4', M1, M4 und M6 bezeichnet. Während die M4'/M4-Linien in allen Muskeln vorhanden sind, hängt das Vorhandensein der übrigen Linien von der Art des Muskels ab: bei Skelettmuskeln von der Kontraktionsgeschwindigkeit, bei Herzmuskelzellen von der Herzfrequenz (Pask, Jones et al. 1994). Zwar waren die M-Lines schon in den 80er Jahren beschrieben worden, das molekulare Korrelat war jedoch bis vor wenigen Jahren unklar. Erst 2005 konnte gezeigt werden, dass es sich bei den M4'/M4-Linien wahrscheinlich um Myomesin-Dimere handelt, die eine Quervernetzung der Myosinfilamente an der M-Bande bewirken (Agarkova and Perriard 2005).

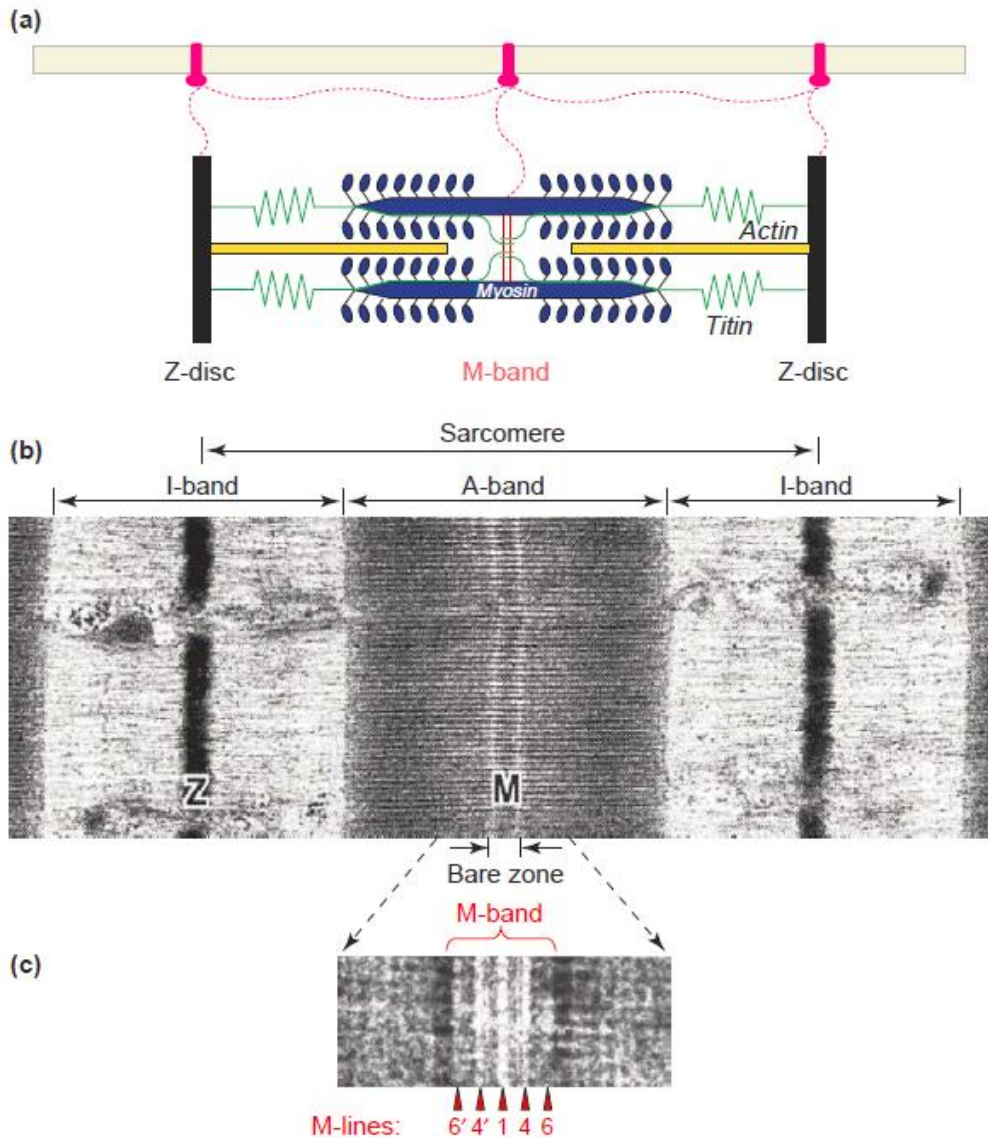


Abbildung 2: Aufbau und Ultrastruktur des Sarkomers. (a) Schematische Darstellung des Sarkomers. Aktin und Myosin verschieben sich unter ATP-Spaltung gegeneinander und bewirken so eine Verkürzung des Sarkomers. Über extrasarkomere Filamente und transmembranäre Proteine (magenta) wird die Kraft auf die Zellmembran übertragen. Durch die koordinierte Erregung aller Herzmuskelzellen durch von Zelle zu Zelle fortgeleitete Aktionspotentiale entsteht so eine Kontraktion des gesamten Herzmuskels. (b) Transmissionselektronenmikroskopisches Bild eines Sarkomers. Die besonders markante Z-Scheibe (Z) begrenzt ein Sarkomer jeweils zu beiden Seiten. In starker Vergrößerung mit Negativkontrast (c) werden innerhalb der M-Bande die sogenannten M-Lines erkennbar. Aus (Agarkova and Perriard 2005).

Die augenscheinlichste Funktion des Sarkomers ist die Kontraktion: Aktin und Myosin verschieben sich unter Spaltung von ATP ineinander und bewirken so eine Kontraktion der Herzmuskelzelle. Hierfür sind unzählige weitere Proteine erforderlich, die teils der Kontraktionsregulation dienen, wie zum Beispiel die Troponine und Tropomyosin, oder aber der Verankerung und Kraftübertragung, wie zum Beispiel Actinin, Desmin und Telethonin.

Die Kontraktion ist jedoch bei weitem nicht die einzige Funktion des Sarkomers: So dient es auch als Gerüst für die Kolokalisation der verschiedenen Komponenten von Signalkaskaden. Beispielsweise lässt sich die Calcium/Calmodulin abhängige Phosphatase Calcineurin, die eine zentrale Rolle bei der Entstehung von kardialer Hypertrophie spielt, zu einem großen Teil an der Z-Scheibe lokalisieren, ebenso wie ihr Inhibitor Calcisarcin-1 (Frey, Barrientos et al. 2004). Diese räumliche Organisation von Signalkaskaden durch das Sarkomer ist notwendig, um eine schnelle und effiziente Signaltransduktion zu gewährleisten.

Eine weitere Funktion des Sarkomers ist die Mechanotransduktion. Hierunter versteht man die Umwandlung mechanischer in biochemische Signale. So führt beispielsweise eine biomechanische Konformationsänderung der dehnungssensitiven N2B-Titindomäne über FHL1 zu einer Induktion prohypertropher Signalwege (Sheikh, Raskin et al. 2008), ebenso wie eine Konformationsänderung der Titinkinasedomäne über den NBR1-p62-MURF2-Komplex (vgl. 1.4, Abbildung 3: Aktivierungswege von SRF.).

1.3 Das fetale Genprogramm

Die Zusammensetzung sarkomerischer und sarkomerassoziierter Proteine im Herzen ändert sich im Laufe der embryonalen Entwicklung. Dies dient der Anpassung von Kontraktilität und Energiemetabolismus an veränderte hämodynamische und metabolische Bedingungen. Beispielsweise exprimieren fetale und neonatale Herzmuskelzellen α 1-skeletal actin (Acta1) und β -Myosin heavy chain (β -MHC), während adulte Herzmuskelzellen fast ausschließlich α 1-cardiac actin (actc1) und α -MHC exprimieren (Nag and Cheng 1986, Schwartz, Boheler et al. 1992). Unter pathophysiologischen Bedingungen wie Herzinsuffizienz und Hypertrophie kommt es jedoch zu einer Reexpression der fetalen Isoformen dieser Proteine (Mercadier, Lompre et al. 1981, Schwartz, Boheler et al. 1992). Die exakte Bedeutung hierfür ist unbekannt. Es wird vermutet, dass diese Veränderungen den Versuch einer Anpassung an veränderte hämodynamische Bedingungen darstellen.

Ebenso zum fetalen Genprogramm gezählt werden die natriuretischen Peptide ANP (atrial natriuretic peptide) und BNP (brain natriuretic peptide) bzw. deren kodierende Gene, Nppa und Nppb. Beide NPs werden in embryonalen Kardiomyozyten produziert und dienen als Marker der Ventrikeldifferenzierung. Postnatal nimmt die

ventrikuläre Nppa-Produktion deutlich ab. Bei Volumenbelastung oder Hypertrophie postnatal kommt es jedoch zu einer signifikanten Induktion sowohl von Nppa als auch Nppb (de Bold, Bruneau et al. 1996). Aufgrund der starken Korrelation und Aussagekraft zählen Nppa und Nppb heute zu den am häufigsten verwendeten Markern für kardiale Hypertrophie in Zellkulturen. Des Weiteren hat die Bestimmung von BNP, bzw. seinem Nebenprodukt NT-proBNP, Eingang in den klinischen Alltag als verlässlicher Marker für Herzinsuffizienz gefunden.

Ebenfalls abhängig von der ontogenetischen Entwicklung ist die Expression von Myomesin 1: seine Spliceisoform EH-Myomesin, die das zusätzliche, elastische EH-Segment beinhaltet, wird während der embryonalen Entwicklung exprimiert und postnatal durch Myomesin 1 ersetzt (Agarkova, Auerbach et al. 2000, Schoenauer, Bertoncini et al. 2005). Agarkova et al. (2000) konnten zeigen, dass die kardiale Expression von EH-Myomesin sowohl in Mausmodellen für dilatative Kardiomyopathie als auch bei Menschen mit dilatativer Kardiomyopathie signifikant erhöht ist (Agarkova, Auerbach et al. 2000).

1.4 Der SRF-Signalweg

Eine wichtige Rolle bei der Regulation von Hypertrophie im Herzen spielt der serum response factor (SRF). Dies konnte in mehreren in-vivo-Experimenten eindrucksvoll demonstriert werden: Transgene Mäuse, die herzspezifisch SRF überexprimierten, entwickelten eine ausgeprägte Kardiomyopathie und kardiale Hypertrophie (Zhang, Azhar et al. 2001). Ein herzspezifischer Knockout hingegen führte durch Störung der Kardiogenese am 10. bis 13. Tag der embryonalen Entwicklung zum Tod (Miano, Ramanan et al. 2004, Parlakian, Tuil et al. 2004). Der postnatale SRF-Knockout durch eine herzspezifische Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase in adulten Mäusen führte zu einer dilatativen Kardiomyopathie, an der alle Tiere innerhalb von 10 Wochen verstarben (Parlakian, Charvet et al. 2005).

SRF ist ein Mitglied der MADS-Box-Familie (benannt nach den vier zuerst entdeckten Vertretern MCM1, AG, DEF1A und SRF). Er wird durch verschiedene Botenstoffe aktiviert und reguliert durch Bindung an sogenannte CArG-Boxen, den serum response elements (SRE), die Transkription zahlreicher Gene (Treisman 1986, Norman, Runswick et al. 1988). Für die Aktivierung des SRF wurden bisher im Wesentlichen drei Signalwege identifiziert: die Wachstumsfaktor abhängige

Phosphorylierung des SRF-Kofaktors ELK-1 durch mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAPK) (Shaw, Schroter et al. 1989, Janknecht, Ernst et al. 1993), die RhoA und G-Actin abhängige Aktivierung des myocardin related transcription factor-A (MRTF-A, auch MAL oder MKL-1) (Miralles, Posern et al. 2003) sowie der an der M-Bande lokalisierte Titinkinase-p62-NBR1-MuRF2-Komplex (Lange, Xiang et al. 2005) (vgl. Abbildung 3).

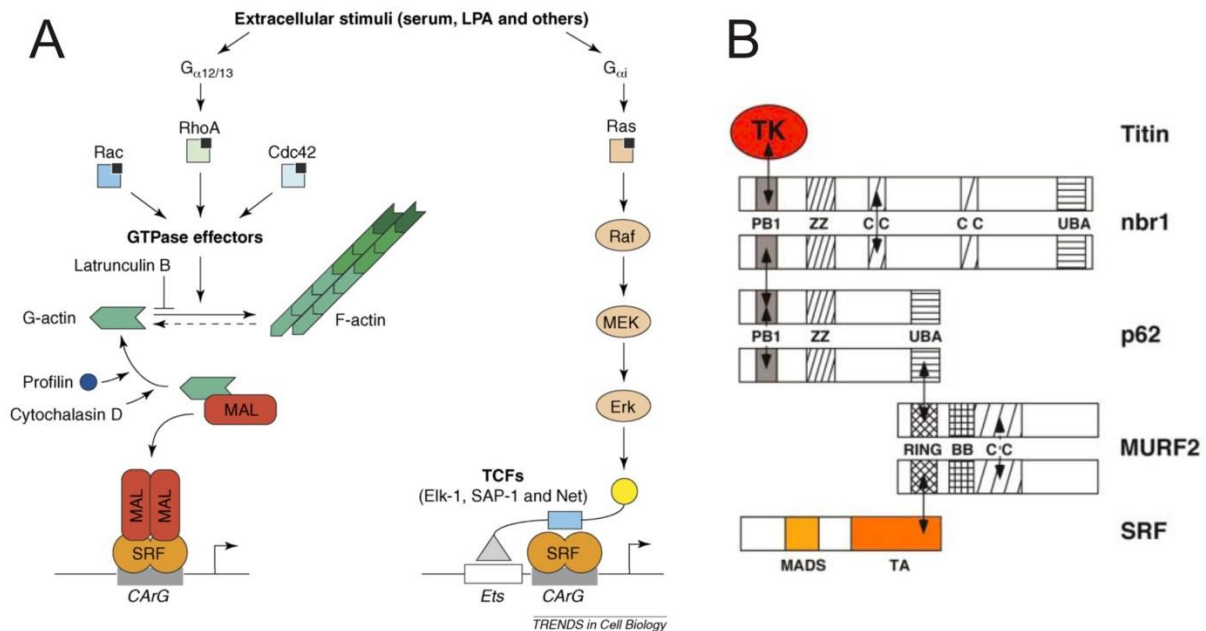


Abbildung 3: Aktivierungswege von SRF. **A:** Extrazelluläre Stimuli führen auf zwei Wegen zur Aktivierung von SRF: 1. Die Aktivierung von RhoA durch G-Proteine führt zur vermehrten Bildung von fibrillärem Aktin. Hierdurch nimmt die Konzentration an globulärem Aktin ab, wodurch der G-Aktinbindungspartner MAL (=MRTF-A) freigesetzt wird, nach intranukleär transloziert und als Kofaktor von SRF agiert. 2. Über den Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg kommt es zur Aktivierung von Elk-1, einem ternary complex factor (TCF), der ebenfalls als Kofaktor von SRF fungiert. Aus (Posern and Treisman 2006). **B:** Eine mechanisch induzierte Konformationsänderung der Titinkinasedomäne (TK) führt zur Bindung von NBR1 an die TK. Über p62 erfolgt so die Rekrutierung von MURF2 an die M-Bande, sodass dieses nicht nach intranukleär translozieren kann, wo es als Inhibitor von SRF fungiert. Es kommt somit zur Enthemmung von SRF. Aus (Lange, Xiang et al. 2005).

SRF reguliert eine große Bandbreite an Genen. Sie umfasst Signalmoleküle, Transkriptionsfaktoren sowie Bestandteile des Zytoskeletts und des kontraktiven Apparates. Nelson et al. (2005) konnten zeigen, dass SRF benötigt wird für die Induktion von ANF, BNP, α -Actin, den schweren Ketten von α - und β -Myosin, den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher NCX1 sowie das Protoonkogen c-fos (Nelson, Balza Jr. et al. September 2005). 2006 konnten Sun et al. mithilfe eines bioinformatischen Vorgehens 106 potenzielle Zielgene für SRF identifizieren, wovon 60 durch Luciferaseassays, quantitative Realtime-PCR oder andere Methoden validiert werden konnten (Sun, Chen et al. 2006). Hierunter fielen viele bereits bekannte, durch SRF-

regulierte Proteine, aber auch solche, die bisher nicht als SRF-reguliert bekannt waren, wie zum Beispiel das Strukturprotein α 1-Actinin, die sarkoplasmatisches-Retikulum- Ca^{2+} -ATPase (SERCA) sowie der Transkriptionsfaktor NFATc4 (=NFAT3).

Zunehmende Bedeutung gewann in den letzten Jahren der SRF-Kofaktor Myocardin. Dieser Transkriptionsfaktor aus der SAP-Familie wird in glatten und Herzmuskelzellen exprimiert, bindet SRF und verstärkt die Expression sarkomerer und zytoskelettaler Gene durch SRF um ein Vielfaches (Wang, Chang et al. 2001). In vivo-Experimente im Krallenfrosch konnten zeigen, dass Myocardin für die Expression einiger herzmuskelspezifischer Proteine, wie cardiac α -Actin und Troponin I, essentiell ist (Wang, Chang et al. 2001). Der genaue Signalweg, über den Myocardin aktiviert wird, ist jedoch noch unklar. Es gibt Hinweise, dass Myocardin transskriptionell (z.B. durch NFATc3 (Wang, Long et al. 2010) oder durch den herzmuskelspezifischen Transkriptionsfaktor NKX2-5 (Ueyama, Kasahara et al. 2003)), posttranskriptionell (z.B. durch miR-9 (Wang, Long et al. 2010)), sowie posttranslational (z.B. durch Phosphorylierung durch die glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β (Badorff, Seeger et al. 2005)) reguliert wird.

1.5 Der Calcineurin-NFAT-Signalweg

Calcineurin (auch Proteinphosphatase 2B, PP2B) ist eine serin-/threoninspezifische Phosphatase, die aus zwei Untereinheiten besteht: einer 58 bis 64kDa großen, Calmodulin bindenden, katalytischen Untereinheit (Calcineurin A, CnA), und einer 19kDa großen, Ca^{2+} bindenden, regulatorischen Untereinheit (Calcineurin B, CnB) (Klee, Draetta et al. 1988). Für Calcineurin A existieren drei (CnA α , A β und A γ), für Calcineurin B zwei Isoformen (CnB1 und B2). Während CnA α , A β und CnB1 ubiquitär exprimiert werden, beschränkt sich die Expression der Isoformen CnA γ und CnB2 im Wesentlichen auf den Hoden (Molkentin 2000).

Der Calcineurin-NFAT-Signalweg wurde ursprünglich in Lymphozyten entdeckt: Hier wird Calcineurin durch Ca^{2+} /Calmodulin aktiviert, dephosphoryliert NFAT (nuclear factor of activated T-cells) und bewirkt so dessen Translokation nach intranukleär, wo NFAT insbesondere die Expression von Interleukin 2 reguliert (Flanagan, Corthesy et al. 1991, Liu, Farmer et al. 1991). 1998 konnten Molkentin et al. zeigen, dass derselbe Signalweg auch an der Entstehung von Hypertrophie in Herzmuskelzellen beteiligt ist. So zeigten transgene Mäuse, die eine konstitutiv aktive katalytische

Untereinheit von Calcineurin überexprimierten, bereits ab dem 18. Tag postnatal eine konzentrische Hypertrophie des Herzmuskels. Hiervon waren alle Herzhöhlen, vor allem aber der linke Ventrikel betroffen. Mit zunehmendem Alter ging die konzentrische in eine dilatative Hypertrophie über und es traten vermehrt plötzliche Herztode auf. Als Korrelat für die Rhythmusereignisse fand sich zudem eine ausgedehnte Fibrose der Ventrikelwände. Veränderungen auf molekularer Ebene umfassten eine stark erhöhte Expression von BNP sowie eine verminderte Expression der sarkoplasmatischen-Retikulum- Ca^{2+} -ATPase (SERCA) (Molkentin, Lu et al. 1998). Denselben Phänotyp entwickelte eine transgene Mauslinie, die konstitutiv aktives NFATc4 (=NFAT3), welches keiner Aktivierung durch Calcineurin bedarf, exprimiert (Molkentin, Lu et al. 1998).

Experimente mit Calcineurin-Knockout-Mäusen bestätigten die prohypertrophe Wirkung von Calcineurin. Zwar waren Mäuse, die entweder kein CnA α oder kein CnA β exprimierten, lebensfähig und zeigten keinen auffälligen kardialen Phänotyp unter basalen Bedingungen (Bueno, Wilkins et al. 2002, Parsons, Wilkins et al. 2003). Jedoch waren CnA $\beta^{-/-}$ -Mäuse nicht in der Lage, eine kardiale Hypertrophie auf mechanische oder neurohumorale Reize auszubilden (Bueno, Wilkins et al. 2002). Ein herzspezifischer, postnataler CnB1-Knockout führte zu einer schweren Kardiomyopathie, die sich in systolischer und diastolischer Dysfunktion äußerte und innerhalb von 7 Monaten zum Tod führte (Schaeffer, Desantiago et al. 2009).

1.6 Myomasp/LRRC39

Myomasp/LRRC39 (Myosin-interacting, M-band-associated, stress-responsive protein/ leucin rich repeat containing 39) ist ein bisher kaum charakterisiertes, dehnungssensitives M-Banden-Protein. Es hat eine Größe von etwa 38,8 kDa und ist evolutionär hochkonserviert. Seine Expression ist besonders hoch in Herz- und Skelettmuskelzellen (Uchida, Schneider et al. 2009, Will, Eden et al. 2010).

Myomasp/LRRC39 konnte als Interaktionspartner einer schweren Kette des Myomesin (MYH7) identifiziert werden. Der genaue Interaktionspartner ist die C-terminale M-Banden-Domäne von MYH7, was die Vermutung nahelegt, dass Myomasp/LRRC39 an der Verankerung von Myosin an der M-Bande beteiligt ist. Will, Eden et al. (2010) konnten des Weiteren zeigen, dass mechanische Belastung die Expression von Myomasp/LRRC39 in Herzmuskelzellen beeinflusst. Sowohl

NRVCM, die in vitro passiver Dehnung ausgesetzt wurden, als auch Herzmuskelzellen von Mäusen, die in vivo durch operative Verengung des Aortenbogens (transverse aortic constriction, TAC) mit einer erhöhten Nachlast behandelt wurden, zeigten eine statistisch signifikante Reduktion der Myomasp/LRRC39-Expression.

Ein Knockdown von Myomasp/LRRC39 in neonatalen Rattenkardiomyozyten durch adenoviralen Transfer einer synthetischen MicroRNA führte zu einer verminderten Expression von Myomesin 1, Myomesin 2, und Myosin heavy chain 7 (Myh7) sowie zu einer Induktion der stresssensitiven Proteine GDF15 und BNP. Ein Luciferaseassay unter Myomasp/LRRC39-Knockdown in vitro zeigte eine Aktivitätsminderung des SRF-Signalweges. Dabei korrelierte das Ausmaß der Inhibierung positiv mit der eingesetzten Menge des Knockdown-Virus (Will, Eden et al. 2010).

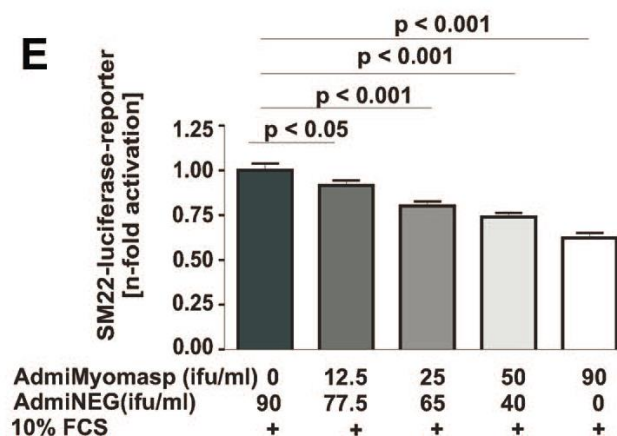


Abbildung 4: SRF-Signaling unter Myomasp/LRRC39-Knockdown. Firefly-Luciferaseassay unter Verwendung des SRF-sensitiven Promotors SM22. Die Zellen wurden mit einem Adenovirus behandelt, der über eine miRNA die Myomasp/LRRC39-Expression verringert (AdmiMyomasp). Als Induktor des SRF-Signalweges wurde Fetales Kälberserum (FCS) verwendet. Aus (Will, Eden et al. 2010).

Um die Auswirkung von Myomasp/LRRC39 auf die Kontraktilität von Kardiomyozyten zu untersuchen, behandelten Will et al. (2010) in vitro Herzgewebe (fibrin-based mini-engineered heart tissue, FBME) mit einem Myomasp/LRRC39-Knockdown-Virus. Hierunter kam es zu einer signifikanten Abnahme von Kontraktionskraft und fractional shortening. Passend hierzu zeigten Myomasp defiziente Zebrafische, denen im Embryonalstadium morpholinomodifizierte Antisenseoligonukleotide gegen Myomasp/LRRC39 injiziert wurden, eine hochgradig eingeschränkte Pumpfunktion. Das fractional shortening war sowohl atrial als auch ventrikulär hochgradig

eingeschränkt. Mittels Immunzytochemie, RNA-in-Situ-Hybridisierung und Histologie fanden sich jedoch keinerlei Hinweise, dass der Myomasp/LRRC39-Knockout die Kardiogenese beeinflusst. Auch transmissionselektronenmikroskopisch zeigten sich keinerlei Unterschiede in der kardialen Ultrastruktur zwischen Knockout-Tieren und Kontrollen. Lediglich in der Transmissionselektronenmikroskopie des Skelettmuskels erschien der Übergang zwischen A- und M-Bande, die sogenannte Bare Zone, schmaler und unschärfer.

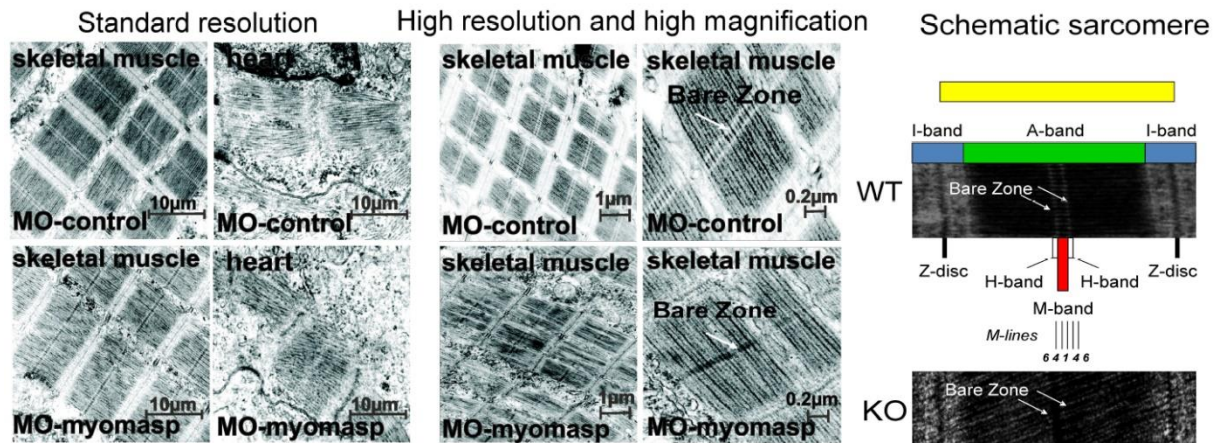


Abbildung 5: Ultrastruktur von Herz- und Skelettmuskel eines Zebrafisches unter Myomasp/LRRC39-Knockout. Transmissionselektronenmikroskopie von Herz- und Skelettmuskel eines Zebrafisches, der mit Morpholino modifizierten Antisensenukleotiden gegen Myomasp/LRRC39 behandelt wurde (jeweils unten), im Vergleich zu einem Kontrolltier (jeweils oben). Im Skelettmuskel des Knockouttieres fand sich eine Schmälerung der hellen Zone („bare zone“, weiße Pfeile) der M-Bande. Aus (Will, Eden et al. 2010).

1.7 Problemstellung dieser Arbeit

Trotz der vielen, hier auszugsweise dargestellten Erkenntnisse, die in den letzten Jahren über die Hypertrophieentstehung in Kardiomyozyten gewonnen wurden, sind viele Regulatoren und Mechanismen noch immer unzureichend geklärt. So ist die Rolle von Myomasp/LRRC39 in diesem Zusammenhang bisher fast gänzlich unerforscht. Die bisher vorliegenden Daten, insbesondere die gravierend eingeschränkte Pumpfunktion durch Knockout von Myomasp/LRRC39 im Zebrafisch (Will, Eden et al. 2010), lassen jedoch vermuten, dass Myomasp/LRRC39 eine bedeutende Rolle spielt für Funktion und Struktur von Kardiomyozyten. Daher wurden für diese Arbeit die folgenden Problemstellungen gewählt:

1.7.1 Charakterisierung des Einflusses von Myomasp/LRRC39 auf die Hypertrophieentstehung in Kardiomyozyten in vitro

Will et al. (2010) konnten zeigen, dass eine verminderte Expression von Myomasp/LRRC39 zu einer Inhibierung des SRF-Signalweges und einer verminderten Expression der sarkomeren Proteine Myh7, Myomesin 1 und Myomesin 2 führt (Will, Eden et al. 2010). Dies legt nahe, dass Myomasp/LRRC39 an der Regulation von Hypertrophie beteiligt ist. Um dies zu untersuchen, sollte insbesondere die Auswirkung einer verminderten oder vermehrten Expression von Myomasp/LRRC39 in neonatalen Rattenkardiomyozyten auf deren Zellgröße sowie die Expression prohypertropher Gene mit und ohne Zugabe neurohumoraler Stimulanzen untersucht werden. Ebenfalls von großem Interesse war, ob Myomasp/LRRC39 neben dem SRF-Signalweg andere Signalwege, wie den Calcineurin-NFAT-Signalweg, beeinflusst.

1.7.2 Phänotypisierung der Myomasp/LRRC39-Knockout-Maus

Vor Anfertigung dieser Arbeit lagen über Myomasp/LRRC39, mit Ausnahme der Knockout-Experimente im Zebrafisch, nur in vitro gewonnene Erkenntnisse vor (Uchida, Schneider et al. 2009, Will, Eden et al. 2010). Um die in dieser einfachen und einfach genetisch zu manipulierenden Spezies gewonnenen Erkenntnisse im Säugetier zu untersuchen, wurde eine Myomasp-Knockout-Maus generiert, die im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert werden sollte. Die Tiere sollten nach funktionellen, morphologischen und molekularbiologischen Gesichtspunkten unter basalen Bedingungen charakterisiert werden, um so Rückschlüsse auf die Funktion von Myomasp/LRRC39 in vivo im Säugetiermodell ziehen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Amersham Hybond-P PVDF Membran	GE Healthcare
Axiovert 40 C Mikroskop	Zeiss
Cell Scraper 16cm 2-position blade	Sarstedt
Cellstar Zellkulturplatten 6-, 12-, 24-well	Greiner Bio one
Centrifuge 5810	Eppendorf
CFX96 Real-Time PCR Detection System	BioRad
Chromatographie-Papier	Whatman
Deckgläser 18mm Durchmesser	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG
Duomax 1030 Plattformschüttler	Heidolph
ECX-F26.M UV-Transilluminator	Peqlab
Faltenfilter 110mm Durchmesser	Schleicher & Schuell
FluorChem Q System	ProteinSimple
Fluoreszenzmikroskop BZ9000	Keyence
Galaxy Ministar Mikrozentrifuge	VWR
Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo Scientific
Heraeus Pico 21 Centrifuge	Thermo Scientific
Horizon 11-14 Gel-Elektrophorese	Life Technologies
Infinite M200Pro Mikroplattenleser	Tecan
Leica Bond-Max Immunhistochemie	Leica Microsystems GmbH
Mini PROTEAN Tetra System	Bio Rad
Multiply- μ Strip 8er Kette Gefäße	Sarstedt
MyCycler Thermal Cycler	Bio Rad
NanoDrop 2000 Spektrophotometer	Thermo Scientific
Neubauer-Kammer	Assistent
Objektträger 76x26x1mm	MARIENFELD
Parafilm	BEMIS
Pasteurpipetten ohne Stopfen	ROTH
Petrischale 35x10 mm	Sarstedt
Pipette Eppendorf-Reference	Eppendorf Research

Pipettenspitzen Biosphere Filter Tip	Sarstedt
Pipettenspitzen, gestopft	Sarstedt
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Power Pac HC	Bio Rad
Power Pac P25 Stromversorgung	Biometra
PP-Mikroplatte 96-well	Greiner-Bio One
RCT Basic Magnetrührer	IKA
Reagiergefäße 0,5ml, 1,5ml, 2ml	Sarstedt
Röhre 15ml, 50ml	Sarstedt
Serologische Pipetten	Sarstedt
Seven Easy pH-Messgerät	Mettler-Toledo
Sonographiegerät	GE Healthcare
Stemi 2000-C Stereomikroskop	Zeiss
Steril-Cult 200 Inkubator	Labotect
Sterilfilter 0,2µm Porengröße	Nalgene Labware
SterilGARD Hood	The Baker Company
T1 Thermoblock Thermal Cycler	Biometra
TE1502S Präzisionswaage	Sartorius
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Titan PCR-Arbeitsstation	Scanlaf
Titramax 100 Plattformschüttler	Heidolph
Ultra-Turrax T25 Dispergiergerät	Janke & Kunkel
Vacunsafe Absaugsystem	Integra Biosciences
Variomag Poly Magnetrührer	Thermo Scientific
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Zellkulturflaschen 75cm ² , 175cm ²	Sarstedt

2.1.2 Chemikalien

Agarose	Biozym Scientific GmbH
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	BD Biosciences
Albumin Fraktion V aus Rinderserum	Merck KGaA
Ampicillin	Sigma-Aldrich
CM-H2DCFDA für ROS-Messung	Invitrogen
DAPI	Sigma-Aldrich

DEPC	Sigma-Aldrich
DMEM	PAA Laboratories
DMSO	Sigma-Aldrich
DNA Loading Dye 6x	Fermentas
DreamTaq 10x Puffer grün	Thermo Scientific
DynaBeads Protein G	Novex by Life Technologies
EDTA	Serva Electrophoresis
Elution Buffer	Qiagen
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Invitrogen
FCS Gold	PAA Laboratories
Fluor Preserve Reagent	Calbiochem
Formamid	Sigma-Aldrich
GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder	Fermentas
Glukose	Sigma-Aldrich
Glutaraldehyd	Carl Roth
HEPES	Carl Roth
iQ Multiplex 2000 Reagent	Bio-Rad
Isofluran	Baxter
Kollagen I - Lösung aus Rinderhaut	BD Biosciences
Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen
Methanol	Carl Roth
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumhydroxid	AppliChem
NCS (Newborn Calf Serum)	PAA Laboratories
PageRuler Plus Protein Ladder	Thermo Scientific
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen/GIBCO
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth
Propidiumiodid (PI)	Carl Roth
Protein-Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad
QIAzol Lysis Reagenz	Qiagen
SDS	Serva Electrophoresis
Spectinomycin	Sigma-Aldrich
TEMED 99% p.a. Elektrophorese	ROTH

TNFalpha Recombinant Protein Ratte	Life Technologies
Tris-Cl	Carl Roth
Triton X	Serva Electrophoresis
TRizol-Reagenz	Invitrogen
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich
Yeast-Extract	BD Biosciences

2.1.3 Enzyme

Collagenase Typ 2	Worthington/Cellsystems
Complete-Proteinase Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics
Desoxyribonuclease I (DNase I)	Sigma-Aldrich
DreamTaq DNA-Polymerase	Thermo Scientific
Phosphatase-Inhibitor 2 und 3	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Invitrogen
0,25% (w/v) Trypsin-EDTA-Lösung	Invitrogen/GIBCO

2.1.4 Antikörper

Antikörper für Western Blot (Erstantikörper):

- Anti-cardiac-Actin, Maus, monoklonal, Sigma A9357, 1:2000 in TBST
- Anti-LRRC39, Kaninchen, polyklonal, Sigma HPA028443, 1:400 in TBST
- Anti-Myh6, Ziege, polyklonal, Santa Cruz sc-168676, 1:200 in TBST
- Anti-Myh7, Maus, monoklonal, Sigma M8421, 1:5000 in TBST
- Anti-Rcan1.4, Kaninchen, polyklonal, 1:500 in TBST
- Anti- α -Tubulin, Maus, monoklonal, Sigma T5168, 1:8000 in TBST

Antikörper für Western Blot (Zweitantikörper):

- Anti-mouse-IgG, Ziege, polyklonal, HRP-konjugiert, Santa Cruz SC-2302, 1:10000 in TBST
- Anti-rabbit-IgG, Esel, polyklonal, HRP-konjugiert, Santa Cruz SC-2305, 1:10000 in TBST
- Anti-goat-IgG, Esel, polyklonal, HRP-konjugiert, Santa Cruz SC-2304, 1:10000 in TBST

Antikörper für Immunzytochemie (Erstantikörper):

- Anti- α -Actinin, Maus, monoklonal, Sigma A7811, 1:400 in 2,5% BSA in PBS

Anti-NBR1, Kaninchen, monoklonal, Cell signaling #9891, 1:200 in 2,5% BSA in PBS

Anti-SRF, Kaninchen, monoklonal, Cell signaling #5147, 1:100 in 2,5% BSA in PBS

Anti-P62 (=SQSTM1), Maus, monoklonal, Abcam ab56416, 1:400 in 2,5% BSA in PBS

Anti-Murf2, Ziege, polyklonal, Abcam ab4387, 1:100 in 2,5% BSA in PBS

Antikörper für Immunzytochemie (Zweitantikörper):

Anti-goat-IgG, Esel, polyklonal, FITC, Dianova 705-095-003, 1:100

Anti-goat-IgG, Esel, polyklonal, Cy3, Dianova 705-165-003, 1:200

Anti-goat-IgG, Esel, polyklonal, AF 546, Life Technologies, A-11056, 1:100

Anti-mouse-IgG, Schaf, polyklonal, Cy3, Dianova 515-165-003, 1:1000

Anti-mouse-IgG, Esel, polyklonal, AF 546, Life Technologies A10036, 1:1000

Anti-mouse-IgG, Schaf, polyklonal, FITC, Dianova 515-095-003, 1:100

Anti-rabbit-IgG, Esel, polyklonal, Cy3, Dianova 711-165-152, 1:200

Anti-rabbit-IgG, Esel, polyklonal, FITC, Dianova 711-095-152, 1:100

Anti-rabbit-IgG, Huhn, polyklonal, AF 647, Life Technologies A-21443 1:100

2.1.5 Kits

DC Protein Assay

Bio-Rad

Dual-Luciferase Reporter Assay System

Promega

Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent

GE Healthcare

Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG

Invitrogen

Superscript III First Strand Kit

Invitrogen

2.1.6 Oligonukleotide

2.1.6.1 Oligonukleotide für Genotypisierungs-PCR

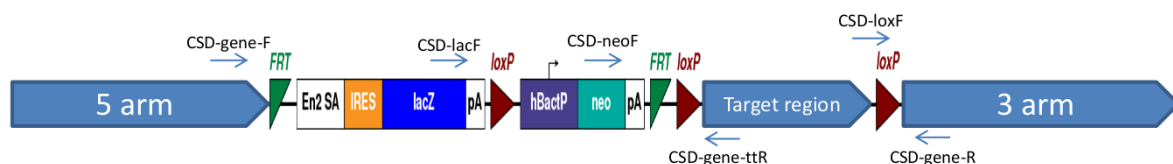


Abbildung 6: Primerstrategie zur Genotypisierung der Myomasp/LRRC39-Knockout-Maus. Abb. übernommen von KOMP PCR Design, UC Davis, KOMP Repository, Knockout Mouse Project

CSD-neoF

GGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCG

CSD-LRRC39-F GGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCG
 CSD-LRRC39-ttR ACCCCATAAACAGCATACCCCATCC

Wildtyp- und Knockoutallel wurden durch die Kombination oben genannter Oligonukleotide wie folgt nachgewiesen:

Wildtypallel forward-Primer: CSD-LRRC39-F
 reverse-Primer: CSD-LRRC39-ttR
 Knockout-Allel forward-Primer: CSD-neoF
 reverse-Primer: CSD-LRRC39-ttR

2.1.6.2 Oligonukleotide für SybrGreen-qRT-PCR

Nppa	Ratte	forward	AAACTGAGGGCTCTGCTCGC
		reverse	GGCTGTTATCTTCGGTACCGGAAG
Nppb	Ratte	forward	TCCGGATCCAGGAGAGACTTCG
		reverse	TCCTAAAACAACCTCAGCCCGTC
RPL32	Ratte	forward	GGTGGCTGCCATCTGTTTTACG
		reverse	CCGCACCCTGTTGTCAATGC

2.1.6.3 Oligonukleotide für Multiplex-qRT-PCR

Nppa	Maus/Ratte	forward	GGAGCAAATCCTGTGTACAGTG
		reverse	ACCTCATCTTCTACCGGCAT
		Sonde	TGATGGATTTCAAGAACCTGCTAGACCA
Nppb	Maus	forward	ACAAGATAGACCGGATCGGA
		reverse	AGCCAGGAGGTCTTCCTACA
		Sonde	TCAGTGC GTTACAGCCCAAACGA
Nppb	Ratte	forward	AGAAGATAGACCGGATCGGC
		reverse	AGCCAGGAGGTCTTCCTAAA
		Sonde	TCAGCCCGTCACAGCCCAAAGCGA
RPL32	Maus/Ratte	forward	GGCACCAGTCAGACCGAT
		reverse	CGATGTTGGGCATCAGGA
		Sonde	TTCCGCCAGTTTCGCTTAATTTTCACATATCG

2.1.7 Puffer und Lösungen

ADS-Puffer (10x):	1,16 M	NaCl
	197 mM	HEPES
	94 mM	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O
	55,5 mM	Glukose
	53,6 mM	KCl
	8,3 mM	MgSO ₄ , pH 7,4, steril filtriert
PBS:	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	4,3 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,47 mM	KH ₂ PO ₄ ,
		pH 7,4, autoklaviert
Laufpuffer für SDS-PAGE (10x):	250 mM	Tris
	1,9 M	Glycin
	1% (w/v)	SDS
		pH 8,3
Proben-Puffer nach Laemmli (4x):	250 mM	Tris pH 6,8
	5% (w/v)	SDS
	40% (v/v)	Glyzerin
	0,005% (w/v)	Bromphenolblau
	10% (v/v)	2-Mercaptoethanol
RIPA-Puffer:	1% (v/v)	NP-40
	1% (w/v)	Natriumdesoxycholat
	0,1% (w/v)	SDS
	150 mM	NaCl
	10 mM	Natriumphosphat-Puffer ad pH 7,2
	1 mM	DTT
Sammelgelpuffer für SDS-PAGE:	500mM	TRIS
	0,4%	SDS
		pH 6,8
TAE-Puffer (50x):	3 M	Tris-Acetat

	0,05 M	EDTA
	pH 8,3	
TBS-Lösung:	100 mM	Tris-Cl
	0,9% (w/v)	NaCl
	pH 7,5	
Transferpuffer für Western-Blotting:	20% (v/v)	Methanol
	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	0,037%(w/v)	SDS
Trenngelpuffer für SDS-PAGE:	1,5 mM	Tris
	0,4%	SDS
	pH 8,8	

2.1.8 Medien

Medium zum Anwachsen von Kardiomyozyten aus neugeborenen Ratten:

	DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 110 mg/l Natriumpyruvat (Fertigmedium)	
10% (v/v)	FCS Gold	
100 U/l	Penicillin G	
100 µg/ml	Streptomycin	
2mM	L-Glutamin	

Medium zur Serumdeprivation von Kardiomyozyten aus neugeborenen Ratten:

	DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 110 mg/l Natriumpyruvat (Fertigmedium)	
100 U/l	Penicillin G	
100 µg/ml	Streptomycin	
2 mM	L-Glutamin	

Medium zur Kultur von HEK-293-Zellen:

	DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 110 mg/l Natriumpyruvat (Fertigmedium)	
10% (v/v)	FBS	
100 U/l	Penicillin G	
100 µg/ml	Streptomycin	
2 mM	L-Glutamin	

2.1.9 Versuchstiere

Neugeborene Ratten vom Wistar-Stamm:

Um neugeborene Ratten vom Wistar-Stamm zu erhalten, wurden bei Charles-River Laboratories männliche und weibliche Wistar-Ratten bestellt und in der Zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel verpaart.

Myomasp/LRRC39-Knockout-Maus:

Die Myomasp/LRRC39-Knockout-Maus wurde an der University of California, Davis im Rahmen des Knockout Mouse Project unter Verwendung der Knockout-First-Strategie generiert. Diese Methode beruht im Gegensatz zur konventionellen Knockoutstrategie nicht auf der Deletion eines Gens oder eines Genabschnittes, sondern in der Insertion einer Kasette, die die Transkription eines Gens behindert. Das Gen selbst bleibt intakt (Testa, Schaft et al. 2004). Im Fall der Myomasp/LRRC39-Knockout-Maus wurde vor Exon 5 des Myomasp/LRRC39-Gens eine Spliceakzeptorstelle eingefügt, die die Prozessierung der hnRNA behindert. So wird verhindert, dass funktionelles Myomasp/LRRC39 durch die Zelle synthetisiert wird.

2.1.10 Adenoviren

Für eine Überexpression von Myomasp/LRRC39 wurde ein Adenovirus verwendet, das amplifizierte Myomasp/LRRC39-cDNA aus Ratten enthielt (AdMyomasp). Als Kontrolle wurde ein Adenovirus verwendet, das cDNA für eine bakterielle Betagalactosidase (LacZ) enthielt (AdLacZ).

Für den Knockdown wurde ein Adenovirus verwendet, das eine Micro-RNA enthielt, welche die Translation der Myomasp/LRRC39-mRNA verhinderte und dessen Degradierung förderte (miR11). Als Kontrolle diente ein Adenovirus mit einer Micro-RNA, welche mit keinem bekannten Säugetiergen interagiert.

Sämtliche Viren wurden von Will, Eden et al. 2010 generiert und lagen für diese Arbeit in der Arbeitsgruppe vor. Eine ausführliche Beschreibung der Methodik ist der Publikation zu entnehmen.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation neonataler Rattenkardiomyozyten

2.2.1.1 Prinzip/ Hintergrund

Die Isolation von Kardiomyozyten aus neonatalen Rattenherzen besteht im Wesentlichen aus zwei Schritten: der Lösung der Zellen aus dem Zellverband und der anschließenden selektiven Isolation der Kardiomyozyten aus der Zellsuspension.

Zur Auflösung des Zellverbandes muss das Herzgewebe zunächst mechanisch mit Hilfe einer Schere zerkleinert werden. Anschließend wird es einer kollagenasehaltigen Verdauung zugeführt. Die Kollagenase spaltet Kollagen und bewirkt somit eine Auflösung der Extrazellulärmatrix, ohne die Zellen selbst zu beeinträchtigen. Der Vorgang kann beschleunigt werden, wenn das Gewebe durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren zusätzlich Scherkräften ausgesetzt wird.

Die so gewonnene Zellsuspension enthält neben den Kardiomyozyten noch andere Zellarten, wie zum Beispiel Erythrozyten und Fibroblasten. Um die Kardiomyozyten zu isolieren, wird eine Dichtegradientenzentrifugation eingesetzt. Der Gradient wird mit Hilfe von Percoll erzeugt, das aus kolloidalen Kieselerdepartikeln besteht, die mit Polyvinylpyrrolidon ummantelt sind. Durch die Zugabe unterschiedlicher Mengen ADS-Puffer zu Percoll können zwei Phasen erzeugt werden, zwischen denen sich die Kardiomyozyten unter Zentrifugation ansammeln. Aus dieser Interphase können sie entnommen und für Zellkulturen verwendet werden.

2.2.1.2 Vorgehen

2.2.1.2.1 Präparation der Rattenherzen

Für die Isolation der NRVCN wurden ein bis drei Tage alte Wistar Ratten verwendet. Nach kurzem Eintauchen von Kopf und Thorax in 80%-igen Ethanol wurden die Ratten durch Dekapitation getötet und der Thorax durch eine links paramediane Thorakotomie eröffnet. Unter leichtem Druck auf den Bauch konnte das Herz mit einer Schere entnommen und in ADS-Puffer auf Eis überführt werden. Unter einer Sterilwerkbank wurden anschließend die Vorhöfe und Gefäße sowie eventuell vorhandene Lungenreste von den Herzen entfernt, die Herzen in frischen ADS-Puffer überführt, mit einer Schere zerkleinert und dem Verdau zugeführt.

2.2.1.2.2 Gewebeverdau

Für den Verdau wurden die zuvor zerkleinerten Herzen in Verdaulösung gegeben und auf 75cm²-Flaschen verteilt. Diese wurden für 20 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und verworfen, das Gewebe mit frischer Verdaulösung versetzt, erneut für 20 Minuten inkubiert und anschließend mehrfach auf- und abpipettiert. Der Überstand wurde durch einen Sterilfilter in ein 50ml-Tube pipettiert und mit 10ml NBCS versetzt. Das restliche Gewebe in der 75cm²-Flasche wurde erneut verdaut, auf- und abpipettiert und der Überstand in ein 50ml-Tube überführt. Dieser Vorgang wurde sooft wiederholt, bis keine größeren Gewebebestandteile mehr sichtbar waren (in der Regel drei bis vier Verdauschritte).

Die 50ml-Tubes wurden für fünf Minuten bei 1000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert, die resultierenden Zellpellets in 10ml NBCS resuspendiert und in ein bis zwei 50ml-Tubes im Inkubator bei 37°C gesammelt. Nach Abschluss der Verdauschritte wurde die gepoolte Zellsuspension erneut bei 1000 rpm und 37°C zentrifugiert und in ADS resuspendiert.

2.2.1.2.3 Kardiomyozytenisolation

Zur Isolation der Kardiomyozyten aus der Zellsuspension wurde ein Percoll-Gradient verwendet: Hierfür wurden durch Zugabe unterschiedlicher Mengen ADS zu Percoll in einem Tube zwei Phasen hergestellt: die mit Phenolrot gefärbte Oberphase und die farblose Unterphase. Auf diesen Gradienten wurde vorsichtig die Zellsuspension gegeben und das Tube für 30 Minuten bei 2400 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend zeigten sich drei Phasen: Zuoberst das ADS der Zellsuspension, darunter die ursprüngliche, rote Oberphase und unten die Unterphase. Das ADS wurde entfernt, die kardiomyozytenhaltige Interphase in ein neues Tube gegeben, mit ADS auf 50ml aufgefüllt und bei 1000rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Die Pellets wurden gepoolt, erneut mit ADS gewaschen und schließlich in FCS-haltigem Kardiomyozytenmedium resuspendiert.

2.2.1.2.4 Auszählen

Für die Auszählung der Kardiomyozyten wurden 150µl der Zellsuspension mit 150µl Trypanblau vermischt. Von dieser Mischung wurden 10µl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und alle nicht angefärbten, also vitalen Zellen gezählt. Aus

der so ermittelten Zellzahl konnte die Kardiomyozytenkonzentration der Zellsuspension errechnet und die Zellen in gewünschter Konzentration auf Zellkulturplatten ausgebracht werden.

2.2.2 Vermehrung von Adenoviren in HEK-293T-Zellen und Titerbestimmung

2.2.2.1 Prinzip/ Hintergrund

Adenoviren werden als laborchemische Vehikel verwendet, um die Expression verschiedener Gene in eukaryotischen Zellen zu beeinflussen. Für die kontrollierte Vermehrung der Adenoviren finden HEK-293T-Zellen Verwendung. HEK-293-Zellen entstammen humanem embryonalen Nierengewebe (human embryonic kidney, HEK), das mit DNA-Teilen des menschlichen Adenovirus 5 transformiert wurde. Die HEK-293T-Zellreihe exprimiert zusätzlich das SV40 large T-antigen, das für die Replikation von Adenoviren essentiell ist. HEK-293A-Zellen hingegen exprimieren das T-Antigen nicht, eine Replikation von Adenoviren, die das T-Antigen nicht herstellen können, ist in diesen Zellen daher nicht möglich. Diese Zellreihe wird daher zur finalen Titerbestimmung der generierten Adenoviren verwendet.

2.2.2.2 Vorgehen

2.2.2.2.1 Vermehrung von Adenoviren

Die HEK-293T-Zellen wurden in einer 175cm²-Flasche ausgesät und so lange bei 37°C inkubiert, bis sie eine Konfluenz von etwa 80% erreichten. Anschließend wurden sie mit dem zu amplifizierenden Adenovirus infiziert. Nach 48 bis 72 Stunden Inkubation und regelmäßiger durchlichtmikroskopischer Begutachtung wurden die Zellen durch leichtes seitliches Klopfen gegen die Flaschen vom Boden gelöst, mitsamt dem Medium in 50ml-Tubes überführt und 10 Minuten bei 1500g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 2ml PBS resuspendiert und in ein 2ml-Cup überführt. Zur Lysierung der Zellen und Freisetzung des Virus wurde dieses in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei 37°C unter leichtem Schütteln aufgetaut. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, das Tube erneut 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand in 30 oder 50µl-Einheiten aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

2.2.2.2.2 Titerbestimmung von Adenoviren

Auf eine 24-Well-Platte wurden pro Well 300.000 HEK-293A-Zellen ausgesät. Aus einem der Adenovirusaliquots wurde eine Verdünnungsreihe von 10^{-2} bis 10^{-7} hergestellt und jeweils 2 Wells mit einer Verdünnungsstufe infiziert. Nach einer Inkubation für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 wurde das Medium abgenommen, die Zellen für einige Minuten unter einer Sterilwerkbank getrocknet und über zehn Minuten mit -20°C kaltem Methanol fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1% BSA in PBS gewaschen, für eine Stunde mit einem FITC-gekoppelten Anti-Hexon-Antikörper inkubiert, erneut mit 1% BSA in PBS gewaschen und schließlich mit PBS überschichtet. Unter einem Fluoreszenzmikroskop wurden die infizierten Zellen aus 10 Gesichtsfeldern eines Wells bei 200-facher Vergrößerung gezählt, addiert und das arithmetische Mittel gebildet. Der Mittelwert wurde mit dem Faktor 313 (Gesichtsfelder pro Well bei 200-facher Vergrößerung) multipliziert und durch das Produkt aus Verdünnungsfaktor, bei dem ausgezählt wurde, sowie Volumen der verdünnten Viruslösung dividiert. Das Ergebnis ergab die sogenannten infectious units pro ml (ifu/ml), also die Konzentration der infektiösen Viruspartikel.

2.2.3 Hypertrophieinduktion in NRVCM unter Überexpression und Knockdown von Myomasp/LRRC39

2.2.3.1 Prinzip/ Hintergrund

Um die Funktion eines Proteins zu untersuchen, ist es hilfreich, die Folgen einer Steigerung oder Verringerung seiner Expression zu betrachten. Um dies zu erreichen, wurden für diese Arbeit Adenoviren eingesetzt, die als Vektoren für die Übertragung von RNA in neonatale Rattenkardiomyozyten dienen.

Für eine Überexpression enthalten solche Viren cDNA, die für das Protein, das überexprimiert werden soll, kodiert. Die cDNA wird von der Wirtszelle translatiert, sodass das Protein vermehrt gebildet wird. Häufig ist die mRNA so modifiziert, dass das Protein eine Markierung trägt, beispielsweise einen V5- oder HA-Tag, der einen zusätzlichen, spezifischen Nachweis des überexprimierten Proteins mit spezifischen Antikörpern ermöglicht. So kann auch zwischen exogenem/adenoviral generiertem und endogenem Protein unterschieden werden. Da bereits die Infektion selbst und die vermehrte Proteinproduktion unabhängig von der Art des überexprimierten Proteins einen Einfluss auf die Zelle hat, werden die Zellen, die als Kontrolle dienen,

ebenfalls mit einem Virus infiziert. Dieser trägt cDNA, die für die β -Galaktosidase (kodiert durch das LacZ-Gen) kodiert, welche keine Auswirkung auf die Regulation von Hypertrophie in Herzmuskelzellen besitzt (Will, Eden et al. 2010).

Um eine reduzierte Expression eines Proteins zu bewirken, werden Viren eingesetzt, die Mikro-RNAs (miRNA, miR) enthalten. miRNAs sind kurze, nicht kodierende RNAs mit einer Größe von etwa 22 Nukleotiden. Sie kommen natürlich vor und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation vieler Gene, indem sie spezifisch an mRNAs binden und so deren Translation hemmen oder ihren Abbau beschleunigen (Ruvkun 2001). Als Kontrolle werden hier Zellen verwendet, die mit einem Virus infiziert werden, die eine „miRneg“ tragen. Es handelt sich hierbei um eine Mikro-RNA, die keinen bekannten Einfluss auf die Translation oder den Abbau von mRNAs besitzt (Will, Eden et al. 2010). Um Hypertrophie in Kardiomyozyten in vitro zu induzieren und so die Auswirkung der Überexpression oder des Knockdowns eines Gens auf diese zu untersuchen, können verschiedene Substanzen, wie zum Beispiel Angiotensin, Isoprenalin oder Phenylephrin verwendet werden. Diese Substanzen bewirken über verschiedene Signalwege die vermehrte Expression vieler Proteine insbesondere des Zytoskeletts und des kontraktiven Apparates, was in einer Zunahme der Zellgröße resultiert.

2.2.3.2 Vorgehen

Tag 0:

Die isolierten, neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden auf Zellkulturplatten in FCS-haltigem Medium ausgebracht. Größe und Anzahl der Wells sowie die Zellzahl pro Well richteten sich nach dem Verwendungszweck:

Tabelle 1: NRVCM-Kulturplatten

Verwendungszweck	Zellkulturplatte	Zellen/well	Medium [ml/well]
Proteinisolation	6-well	800.000	2
RNA-Isolation	6-well	750.000	2
Zellgrößenbestimmung/ Immunzytochemie	12-well	180.000	1
Sonstige Immunzytochemie	12-well	300.000	1

Tag 1:

An Tag 1 wurden die Zellen zunächst lichtmikroskopisch beurteilt. Hierbei wurde auf die homogene Verteilung der Zellen auf den Platten, die Vitalität der Zellen und eine eventuelle Kontamination mit Bakterien geachtet. Diese lichtmikroskopischen Kontrollen wurden an allen weiteren Tagen der Zellkultur wiederholt. Anschließend erfolgte die Infektion der Zellen mit Adenoviren. Hierzu wurde das Medium von den Zellen entfernt, die Zellen mit 37°C warmem PBS gewaschen und virushaltiges, serumfreies Medium auf die Zellen gegeben. Für die Überexpression (AdMyomasp/LRRC39/ AdLacZ) wurden 20 ifu/Zelle, für den Knockdown (miR111/ miRneg) 100ifu/Zelle verwendet.

Tag 2:

An Tag 2, 24 Stunden nach der Infektion, wurde das Medium erneut von den Zellen entfernt und durch frisches Medium ersetzt. In jeweils der Hälfte der Wells, die mit demselben Virus infiziert worden waren, enthielt das Medium 50µM Phenylephrin, bei den übrigen Zellen wurde das identische Volumen destilliertes Wasser hinzugefügt.

Tag 4:

Nach weiteren 48 Stunden Inkubation wurde an Tag 4 das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und der Proteinisolation (s. 2.2.6), RNA-Isolation (s. 2.2.4) oder Immunhistochemie (s. 2.2.10) zugeführt.

2.2.4 RNA-Isolation aus NRVCN und adulten Mausherzen

2.2.4.1 Prinzip/ Hintergrund

Die Isolation von RNA aus Zell- oder Gewebelysaten beruht im Wesentlichen auf der Löslichkeit von Ribonukleinsäuren in Wasser und ihrer Unlöslichkeit in Ethanol und Isopropanol. So werden Wasser und wässrige Lösungen verwendet, um RNA zu lösen und von anderen Molekülen zu trennen und Ethanol/ Isopropanol, um RNA auszufällen und zu konzentrieren. Bevor die so isolierte RNA der quantitativen Realtime-PCR zugeführt werden kann, muss außerdem die aufgrund ihres ähnlichen Aufbaus und Lösungsverhaltens ebenfalls isolierte genomische DNA entfernt werden. Dies geschieht mit Hilfe einer DNase, eines Enzyms, das DNA abbaut. RNA hingegen bleibt von diesem Enzym unberührt.

Da RNasen ubiquitär vorhanden sind, muss bei allen Schritten der RNA-Isolierung streng darauf geachtet werden, dass alle verwendeten Reagenzien und Materialien RNase-frei sind. Daher werden ausschließlich als RNase-frei deklarierte Materialien verwendet und Reagenzien RNase-Inhibitoren, wie zum Beispiel DEPC, zugesetzt. Zudem werden alle Versuche bei 4°C bzw. auf Eis durchgeführt, um residuelle RNasen zu hemmen.

2.2.4.2 Vorgehen

2.2.4.2.1 RNA-Isolation aus NRVCM

Die NRVCM wurden an Tag 4 (s. 2.2.3.2) mit PBS gespült, mit 1ml Trizol pro Well überschichtet und das Well durch auf- und abpipettieren gespült. Hierdurch kam es zur Destruktion der Zellmembranen und zur Freisetzung der Nukleinsäuren. Das Zelllysat wurde anschließend in ein 1,5ml Cup überführt und 200µl Chloroform hinzugefügt. Das Cup wurde geschüttelt, für zwei bis drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 15 Minuten bei 12000g und 4°C zentrifugiert. Die wässrige und damit RNA-haltige Oberphase wurde in ein neues Cup überführt, zum Ausfällen der Nukleinsäuren mit 500µl Isopropanol geschüttelt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (alternativ eine Stunde bis über Nacht bei -20°C). Es erfolgte erneut eine Zentrifugation (12000g, 4°C, zehn Minuten). Der Überstand wurde verworfen und das resultierende Pellet in 1ml 75% Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (7500g, 4°C, fünf Minuten) wurde das Pellet getrocknet und in 40µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

2.2.4.2.2 RNA-Isolation aus adulten Mausherzen

Nach Entnahme der Mausherzen (s. 2.2.14) wurde jeweils ein Teil der Herzen in 1ml Trizol gegeben und mechanisch mit Hilfe des Ultra-Turrax® Dispergiergeräts zerkleinert. Alle weiteren Schritte entsprachen der RNA-Isolation aus NRVCM (s. 2.2.4.2.1). Es wurde lediglich aufgrund der wesentlich höheren RNA-Ausbeute im letzten Schritt das Pellet nicht in 40µl, sondern 200µl RNase-freiem Wasser gelöst.

2.2.4.2.3 Degradierung der genomischen DNA

Die in 40µl destilliertem Wasser gelöste RNA wurde vermischt mit jeweils 5µl DNase I und zugehörigem 10x Puffer und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mit DEPC-H₂O auf 100µl aufgefüllt, 100µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol hinzugefügt und kräftig geschüttelt. Nach einer Zentrifugation bei

14000rpm bei 4°C für zehn Minuten wurde die Oberphase abgenommen, in ein neues Cup überführt und 300µl Ethanol und 10µl Natriumacetat hinzugefügt. Die Fällung erfolgte für 30 Minuten bis über Nacht bei -20°C. Nach erneuter Zentrifugation bei 14000rpm bei 4°C für 60 Minuten wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 500µl 75% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (14000rpm, 4°C, fünf Minuten), für etwa 15 Minuten getrocknet und in 11µl DEPC-Wasser aufgenommen. Die so isolierte RNA wurde entweder bei -80°C gelagert oder direkt der cDNA-Synthese zugeführt.

2.2.5 cDNA-Synthese und quantitative Realtime-PCR

2.2.5.1 Prinzip/ Hintergrund

RNA eignet sich aufgrund ihrer Instabilität und hohen Anfälligkeit für die ubiquitär vorhandenen RNasen schlecht für quantitative Analysen. Daher erfolgt in der Regel die Umschreibung in die wesentlich stabilere DNA. Dieser Prozess wird als reverse Transkription, das Produkt als cDNA bezeichnet.

Da die cDNA einer quantitativen Analyse zugeführt werden soll, müssen aus allen Versuchsansätzen identische Mengen RNA in cDNA umgeschrieben werden. Daher muss zunächst die RNA-Konzentration in den Proben bestimmt werden. Hierfür wird mittels Photometrie die Absorption von Licht mit einer Wellenlänge von 260nm, dem Absorptionsmaximum von RNA, bestimmt. Da die Absorption proportional zur der RNA-Konzentration ist, kann aus der Absorption die RNA-Konzentration errechnet werden. Ist die Konzentration bekannt, können aus allen Proben identische Mengen RNA in cDNA umgeschrieben werden.

Zur quantitativen Analyse der cDNA wird die quantitative Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) verwendet. Dieses Verfahren beruht auf der selektiven Vervielfältigung spezifischer Abschnitte der cDNA, den sogenannten Targets, durch eine hitzestabile Polymerase, welche aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird (daher kurz Taq-Polymerase). Die zu amplifizierende Sequenz wird bestimmt durch sogenannte Primer, etwa 20bp lange Oligonukleotide, die an spezifische Sequenzen der cDNA binden und als Startpunkt für die Polymerase dienen.

Jede PCR besteht aus drei Phasen: 1. Denaturierung, 2. Primerhybridisierung und 3. Elongation. In der ersten Phase werden die einzelnen Stränge der doppelsträngigen DNA durch Erhitzen auf etwa 95°C voneinander getrennt. In der zweiten Phase erfolgt die Anlagerung der Primer an die cDNA bei etwa 60°C. Die genaue Temperatur ist abhängig von der Beschaffenheit der Primer, insbesondere der Länge und des GC-Gehalts. In der dritten Phase erfolgt bei etwa 70°C die Elongation durch die Polymerase. Dieser Zyklus wird 40mal durchlaufen, sodass eine 2⁴⁰-fache Amplifikation erzielt werden kann.

Im Gegensatz zu der nicht quantitativen PCR wird bei der quantitativen Realtime-PCR nach jedem Elongationsschritt die cDNA-Menge gemessen. So kann aus dem Zyklus, bei dem die gemessene cDNA-Menge einen definierten Wert überschreitet (der sogenannte Ct-Wert), auf die ursprünglich in der Probe vorhandene cDNA-Menge geschlossen werden. Für die Detektion der cDNA-Menge in jedem Zyklus stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Eine Möglichkeit stellt die Verwendung eines Farbstoffes dar, der bei Bindung an doppelsträngige DNA fluoresziert. Da die Bindung unspezifisch erfolgt, kann bei dieser Methode nur ein Target in einem Ansatz untersucht werden.

Sollen mehrere Targets in einem Ansatz quantifiziert werden, wird die Multiplex-qRT-PCR verwendet. Hierbei werden sogenannte Probes in die Reaktion gegeben. Diese binden spezifisch innerhalb der zu amplifizierenden Sequenz und tragen einen Fluoreszenzfarbstoff, dessen Lichtemission jedoch zunächst durch einen sogenannten Quencher inhibiert wird. Erst wenn Quencher und Farbstoff voneinander getrennt werden, kann die Lichtemission detektiert werden. Diese Trennung kann zum Beispiel während der Elongation durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase erzielt werden.

Die Auswertung der qRT-PCR erfolgt nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Livak and Schmittgen 2001). Mit dieser Methode wird die Expression eines Targets im Verhältnis zu einem sogenannten house-keeping gene errechnet. Letzteres dient als interne Kontrolle und gleicht Schwankungen in der Pipettiergenauigkeit aus. Es sollte leicht zu detektieren und seine Expression nicht von den Versuchsbedingungen, dem Zellzyklus, der Gewebeart oder sonstigen Faktoren abhängig sein.

2.2.5.2 Vorgehen

2.2.5.2.1 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde von jeder Probe 1 µg RNA in maximal 12 µl DEPC-H₂O mit 0,5 µl Random Hexamer Primer und 1 µl dNTPs vermischt und mit DEPC-H₂O auf 13,5 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde für 5 Minuten bei 65°C, dann für mindestens 1 Minute auf Eis inkubiert. Anschließend wurde in jeden Ansatz 4 µl 5x First Strand RT-Buffer, 1 µl DTT, 1 µl RNaseOUT und 0,5 µl SuperScript III RT hinzugefügt und der Ansatz durch vorsichtiges auf- und abpipettieren gemischt. Dann erfolgte die Inkubation im T1 Thermoblock Thermal Cycler von Biometra nach folgendem Schema: 10 Minuten bei 25°C, 60 Minuten bei 50°C, 15 Minuten bei 70°C. Für alle Schritte wurden RNase-freie Materialien verwendet.

2.2.5.2.2 Quantitative realtime-PCR

Zunächst wurde ein Mastermix aus 2x SybrGreenER Mastermix bzw. BioRad iQ Multiplex Powermix, Primern und dH₂O hergestellt. Im Falle einer SybrGreen-qRT-PCR wurde für jedes Target sowie die endogene Kontrolle ein eigener Mastermix hergestellt.

SybrGreen-Mastermix pro Well:

2x SybrGreenER Mastermix:	10 µl
dH ₂ O:	7,2 µl
Primer forward (10 µM):	0,4 µl
Primer reverse (10 µM):	0,4 µl

Multiplex-Mastermix pro Well:

BioRad iQ Multiplex Powermix:	10 µl
RPL32 Mix	0,5 µl
Nppa Mix:	0,5 µl
Nppb Mix:	0,5 µl
Rcan1.4 oder Myh7 Mix:	0,5 µl
dH ₂ O:	6 µl

Ein Mix bestand jeweils aus forward Primer, reverse Primer und probe im Verhältnis 1:1:2.

Für die Multiplex-PCR wurden die Farbstoffe FAM (Nppa), HEX (Nppb), TexasRed (RPL32), Cy5 (Maus-Rcan1.4 oder Myh7) und Cy5.5 (Ratten-Rcan1.4) verwendet. Von dem Mastermix wurden jeweils 18µl in ein Well einer 96-Well Microtiterplatte gegeben und 2µl cDNA mit einer Konzentration von 5ng/µl hinzugefügt. Dabei wurde jede cDNA-Probe in Triplikaten gemessen. Zusätzlich wurde zur Detektion einer möglichen Kontamination mit Nukleinsäuren eine no-template-control (NTC) angesetzt, indem in ein weiteres Well der Mastermix und anstatt cDNA 2µl dH₂O pipettiert wurden. Die Microtiterplatte wurde kurz abzentrifugiert und in das CFX96 Real-Time PCR Detection System von BioRad gegeben. Folgende Programme wurden verwendet:

SybrGreen qRT-PCR:

Initiale Denaturierung:	95°C	2 Minuten	
Denaturierung:	95°C	5 Sekunden	← 39x
Annealing/Elongation:	60°C	30 Sekunden	
Detektion			

Multiplex qRT-PCR:

Initiale Denaturierung:	95°C	2 Minuten	
Denaturierung:	95°C	15 Sekunden	← 39x
Annealing/Elongation:	60°C	45 Sekunden	
Detektion			

Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Hierfür wurde zunächst der Mittelwert der C_t Werte eines Triplikates bestimmt. Lag die Standardabweichung eines Triplikates über 0,2, wurde der „Ausreißer“, sofern vorhanden, verworfen. Lag die Standardabweichung weiterhin oberhalb von 0,2 wurde das gesamte Triplikat verworfen. Von dem mittleren C_t -Wert für das Target wurde der mittlere C_t -Wert für die interne Kontrolle, RPL32, derselben cDNA-Probe subtrahiert. So erhielt man den ΔC_t -Wert:

$$\Delta C_t = C_t \text{ mean}_{\text{target}} - C_t \text{ mean}_{\text{RPL32}}$$

Nun wurde der $\Delta\Delta C_t$ -Wert errechnet, indem von jedem ΔC_t -Wert der Mittelwert der ΔC_t -Werte der Kontrollbedingungen subtrahiert wurde.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct \text{ mean}_{control}$$

Aus dem $\Delta\Delta Ct$ -Wert konnte dann nach folgender Formel die n-fache Expression (n-fold change, FC) eines Targets für die einzelnen Triplikate errechnet werden:

$$n - fold\ change = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Die so errechneten FC-Werte wurden auf die Kontrollen normalisiert (nFC-Werte), indem sie durch den Mittelwert der FC-Werte der Kontrollen dividiert wurden:

$$nFC = \frac{FC}{FC \text{ mean}_{control}}$$

Die nFC-Werte bzw. deren Mittelwerte wurden für alle weiteren graphischen und statistischen Analysen verwendet.

2.2.6 Proteinisolation aus NRVCN und adulten Mausherzen

2.2.6.1 Prinzip/ Hintergrund

Da letztendlich nicht die in der PCR detektierten mRNAs, sondern die daraus translatierten Proteine die entscheidenden pro- und antihypertrophen Funktionen in den Kardiomyozyten erbringen, und Veränderungen der mRNA-Konzentrationen nicht zwangsläufig mit Veränderungen der Proteinkonzentrationen einhergehen, ist es unerlässlich, auch die Konzentrationen der Proteine, die durch die mRNAs kodiert werden, zu bestimmen.

Zur Proteinisolation aus Zellen werden sogenannte Lysepuffer verwendet. Diese enthalten membranersetzende Detergenzien, die Proteine aus den verschiedenen Zellkompartimenten lösen und sie so der qualitativen und quantitativen Analyse zugänglich machen. Um die Effektivität der Lyse zu erhöhen, können die Zellen nach Lösung im Lysepuffer zusätzlich wiederholt eingefroren und aufgetaut werden. Zur Erhöhung der Proteinausbeute wird dem Lysepuffer ein Proteinaseinhibitorgemisch zugefügt, das den Abbau von Proteinen durch Proteasen verringert.

Der für diese Arbeit verwendete RIPA-Puffer erhielt seinen Namen durch die Anwendung, für die er ursprünglich verwendet wurde: radio immunoprecipitation

assay (RIPA). Obwohl diese Methode heute nur noch wenig angewandt wird, blieb die Bezeichnung bis heute erhalten.

2.2.6.2 Vorgehen

Die Proteinisolation aus NRVCM erfolgte an Tag 4 der Zellkultur. Jedes Well wurde zweimal auf Eis mit 4°C kaltem PBS gespült. Anschließend wurden 150µl RIPA-Puffer in jedes Well geben und die Zellen mithilfe eines Cell Scrapers vom Plattenboden gelöst. Die Suspension wurde in ein 1,5ml-Cup überführt. Sollte ein Protein, das bekanntermaßen nur in geringen Mengen in NRVCM vorhanden ist, bestimmt werden, wurden jeweils zwei Wells einer Versuchsbedingung gepoolt. Hierzu wurde zunächst nur in eines der zwei Wells 150µl RIPA-Puffer gegeben, die Zellen mit einem Cellscrapper gelöst, die Suspension in das zweite Well gegeben, die Zellen ebenfalls mechanisch gelöst und erst dann die Suspension in ein 1,5ml-Cup überführt. Die Cups wurden anschließend dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37°C im Thermomixer unter leichtem Schütteln wieder aufgetaut. Nach dem letzten Auftauschritt wurden die Proben für 20 Minuten bei 12000g und 4°C zentrifugiert und der Überstand ohne Mitnahme des Zelldebris in ein neues 1,5ml-Cup überführt. Die so gewonnenen Proteinproben wurden bei -20°C gelagert oder direkt der Proteinkonzentrationsmessung und der SDS-PAGE zugeführt.

Für die Proteinisolation aus Herzgewebe adulter Mäuse wurden die bei -80°C eingefrorenen Herzen in 1ml RIPA-Puffer gegeben und mithilfe des Ultra Turrax® Dispergiergeräts mechanisch zerkleinert. Wie bei der Proteinisolation aus NRVCM wurden die Proben anschließend wiederholt eingefroren und aufgetaut, anschließend zentrifugiert und in neue Cups überführt. Diese wurden bei -80°C gelagert.

2.2.7 Proteinkonzentrationsbestimmung (Bio-Rad DC Protein-Assay)

2.2.7.1 Prinzip/ Hintergrund

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten aus neonatalen Rattenkardiomyozyten oder adulten Mauserzen wurde das DC Protein Assay der Firma Bio-Rad verwendet. Dieses kolorimetrische Verfahren beruht auf der Reaktion von Proteinen mit Kupfertartrat in alkalischem Milieu und anschließender Reduktion von Folin, was zu einem blauen Farbumschlag führt, der photometrisch gemessen werden kann. Mithilfe eines Proteinstandards in bekannter Konzentration kann so

aus der gemessenen Absorption die Proteinkonzentration der Proben errechnet werden.

2.2.7.2 Vorgehen

In einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden 5µl von jeder Proteinprobe in Triplikaten aufgetragen. Zur Bestimmung des Leerwertes wurde in drei Wells ausschließlich der zuvor zur Zellyse verwendete RIPA-Puffer pipettiert. Des Weiteren wurde zur Erstellung einer Eichgeraden eine BSA-Verdünnungsreihe (2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 µg/ml), ebenfalls in Triplikaten, aufgetragen. Anschließend wurde in jedes Well 25µl des Reagenz A' (hergestellt aus Reagenz A und Reagenz S im Verhältnis A:S = 50:1) sowie 200µl der Reagenz B hinzugefügt und die Platte für fünf Sekunden vorsichtig geschüttelt. Nach 15 Minuten wurde im Infinite M200Pro Mikroplattenleser der Firma Tecan die Absorption bei 750nm gemessen und die Proteinkonzentration der Proben errechnet.

2.2.8 SDS-PAGE und Western Blot

2.2.8.1 Prinzip/ Hintergrund

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) und Western Blot dienen dem qualitativen und quantitativen Nachweis von Proteinen. Das Verfahren basiert auf der unterschiedlich schnellen Wanderung von Proteinen durch ein Polyacrylamidgel im elektrischen Feld.

Polyacrylamid ist das Polymer des Acrylamids. Die Polymerisation wird katalysiert durch Tetramethylethylendiamin (TEMED), als Initiator dient der Radikalbildner Ammoniumperoxodisulfat (APS). Durch die Polymerisation entsteht ein Gitter, durch das Proteine, getrieben durch ein elektrisches Feld, abhängig von ihrer Ladung, Größe und Konformation unterschiedlich schnell wandern. Damit die Geschwindigkeit der Wanderung nur noch von der molekularen Masse der Proteine abhängig ist, werden die Proteine vor der Elektrophorese durch Erhitzen auf 95°C denaturiert und mit Natriumdodecylsulfat versetzt. Dieses lagert sich an Proteine an und bewirkt durch seine negativ geladene Sulfatgruppe eine konstante negative Ladung pro Masseinheit Protein. Die Eigenladung der Proteine kann hierbei vernachlässigt werden. Des Weiteren verhindert es die Ausbildung von Tertiär- und Quartärstrukturen.

Das Gel für die SDS-PAGE besteht aus zwei Teilen unterschiedlicher Dichte: Einem Trenngel, dessen Dichte abhängig von der molekularen Masse des zu untersuchenden Proteins gewählt wird, und dem darüber liegenden Sammelgel, das der Verdichtung der Proteinproben dient. Letzteres ist nötig, damit Proteine gleicher Masse auf einer Höhe durch das Trenngel laufen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung werden die Proteine auf eine Membran übertragen. Dies geschieht ebenfalls durch ein elektrisches Feld. Für diese Arbeit wurden PVDF-Membranen verwendet, auf deren Oberfläche die Proteine infolge hydrophober und polarer Wechselwirkungen haften.

Auf der Membran sind die Proteine der Detektion mit Hilfe spezifischer Antikörper zugänglich. Hierzu müssen zunächst unspezifische Bindungsstellen durch entfettetes Milchpulver oder BSA blockiert werden. Anschließend wird die Membran mit einem Erstantikörper inkubiert, der entweder gegen ein einzelnes (monoklonaler Antikörper) oder verschiedene Epitope (polyklonaler Antikörper) des zu untersuchenden Proteins gerichtet ist. Die Membran wird dann mit dem Sekundärantikörper inkubiert, der gegen den FC-Teil des Primärantikörpers gerichtet ist. An den Sekundärantikörper ist entweder ein Fluoreszenzfarbstoff oder ein Enzym gekoppelt, das in einer Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen werden kann. Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wird die Membran vor und nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper in einem detergenzienhaltigen Waschpuffer gewaschen.

Um eine quantitative Analyse zu ermöglichen und sicherzustellen, dass von allen Proben die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde, muss des Weiteren eine Ladekontrolle erfolgen. Hierzu wird, ebenfalls durch Immundetektion, ein Protein nachgewiesen, dessen Expression durch die verschiedenen Versuchsbedingungen nicht reguliert wird. Häufig verwendet werden Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), β -Actin und α -Tubulin.

Zur Detektion der Sekundärantikörper wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei verschiedene Methoden eingesetzt: die Immunfluoreszenz mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 546 und die Chemilumineszenz unter Verwendung der Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP). Bei ersterer werden Sekundärantikörper eingesetzt, an die der Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 546 gebunden ist. Dieser Farbstoff emittiert nach Anregung rotes Licht mit einem

Emissionsmaximum bei 573 nm. Bei der Chemilumineszenzreaktion wird durch die Meerrettichperoxidase die Oxidation von Luminol katalysiert, das so in einen angeregten Zustand gelangt. Seinen Grundzustand erreicht es wieder, indem es Licht mit einer Wellenlänge von 425 nm abstrahlt. Die Fluoreszenz und Chemilumineszenz wurden jeweils unter Verwendung spezifischer Filter mit dem FluorChem Q System® (Protein Simple) detektiert.

Die quantitative Analyse erfolgt mittels Densitometrie. Bei diesem Verfahren wird die Farbdichte der Banden des gesuchten Proteins und der Ladekontrolle bestimmt und daraus die relative Expression des Proteins errechnet.

2.2.8.2 Durchführung

2.2.8.2.1 Herstellung der Gele

Zunächst musste das Trenngel gegossen werden. Je nach Größe des zu untersuchenden Proteins wurden zur optimalen Auftrennung verschiedene Dichten der Gele gewählt. So wurde zum Beispiel zur Detektion der myosin heavy chain 7 (Myh7, etwa 200 kDa) ein 6%-iges Gel, für die Detektion von regulator of calcineurin 1.4 (Rcan1.4, etwa 28 kDa) ein 10%-iges Gel gewählt. Zur Herstellung der Trenngele wurden Acrylamid, Trenngelpuffer und destilliertes Wasser in den in folgender Tabelle angegebenen Mengen gemischt:

Tabelle 2: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE

	30% Acrylamid	dH ₂ O	Trenngel- puffer	Sammelgel -puffer	10% APS	TEMED
Trenngel 6%	2,0ml	5,2ml	2,6ml	x	60µl	30µl
Trenngel 10%	3,3ml	3,9ml				
Sammelgel	0,8ml	2,9ml	x	1,4ml	30µl	15µl

Dann wurden APS und TEMED hinzugefügt, das Gemisch zügig in die gel holder cassette gegeben und mit einer dünnen Schicht Isopropanol überschichtet, um Luftblasen zu entfernen und später eine gleichmäßige Grenze zwischen Trenn- und Sammelgel zu gewährleisten. Nach abgeschlossener Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel über das Trenngel geschichtet. In dem

Sammelgel wurde ein Kamm platziert, je nach Probenzahl und -konzentration mit 10 oder 15 Zähnen.

2.2.8.2.2 Vorbereitung der Proteinproben

Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung (s. 2.2.7) wurde von allen Proben eine identische Menge Protein (meist 30µg) mit 4x Laemmli-Puffer gemischt und mit destilliertem Wasser je nach Geltaschengröße auf 45 oder 60 µl aufgefüllt. Das Gemisch wurde für fünf Minuten unter leichtem Schütteln auf 95°C erhitzt.

2.2.8.2.3 SDS-PAGE

Nach vollständiger Polymerisation der Polyacrylamidgele wurden diese in eine Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad) gegeben. Die Kammern wurden mit Laufpuffer gefüllt und die Käme vorsichtig aus den Gelen gezogen. Nach dem Spülen der Taschen mit Laufpuffer mithilfe einer Einwegspritze und –kanüle wurden die Proben vorsichtig in die Taschen pipettiert. In mindestens eine Tasche pro Gel wurde die Pageruler Plus Prestained Ladder pipettiert um abschließend eine Größenbestimmung der Banden zu ermöglichen. Die Kammer wurde verschlossen und eine Spannung von 100V angelegt. Diese wurde auf 120V erhöht, sobald die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten. Die Dauer der Elektrophorese wurde abhängig von der Masse des zu untersuchenden Proteins und der Dichte des Gels gewählt und wurde beendet, sobald das Bromphenolblau des Laemmli-Puffers am unteren Ende des Gels austrat.

2.2.8.2.4 Proteintransfer

Für den Proteintransfer wurde zunächst der Transferpuffer angesetzt. Dafür wurden 1 Teil 10x Transferpuffer, 2 Teile Methanol und 7 Teile destilliertes Wasser gemischt und in eine Laufkammer gegeben. Die PVDF-Membran wurde für etwa zwei Minuten in Methanol aktiviert und anschließend, nach kurzem Waschen in destilliertem Wasser, in Transferpuffer äquilibriert. Das Trenngel wurde nach Entfernung des Sammelgels mit der Membran unter leichtem Druck in eine Kassette gegeben. Diese wurde so in der Laufkammer positioniert, dass die Membran auf Seite der Anode lag. Der Transfer wurde über 90 Minuten bei 350 mA durchgeführt.

2.2.8.2.5 Detektion

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran unter leichtem Schütteln für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in 5% entfettetem Milchpulver

in TBST inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem Erstantikörper inkubiert. Dieser wurde ebenfalls in 5% entfettetem Milchpulver in TBST verdünnt. Der Verdünnungsfaktor wurde je nach Antikörper nach Herstellerangaben oder nach eigener Erfahrung gewählt. Die Inkubationsdauer betrug 60 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Membran dreimal 15 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln in TBST gewaschen, mit dem Sekundärantikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut dreimal gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde je nach Spezies des Primärantikörpers und gewünschter Detektionsmethode gewählt.

Wurde ein Fluoreszenzantikörper verwendet, wurde die Membran ohne weitere Behandlung in das FluorChem™ Q System gelegt und die spezifische Emission des Fluoreszenzfarbstoffes gemessen.

Die Detektion der HRP-markierten Antikörper erfolgte mit Hilfe des Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare). Die Reagenzien A und B wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, auf Raumtemperatur erwärmt und unter Lichtabschirmung für vier Minuten auf die Membran gegeben. Anschließend wurde das überschüssige ECL Select entfernt und im FluorChem™ Q System die Emission bei 425nm gemessen.

Für die Ladekontrolle wurde die Membran erneut dreimal für 15 Minuten in TBST gewaschen, für eine Stunde mit einem murinen anti- α -Tubulin-Antikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wie zuvor gewaschen und mit einem anti-Maus-Antikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer weiteren Waschung wurde der Sekundärantikörper mittels Immunfluoreszenz oder Chemilumineszenz detektiert.

Zuletzt erfolgte die quantitative Analyse. Hierzu wurde mittels Densitometrie die Farbdichte D der Banden des gesuchten Proteins und der Ladekontrolle ermittelt. Erstere wurde durch letztere dividiert, um die leicht unterschiedlichen Proteinmengen in den verschiedenen Proben auszugleichen. Man erhielt die normalisierte Dichte nD :

$$nD = D_{\text{Protein}}/D_{\text{Ladekontrolle}}$$

Jeder nD -Wert wurde durch den Mittelwert der nD -Werte der Kontrollen dividiert:

$$\text{Relative Expression} = nD/nD \text{ mean}_{controls}$$

Somit ergab die relative Expression der Kontrollen im Mittel den Wert 1, die relative Expression in den übrigen Proben konnte als Vielfaches von 1 angegeben werden.

2.2.9 Firefly-Luciferase Assay

2.2.9.1 Prinzip/ Hintergrund

Die Expression von Genen wird reguliert durch sogenannte Promotoren. Dabei handelt es sich um nicht kodierende Genabschnitte vor einem kodierenden Bereich, an die Transkriptionsfaktoren binden und so die Transkription des dahinterliegenden Gens induzieren oder reduzieren können. Von vielen Promotoren ist bekannt, dass sie durch bestimmte Signalwege aktiviert werden. Schafft man durch molekularbiologische Methoden ein Konstrukt, in dem sich hinter dem Promotor das Gen für eine Luciferase befindet, kann aus der Luciferaseaktivität unter verschiedenen Versuchsbedingungen auf die Aktivität des Signalweges, der als Zielstruktur den verwendeten Promotor hat, geschlossen werden. Für diese Arbeit sollte die Aktivität SRF- und NFAT-sensitiver Promotoren unter adenoviralem Knockdown und Überexpression von Myomasp/LRRC39 bestimmt werden. Hierfür wurde die Firefly (*Photinus pyralis*)-Luciferase in einem Konstrukt mit einem SRF- oder NFAT-sensitiven Promotor verwendet. Als Kontrolle diente die Renilla-Luciferase (aus *Renilla reniformis*). Beide Luciferasen erzeugen nach Zugabe spezifischer Substrate Lumineszenz, die quantitativ detektiert werden kann. Da die Substrate der beiden Luciferasen sich deutlich unterscheiden, ist es möglich, sukzessive im selben Ansatz beide Luciferaseaktivitäten zu bestimmen. Die Fireflyaktivität wird dann durch die Renillaaktivität im selben Ansatz dividiert, wodurch Unterschiede in Zelldichte und Effektivität der Infektion sowie Pipettiergenauigkeiten ausgeglichen werden können. Dann erfolgt eine Normalisierung dieser relativen Fireflyaktivität auf den Mittelwert der Fireflyaktivitäten in den Kontrollen, d.h. ohne Myomasp/LRRC39-Knockdown oder –überexpression. So ergab sich eine mittlere, normalisierte, relative Fireflyaktivität von 1 in den Kontrollen und die normalisierte relative Fireflyaktivität unter Knockdown/Überexpression konnte als Vielfaches von 1 angegeben werden.

2.2.9.2 Vorgehen

NRVCM-Kulturen (s. 2.2.1) wurden an Tag 0 auf 12-Well-Zellkulturplatten mit einer Dichte von 400.000 Zellen/Well ausgesät. An Tag 1 wurden sie mit folgenden Adenoviren in FCS-freiem Medium infiziert:

Tabelle 3: Viruskonzentrationen für NFAT-Luciferase-Assay unter Myomasp/LRRC39-Knockdown

AdNFAT-Luc	AdRenilla	Ad Δ CnA	AdLacZ	miR11	miRneg
30	10	x	30	x	100
30	10	30	x	x	100
30	10	x	30	100	x
30	10	30	x	100	x

Tabelle 4: Viruskonzentrationen für NFAT-Luciferase-Assay unter Myomasp/LRRC39-Überexpression

AdNFAT-Luc	AdRenilla	Ad Δ CnA	AdLacZ	AdMyomasp	AdLacZ
30	10	x	30	x	50
30	10	30	x	x	50
30	10	x	30	50	x
30	10	30	x	50	x

Tabelle 5: Viruskonzentrationen für SRF-Luciferase-Assay unter Myomasp/LRRC39-Überexpression

Ad4.74	AdRenilla	AdRhoA	AdLacZ	AdMyomasp	AdLacZ
20	5	x	40	x	0/20/40/50
20	5	40	x	x	0/20/40/50
20	5	x	40	50/30/10/0	x
20	5	40	x	50/30/10/0	x

Es wurden jeweils 6 Wells identisch behandelt. An Tag 3 wurden die Wells mit PBS gewaschen und 200 μ l Passive Lysis Buffer hineingegeben. Die Zellkulturplatte wurde bei -80°C eingefroren, bei Raumtemperatur wieder aufgetaut und unter leichtem Schütteln für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden aus jedem Well 20 μ l Suspension in eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt. Die weiteren

Arbeitsschritte erfolgten einzeln für jedes Well automatisiert im Infinite M200Pro Mikroplattenleser (Tecan): Zugabe von Reagenz A, Inkubation für zwei Sekunden, Detektion der Lumineszenz, Zugabe von Reagenz B, Inkubation für zwei Sekunden, Detektion der Chemilumineszenz. Die Fireflyaktivität wurde dann durch die Renillaaktivität dividiert und die so erhaltene relative Fireflyaktivität durch den Mittelwert der relativen Fireflyaktivitäten der Kontrollen dividiert.

2.2.10 Immunzytochemie in NRVCM

2.2.10.1 Prinzip/ Hintergrund

Die Immunzytochemie dient der Lokalisation von Antigenen innerhalb einer Zelle mittels Antikörpern. Hierfür werden die fixierten, nicht mehr vitalen Zellen zunächst mit einem Primärantikörper inkubiert, der möglichst spezifisch an das gesuchte Antigen bindet. Eine vorherige Inkubation in BSA verringert unspezifische Bindungen des Antikörpers. In einem zweiten Schritt wird der Sekundärantikörper auf die Zellen gegeben, der an den Fc-Teil des Primärantikörpers bindet. Der Fc-Teil unterscheidet sich je nachdem, aus welcher Spezies der Primärantikörper entstammt, sodass der Sekundärantikörper dementsprechend gewählt werden muss. An den Sekundärantikörper ist ein Fluoreszenzfarbstoff gebunden, der spezifische Absorptions- und Emissionsmaxima aufweist. So können mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe im selben Präparat detektiert und unterschieden werden. Zusätzlich zu den Antikörpern kann 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) verwendet werden, das bei Bindung an DNA verstärkt fluoresziert und sich somit zur Anfärbung des Zellkerns eignet.

2.2.10.2 Vorgehen

Tag 0:

Es wurden jeweils 300.000 NRVCM (180.000 für Zellgrößenbestimmung) in FCS-haltigem Medium auf Coverslips in 12-Well-Zellkulturplatten ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Tag 1:

An Tag 1 wurden die Zellen zunächst lichtmikroskopisch beurteilt. Hierbei wurde auf die homogene Verteilung der Zellen auf den Platten, die Vitalität der Zellen und eine eventuelle Kontamination mit Bakterien geachtet. Diese lichtmikroskopischen Kontrollen wurden an allen weiteren Tagen der Zellkultur wiederholt. Anschließend

erfolgte die Infektion der Zellen mit Adenoviren. Hierzu wurde das Medium von den Zellen entfernt, die Zellen mit 37°C warmem PBS gewaschen und virushaltiges, serumfreies Medium auf die Zellen gegeben. Für die Überexpression (AdMyomasp/AdLacZ) wurden 20 ifu/Zelle, für den Knockdown (miR11/ miRneg) 100ifu/Zelle verwendet.

Tag 2:

An Tag 2, 24 Stunden nach der Infektion, wurde das Medium erneut von den Zellen entfernt und durch frisches, serumfreies Medium ersetzt. In jeweils der Hälfte der Wells, die mit demselben Virus infiziert worden waren, enthielt das Medium 50µM Phenylephrin, bei den übrigen Zellen wurde das identische Volumen destilliertes Wasser hinzugefügt.

Tag 4:

Nach weiteren 48 Stunden Inkubation wurde an Tag 4 das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für fünf Minuten mit 4% Paraformaldehyd in PBS bei Raumtemperatur fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0,1% TritonX und 2,5% BSA in PBS überschichtet und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen und mit dem Erstantikörper in 2,5% BSA in PBS überschichtet. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit dem Sekundäantikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zu dem Zweitantikörper wurde außerdem DAPI 1:5000 hinzugefügt. Dieser Schritt erfolgte aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Fluoreszenzantikörper in einer lichtundurchlässigen Kammer. Zuletzt wurden die Coverslips jeweils dreimal mit PBS und dH₂O gewaschen und mittels FluoPreserve™ auf einem Objektträger fixiert. Die Bilder wurden mittels des Fluoreszenzmikroskops BZ9000 (Keyence) angefertigt.

2.2.11 Zellgrößenbestimmung

2.2.11.1 Prinzip/ Hintergrund

Neben der Analyse von pro- und antihypertrophen Signalwegen ist die direkte Bestimmung der Zellgröße zur Quantifizierung der Hypertrophie in Kardiomyozyten von elementarer Bedeutung. Hierfür eignet sich die Immunzytochemie unter Verwendung eines Antikörpers, der insbesondere die Zellgrenzen deutlich darstellt

und eine Differenzierung von NRVCM und Fibroblasten, die immer in geringer Zahl in NRVCM-Kulturen vorhanden sind, ermöglicht. Für diese Arbeit wurde ein monoklonaler Antikörper gegen α -Actinin verwendet. In Herzmuskelzellen verankert α -Actinin die Aktinfilamente in der Z-Scheibe. Folglich ist seine Konzentration an der Z-Scheibe am größten, sodass sich in der Fluoreszenzmikroskopie eine Querstreifung erkennen lässt. Die quantitative Analyse der Zellgröße erfolgte mithilfe der Software des Keyence BZ9000 Fluoreszenzmikroskops.

2.2.11.2 Vorgehen

Behandlung der Zellkultur und Antikörperfärbung wurden durchgeführt wie unter 2.2.10 beschrieben. Es wurde ein muriner monoklonaler anti- α -Actinin-Antikörper in einer Verdünnung von 1:400 als Erstantikörper und der Cy3-gekoppelte anti-Maus-Antikörper von Dianova 1:1000 jeweils in 2,5% BSA in PBS verwendet. Dem Zweitantikörper wurde außerdem DAPI 1:5000 hinzugefügt.

Die Analyse wurde durchgeführt mit dem Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ9000. Es wurden mit 200-facher Vergrößerung pro Coverslip 25 Bilder in einem Raster von 5x5 Bildern mit einem Z-Stapel von 5 Bildern und einem Pitch von 3 μ m angefertigt. Aus den Z-Stapeln wurden die jeweils schärfsten Bilder ausgewählt und zu einem Bild zusammengefügt. Mit der Cell-Count-Funktion der Mikroskopsoftware konnten die Zellgrenzen automatisiert dargestellt, die Zellkerne gezählt und die Zellen vermessen werden. Die so erhaltenen Daten wurden in eine Microsoft Excel™-Tabelle überführt. Hier wurden alle Zellen von der Messung ausgenommen, die kleiner als 150 μ m oder größer als 4000 μ m waren, da es sich hierbei in den meisten Fällen um Artefakte oder fehlerhafte Messungen handelte. Des Weiteren wurden die Zellen ausgenommen, die über mehr als einen Zellkern verfügten. Da keine Normalverteilung der Messwerte angenommen werden konnte, erfolgte die Darstellung mittels Box-Whisker-Plot und die statistische Analyse mittels ANOVA on Ranks.

2.2.12 Genotypisierung der Myomasp/LRRC39-Knockout-Maus

2.2.12.1 Prinzip/ Hintergrund

Für die Experimente wurden nur homozygote Knockouttiere und Wildtypen verwendet, da diese Tiere entweder gar kein Myomasp/LRRC39 oder eine unveränderte Menge an Myomasp/LRRC39 produzieren. Für die Verpaarungen

wurden ausschließlich heterozygote Tiere verwendet, da bei diesem sogenannten Intercross im Durchschnitt jeweils ein homozygoter Knockout und Wildtyp sowie zwei Heterozygote entstehen. Auf diese Weise können die Zucht aufrechterhalten und gleichzeitig Versuchstiere gewonnen werden. Demnach musste vor Verpaarungen und Durchführung von Versuchen der Genotyp jeder Maus der Myomasp/LRRC39-Knockout-Zucht bestimmt werden. Hierfür wurde kurz nach der Geburt aus den Schwanzspitzen der Tiere die genomische DNA isoliert und mittels qualitativer Polymerase-Kettenreaktion das Vorhandensein des veränderten und des Wildtypallels nachgewiesen.

2.2.12.2 Vorgehen

2.2.12.2.1 DNA-Isolierung aus Mausschwanzspitzen

Die Schwanzspitzen der Mäuse wurden am ersten bis sechsten Lebenstag abgetrennt und in jeweils 700µl SNET-Puffer und 7µl Proteinase K für zwei Stunden bei 55°C verdaut. Anschließend wurden 700µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol hinzugefügt, kräftig geschüttelt und für fünf Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, 700µl Isopropanol hinzugefügt, erneut kräftig geschüttelt und für fünf Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 500µl Ethanol 75% gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 3 Minuten bei 1400 rpm wurde der Überstand verworfen, das Pellet für etwa fünf Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in 40µl ddH₂O gelöst.

2.2.12.2.2 Qualitative Polymerase-Kettenreaktion

Für die Polymerase-Kettenreaktion wurden in 200µl-Cups jeweils 1µl der DNA-Lösung mit 5µl 10X DreamTaq Buffer, 2µl dNTP-Mix, 0,5µl forward Primer, 0,5µl reverse Primer und 1,25µl DreamTaq DNA Polymerase gemischt und mit ddH₂O auf 50 µl aufgefüllt. Die Proben wurden kräftig geschüttelt und im Thermal Cycler nach folgendem Programm inkubiert:

Tabelle 6: Thermal Cycler-Programm für qualitative Realtime-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	Keine
Denaturierung	95°C	20 Sek.	39
Primeranlagerung	64°C	40 Sek.	
Elongation	70°C	60 Sek.	

Die Proben wurden anschließend auf ein 1,5-prozentiges Agarosegel aufgetragen und bei 100V für 60 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden wurden mittels UV-Licht sichtbar gemacht.

2.2.13 Echokardiographische Untersuchung der Maus Herzen

2.2.13.1 Prinzip/ Hintergrund

Die Echokardiographie ist eine Methode, mit der die Funktion und Größe des Herzens nicht invasiv und mit geringem Aufwand beurteilt werden kann. Sie verwendet mechanische Wellen im Ultraschallbereich, die an Flächen, an denen Gewebe mit unterschiedlicher Dichte, wie beispielsweise die blutgefüllten Herzkammern und die Herzwände, aneinander liegen, reflektiert werden. Durch die Analyse der Laufzeit dieser reflektierten Wellen kann auf die Entfernung der reflektierenden Grenzfläche geschlossen werden und somit ein dynamisches Bild des Herzens erzeugt werden. Beurteilt werden hierbei unter anderem die Dicke der Herzwände, insbesondere des interventrikulären Septums, dessen Verbreitung auch beim Menschen als Maß für Hypertrophie verwendet wird, sowie die Pumpfunktion, die am besten anhand der sogenannten Ejektionsfraktion abgeschätzt werden kann. Dabei handelt es sich um den Anteil des Blutvolumens im linken Ventrikel, der in der Systole ausgeworfen wird.

2.2.13.2 Vorgehen

Die Tiere wurden im Alter von zehn bis zwölf Wochen in eine Inhalationskammer gesetzt und mit Isofluran narkotisiert. Der Brustkorb wurde über dem Herzen rasiert und der Schallkopf aufgelegt. In der parasternalen kurzen Achse wurden folgende Parameter bestimmt: Ejektionsfraktion (ejection fraction, EF), fraktionelle Verkürzung (fractional shortening, FS), diastolischer/systolischer interventrikulärer

Septumdurchmesser (interventricular diastolic/systolic septum dimension, IVSd/s), linksventrikulärer enddiastolischer/systolischer Innendurchmesser (left ventricular end diastolic/systolic internal diameter, LVIDd/s), linksventrikulärer enddiastolischer/systolischer Hinterwanddurchmesser (left ventricular end diastolic/systolic posterior wall dimension, LVPWd/s).

2.2.14 Tötung der Myomasp/LRRC39-Knockout-Mäuse und Organentnahme

2.2.14.1 Prinzip/ Hintergrund

Um das Herz weiteren mikroskopischen und molekularbiologischen Untersuchungen zuzuführen, wurden die Myomasp/LRRC39-Knockout-Mäuse mittels Genickbruch getötet und ihre Herzen entnommen. Als Maß für die Ausbildung einer kardialen Hypertrophie wurden die Herzen zunächst gewogen. Da eine Funktionseinschränkung des linken Herzens mit einer Lungenkongestion und einer Zunahme des Wasseranteils und ein Versagen des rechten Herzens mit einer Stauung in der Leber einhergehen können, wurden Lunge und Leber ebenfalls entnommen und gewogen. Da sämtliche Organgewichte stark mit der individuellen Größe der Maus korrelieren, wurde außerdem einseitig die Tibia herauspräpariert, vermessen und alle Organgewichte ins Verhältnis zur Tibialänge gesetzt.

2.2.14.2 Vorgehen

Die Tiere wurden im Alter von etwa 10 Wochen durch Genickbruch getötet. Das Abdomen wurde median mit einer Schere eröffnet. Der Schnitt wurde beidseits nach kranial bis zum Rippenbogen erweitert und der Thorax entlang der vorderen Axillarlinien eröffnet. Leber, Lunge und Herz wurden entnommen und gewogen. Leber und Lunge wurden anschließend verworfen, das Herzgewebe wurde weiteren Untersuchungen zugeführt. Des Weiteren wurde einseitig die Tibia entnommen. Diese wurde durch Verdauung in 1000µl SNET-Puffer und 10µl Proteinase K für 2 Stunden bei 55°C von übrigem Gewebe befreit und vermessen. Alle Organgewichte wurden in Relation zur Tibialänge gesetzt.

2.2.15 Fixierung adulter Mäuse und Transmissionselektronenmikroskopie

2.2.15.1 Prinzip/ Hintergrund

Zur Analyse der Ultrastruktur von Herzmuskelzellen eignet sich aufgrund ihres großen Auflösungsvermögens die Elektronenmikroskopie. Hierfür mussten die Mäuse mit Glutaraldehyd fixiert werden, welches eine kovalente Quervernetzung von Proteinen bewirkt. Erreicht wurde dies, indem die Mäuse über eine Kanüle im linken Ventrikel mit Glutaraldehyd perfundiert wurden. Die Transmissionselektronenmikroskopie wurde durchgeführt durch Prof. Dr. med. Lüllmann-Rauch am anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

2.2.15.2 Vorgehen

Die Mäuse wurden im Alter von 10 Wochen mittels Injektion von Ketamin/Xylazin intraperitoneal getötet. Wie bei der Organentnahme (s. 2.2.14) wurde das Abdomen median mit einer Schere eröffnet, der Schnitt beidseits nach kranial bis zum Rippenbogen erweitert und der Thorax entlang der vorderen Axillarlinien eröffnet. Das Herz wurde freigelegt und der linke Ventrikel über die Herzspitze mit einer Flügelkanüle der Größe 21 Gauge punktiert. Über diese wurden die Mäuse zunächst mit 20ml PBS, dann mit 20ml Glutaraldehyd 6% mit einem Druck von 80cm H₂O perfundiert. Anschließend wurden die Mäuse in 6% Glutaraldehyd gelagert. Alle weiteren Schritte der Präparation sowie die Transmissionselektronenmikroskopie erfolgte durch Prof. Dr. med. Lüllmann-Rauch am anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Für sämtliche Tierversuche lagen gültige Tierversuchsanträge vor. Die Bestimmungen des lokalen Tierschutzbeauftragten wurden zu jedem Zeitpunkt eingehalten.

2.2.16 Statistische Auswertung

Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die grafische Darstellung als Mittelwert und Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte mittels Two-Way-ANOVA, als multiple comparisons procedure wurde die Methode nach Student-Newman-Keul gewählt. Lediglich bei der Zellgrößenanalyse (s. 2.2.11) wurde die ANOVA on ranks (multiple comparisons procedure nach Dunn) sowie als Darstellung der Box-Whisker-

Plot verwendet. Alle statistischen Tests wurden durchgeführt mit SigmaPlot© (Version 11.1.0.102), die graphische Darstellung erfolgte mit GraphPad Prism© (Version 5.00). Als statistisch signifikant wurde eine Fehlerwahrscheinlichkeit $\alpha < 0,05$ betrachtet. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt dargestellt:

- * $p < 0,05$ signifikant
- ** $p < 0,01$ hochsignifikant
- *** $p < 0,001$ höchstsignifikant

3 Ergebnisse

3.1 In-vitro-Ergebnisse

3.1.1 Myomasp/LRRC39-Überexpression und –Knockdown beeinflussen die Hypertrophieinduktion durch Phenylephrin in NRVCM

Um die Rolle von Myomasp/LRRC39 bei der Entstehung von Hypertrophie zu untersuchen, wurde überprüft, welchen Effekt die Überexpression und der Knockdown von Myomasp/LRRC39 auf Hypertrophie in NRVCM haben und wie sie die durch Phenylephrin induzierte Hypertrophie in NRVCM beeinflussen. Hierzu wurden mittels quantitativer Realtime-PCR Gene des hypertrophen Genprogramms sowie mittels Immunzytochemie die Zellgröße planimetrisch unter verschiedenen Versuchsbedingungen ermittelt.

In quantitativen Realtime-PCR-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Überexpression und Knockdown von Myomasp/LRRC39 unter basalen Bedingungen keinen Effekt auf die Expression der prohypertrophen Gene Nppa und Nppb haben. Zugabe von 50µM Phenylephrin bewirkten erwartungsgemäß eine statistisch signifikante Induktion von Nppa und Nppb. Dieser Effekt konnte durch den Knockdown von Myomasp/LRRC39 verstärkt und durch die vermehrte Expression von Myomasp/LRRC39 verringert werden. Beide Effekte von Myomasp/LRRC39 waren statistisch signifikant (s. Abbildung 7). Myomasp scheint somit die Ausbildung einer PE-induzierten Hypertrophie negativ zu regulieren.

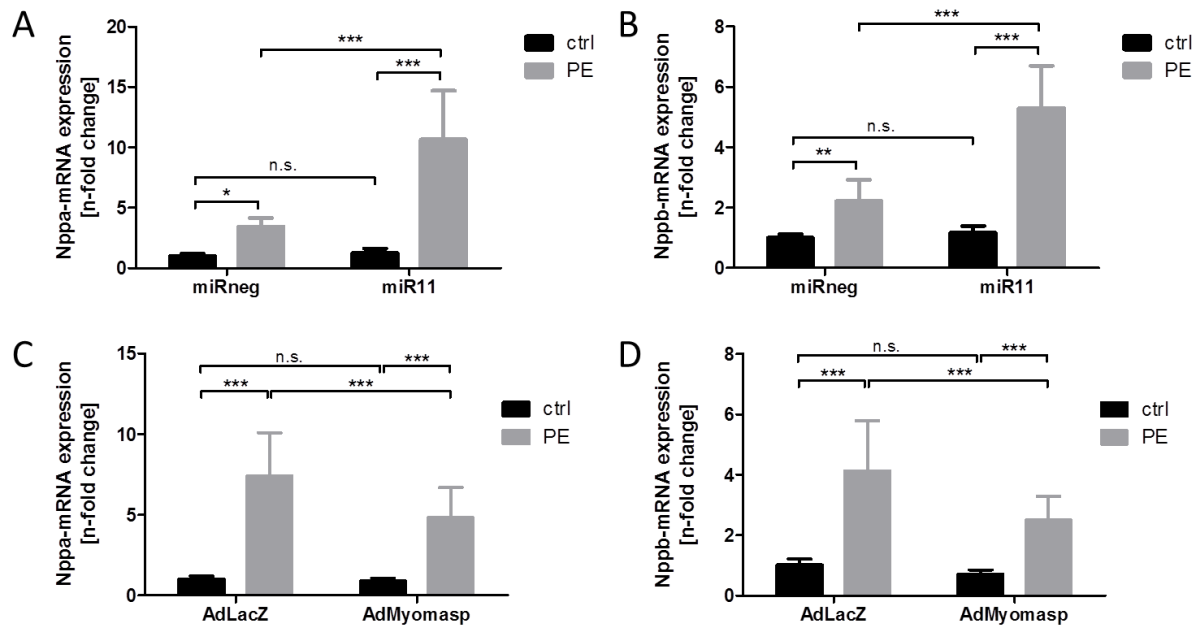


Abbildung 7: Nppa- und Nppb-mRNA-Expression unter Myomasp/LRRC39-Knockdown und -Überexpression. Quantitative Multiplex-Realtime-PCR mit cDNA aus NRVC. Die Zellen wurden 24 Stunden mit den Knockdown (miR11)- oder Überexpressionsviren (AdMyomasp) inkubiert, mit 50µM Phenylephrin (PE) stimuliert und erneut für 48 Stunden inkubiert. **A** und **C** zeigen die relative Expression von Nppa-mRNA, **B** und **D** die relative Expression von Nppb-mRNA jeweils unter Knockdown (oben) und Überexpression (unten) von Myomasp/LRRC39. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit jeweils n=3.

Neben der Bestimmung prohypertropher Gene wurde immunhistochemisch die Zelloberfläche als direktes Maß der Hypertrophie bestimmt. Passend zu den Ergebnissen der quantitativen Realtime-PCR zeigte sich hier eine durch PE induzierte Hypertrophie, die durch Myomasp/LRRC39-Überexpression vermindert (s. Abb 8A) und durch Myomasp/LRRC39-Knockdown verstärkt werden konnte (s. Abb 8B). Unter Myomasp/LRRC39-Überexpression konnte sogar eine vollständige Aufhebung des Phenylephrineffekts erreicht werden.

Im Unterschied zur Realtime-PCR zeigte sich hier außerdem, dass bereits der Knockdown und die Überexpression unter basalen Bedingungen einen Einfluss auf die planimetrische Zellgröße hatte: so führte eine Überexpression von Myomasp/LRRC39 bereits zu einer leichten Abnahme der Zellgröße (s. Abbildung 8A), wohingegen der Knockdown von Myomasp/LRRC39 zu einer Hypertrophie führte (s. Abb. 8B).

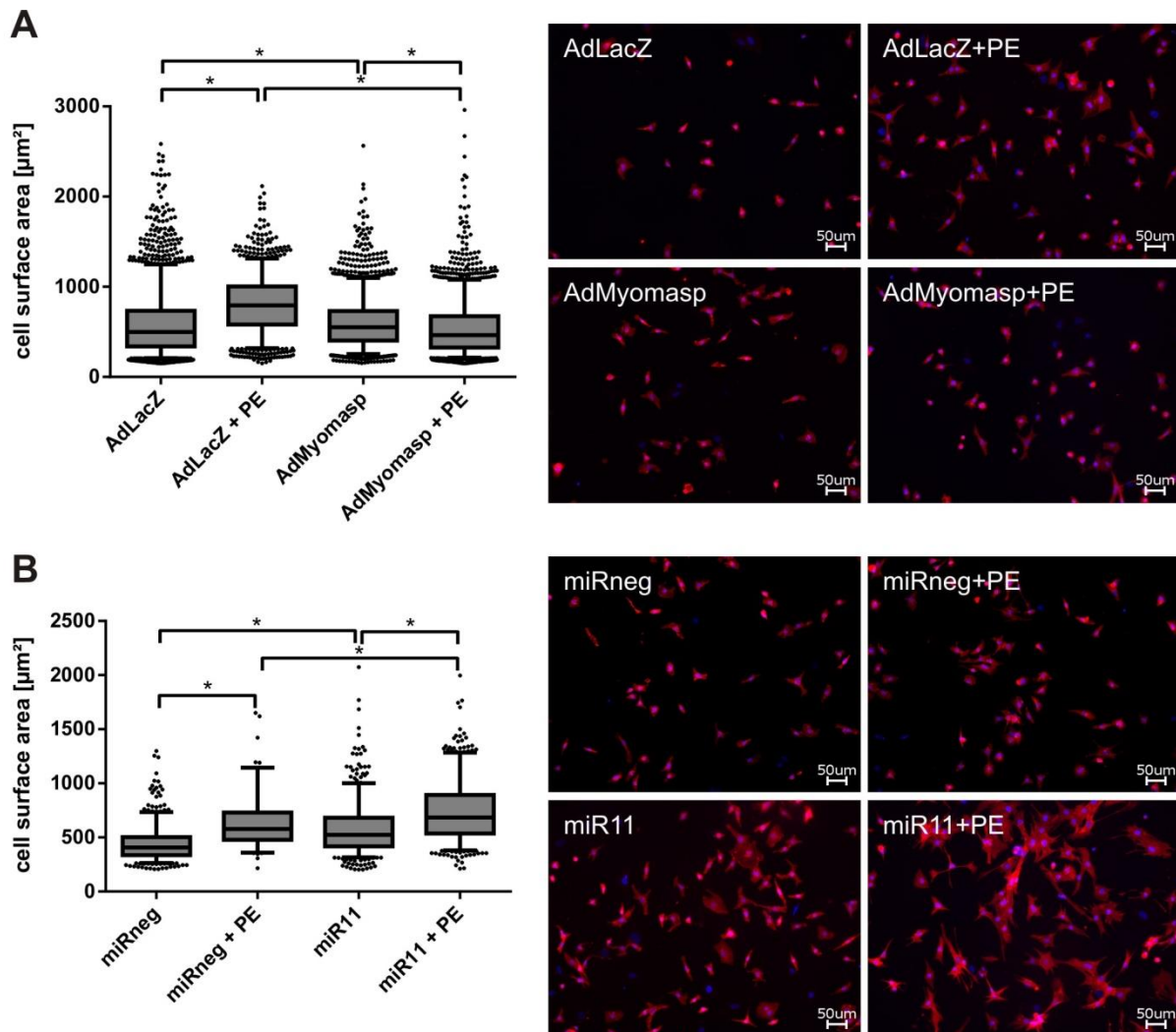


Abbildung 8: Zellgröße mit und ohne Zugabe von Phenylephrin (PE) unter Myomasp/LRRC39-Überexpression und -Knockdown. Immunhistochemische Bestimmung der Zellgröße von NRVCN. Die Zellen wurden auf Coverslips ausgesät, nach 24 Stunden mit Überexpressionsvirus (AdMyomasp, **A**) oder Knockdownvirus (miR11, **B**) infiziert und nach weiteren 24 Stunden mit 50 μM Phenylephrin stimuliert. Nach erneuter Inkubation für 48 Stunden wurden die Zellen fixiert und mittels eines monoklonalen, murinen anti- α -Actinin-Antikörpers fluoreszenzmikroskopisch vermessen. Die Graphen zeigen exemplarisch eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit qualitativ gleichwertigen Ergebnissen. Es wurden jeweils etwa 600 Zellen pro Versuchsbedingung vermessen.

3.1.2 Myomasp/LRRC39-Überexpression induziert den SRF-Signalweg in NRVCN

Will, Eden et al. (2010) konnten zeigen, dass der Knockdown von Myomasp/LRRC39 in NRVCN zu einer dosisabhängigen Aktivitätsabnahme des SRF-abhängigen Signalweges führt (s. Abbildung 4). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkung einer Myomasp/LRRC39-Überexpression auf den SRF-Signalweg untersucht. Hierzu wurde ein quantitativer Firefly-Luciferase-Assay verwendet. Es zeigte sich eine statistisch signifikante Induktion der sm22-Luciferaseaktivität durch Myomasp/LRRC39-Überexpression. Eine Induktion des SRF-Reporters durch

Überexpression von RhoA wurde durch die Myomasp/LRRC39-Überexpression dosisabhängig verstärkt.

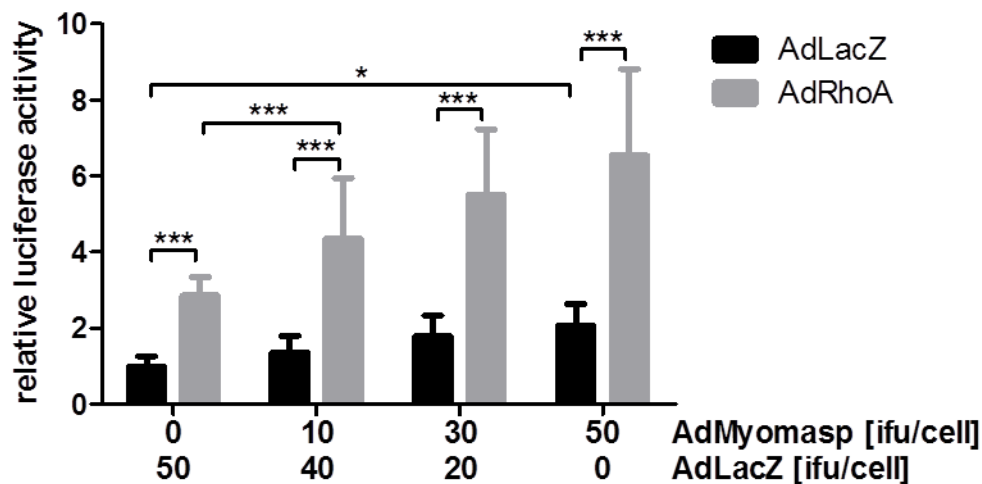


Abbildung 9: SRF-Signaling in NRVCM unter Myomasp/LRRC39-Überexpression. Firefly-Luciferase-Assay unter Verwendung eines SRF-sensitiven Reporters und des SRF-Induktors RhoA in NRVCM. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Aussaat mit einem SRF-sensitiven Luciferasereportervirus sowie den Überexpressionsviren für Myomasp/LRRC39 (AdMyomasp) und RhoA (AdRhoA) infiziert. Nach 72 Stunden Inkubation erfolgte die quantitative Bestimmung der Luciferaseaktivität. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit jeweils n=6.

3.1.3 Myomasp/LRRC39-Überexpression und -Knockdown beeinflussen den Calcineurin-NFAT-Signalweg in NRVCM

Wie in der Einleitung dargelegt, stellt neben dem SRF-Signalweg der Calcineurin-NFAT-Signalweg einen bedeutenden Regulator der Hypertrophie in NRVCM dar. Daher wurde die Auswirkung von Myomasp/LRRC39-Knockdown und – Überexpression auf diesen Signalweg mittels Luciferase-Assay untersucht. Hier zeigte sich, dass der Knockdown von Myomasp/LRRC39 zu einer verstärkten Aktivität des NFAT-Reporters führte (s. Abb. 10A). Durch Zugabe von konstitutiv aktivem Calcineurin A (Δ CnA) wurde erwartungsgemäß ebenfalls eine Induktion der Luciferaseaktivität gemessen, die durch den Myomasp/LRRC39-Knockdown supraadditiv verstärkt wurde. Durch Zugabe des Calcineurininhibitors Ciclosporin A (CsA) hingegen konnte die Luciferaseinduktion durch den Myomasp/LRRC39-Knockdown vermindert werden (s. Abb. 10B).

Die Überexpression von Myomasp/LRRC39 alleine hatte keinen signifikanten Effekt auf die Luciferaseaktivität und konnte die Induktion derselben durch Überexpression

von NFAT nicht vermindern (s. Abb. 10C). Sie verhinderte jedoch vollständig die Signalinduktion durch Δ CnA (s. Abb. 10D).

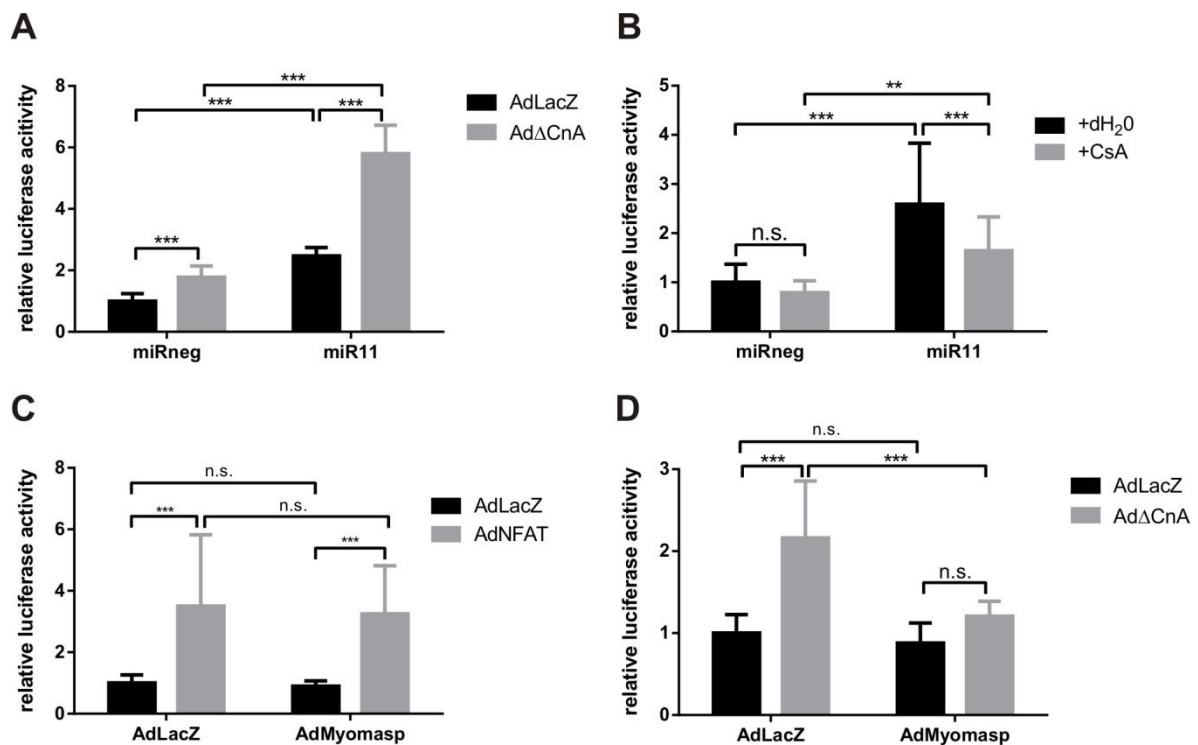


Abbildung 10: NFAT-Signaling in NRVCN unter Myomasp/LRRC39-Knockdown und -Überexpression. Firefly-Luciferase-Assay unter Verwendung eines NFAT-sensitiven Reporters in NRVCN. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Aussaat mit dem Luciferasereportervirus und dem Knockdownvirus (miR11, **A** und **B**) sowie dem Überexpressionsvirus (AdMyomasp, **C** und **D**) infiziert. Zusätzlich erfolgte die Stimulierung des Calcineurin-NFAT-Signalweges mit NFAT (AdNFAT) oder konstitutiv aktivem Calcineurin A (Ad Δ CnA). Die Inhibition des Calcineurin-NFAT-Signalweges erfolgte mit Ciclosporin A (CsA). Nach 48 Stunden Inkubation erfolgte die quantitative Bestimmung der Luciferaseaktivität. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit jeweils n=6.

3.2 In-vivo-Ergebnisse

3.2.1 Myomasp/LRRC39-Knockout-Mäuse zeigen unter basalen Bedingungen keine kardiale Dysfunktion, Hypertrophie oder Fibrose

3.2.1.1 Myomasp/LRRC39-Knockout-Mäuse zeigen keine morphologischen Veränderungen oder Hinweise auf eine Herzinsuffizienz

Um den Effekt des Knockouts von Myomasp/LRRC39 in vivo zu untersuchen, wurden Myomasp-Knockout-Mäuse generiert. Diese zeigten im Alter von acht bis zwölf Wochen kein erhöhtes Herzgewicht im Vergleich zu Wildtypen. In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Herzschnitten ergab sich kein Anhalt für

Unterschiede in Herzgröße oder -struktur zwischen Knockout-Tieren und Wildtypen (s. Abbildung 11). Es zeigte sich lediglich ein erwartungsgemäßer Unterschied zwischen Männchen und Weibchen. Ebenso unverändert zeigten sich Lebergewicht, dessen Erhöhung auf eine Rechtsherzinsuffizienz hindeuten würde, sowie Lungengewicht, das bei Linksherzinsuffizienz erhöht wäre (s. Abbildung 12). Alle angegebenen Massen wurden relativ zur Tibiallänge des jeweiligen Tieres angegeben, um die Körpergröße als Confounder auszuschließen.

Zum Nachweis einer Fibrose, wie sie bei Herzinsuffizienz und -hypertrophie regelhaft vorkommt, wurde eine Sirius-Red-Färbung durchgeführt. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Kollagengehalt zwischen Myomasp/LRRC39-Knockout-Tieren und Wildtypen (s. Abbildung 13).

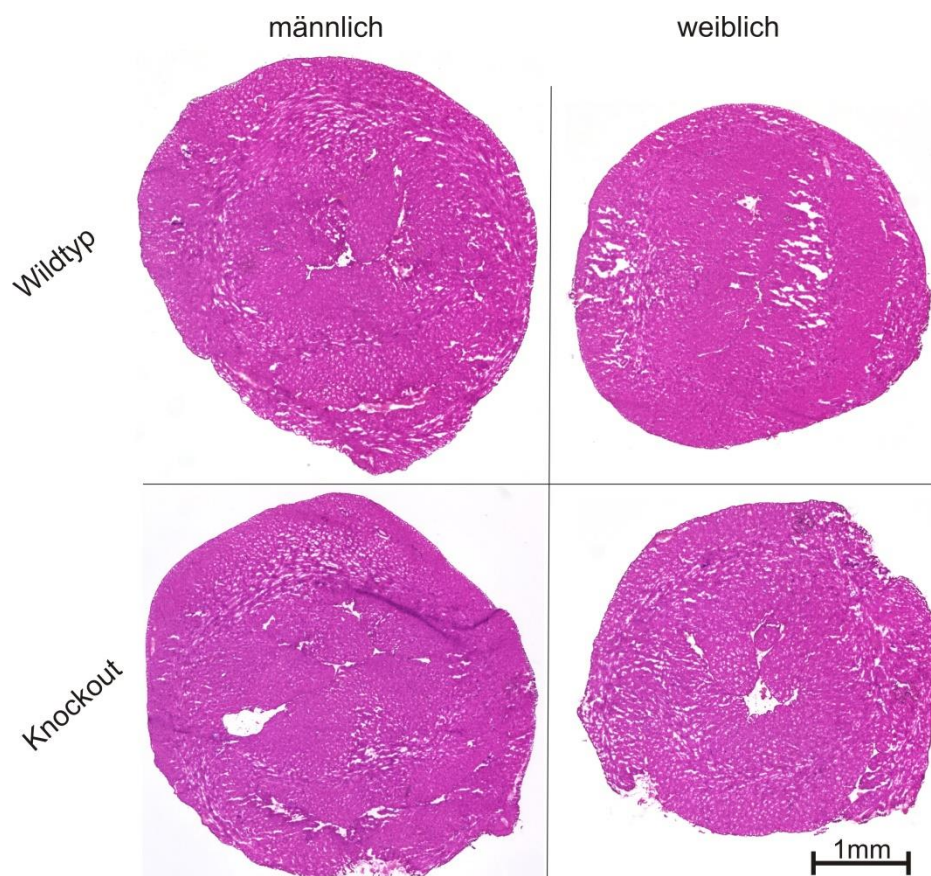


Abbildung 11: Herzschnitte von Mäusen aus der Myomasp-Knockout-Zucht. Knockout-Tiere und Wildtypen der Myomasp/LRRC39-Knockout-Zucht wurden im Alter von acht bis zwölf Wochen durch Genickbruch getötet, die Herzen entnommen, mittels Gefrierschnitt 5µm dünne Präparate entlang der kurzen Herzachse angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt.

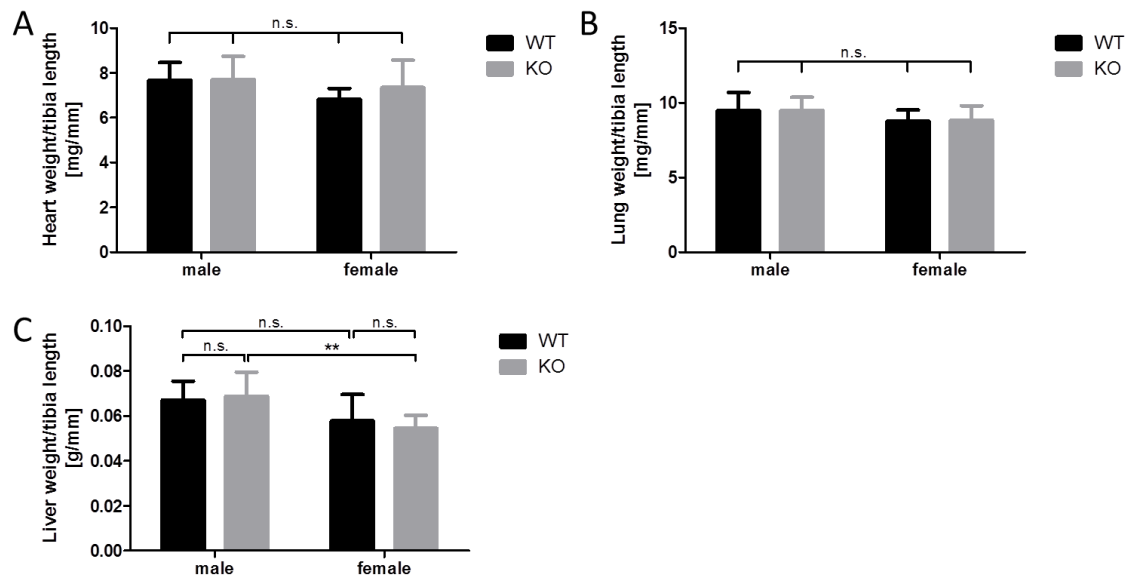


Abbildung 12: Durchschnittliche Organmassen der Myomasp/LRRC39-Knockout-Mäuse. Knockout-Tiere und Wildtypen aus der Myomasp/LRRC39-Knockout-Zucht wurden im Alter von 8 bis 12 Wochen durch Genickbruch getötet, die Organe entnommen und gewogen. Die Graphen zeigen die Herzmasse (A), die Lungenmasse (B) und die Lebermasse (C) in Relation zur Tibialänge des jeweils selben Tieres. Es wurden 10 Tiere pro Gruppe untersucht.

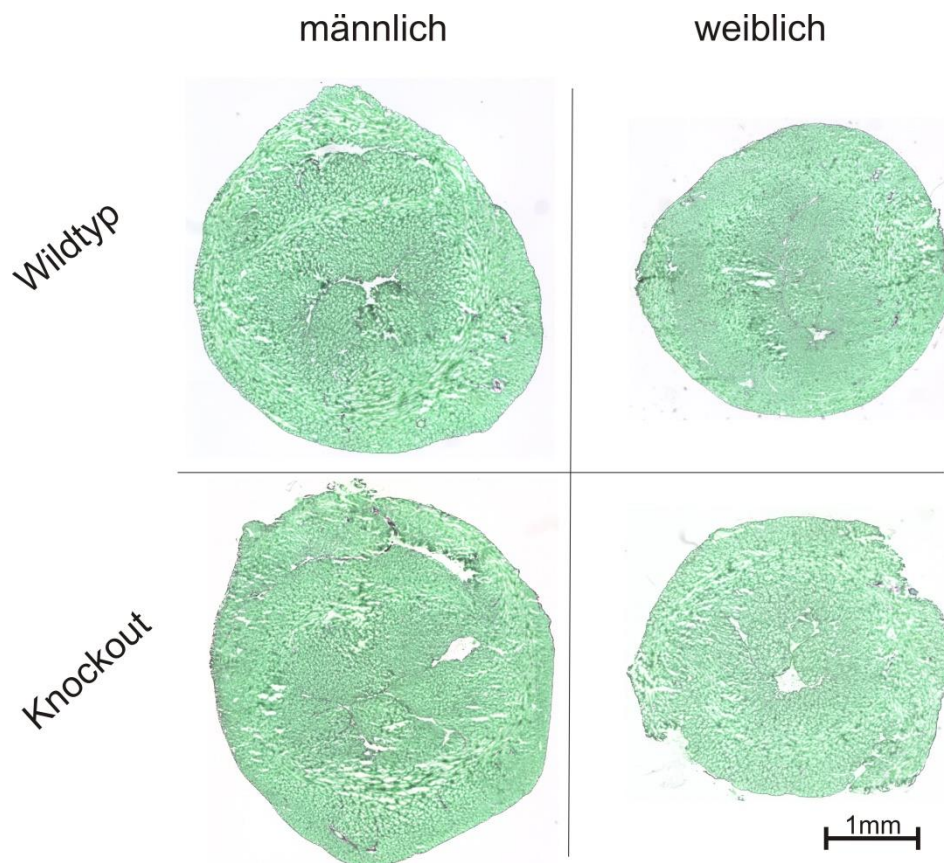


Abbildung 13: Sirius-Red-Färbung von Gefrierschnitten von Mausherzen aus der Myomasp/LRRC39-Knockout-Zucht. Knockout-Tiere und Wildtypen der Myomasp/LRRC39-Knockout-Zucht wurden im Alter von 8 bis 12 Wochen durch Genickbruch getötet, die Herzen entnommen, mittels Gefrierschnitt 5µm dünne Präparate entlang der kurzen Herzachse angefertigt und mit der Sirius-Red-Färbung angefärbt. Die Sirius-Red-Färbung stellt Kollagen rot, das übrige Gewebe grün dar.

3.2.1.2 Myomasp/LRRC39-Knockout-Mäuse zeigen unter basalen Bedingungen in der Echokardiographie keine Unterschiede zu Wildtypen

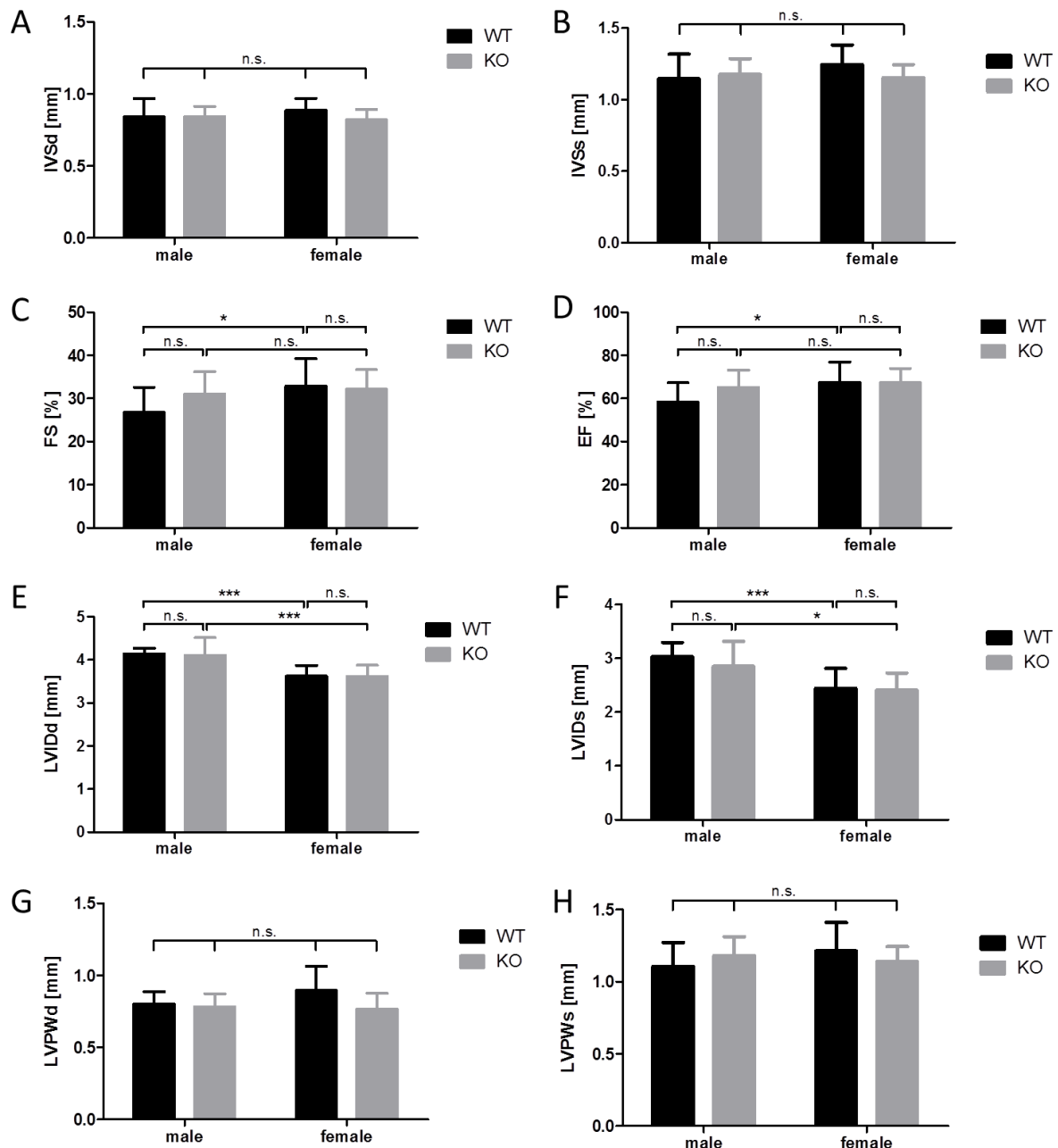


Abbildung 14: Echokardiographische Untersuchung der Myomasp/LRRC39-Knockout-Mäuse. Diastolischer (A) und systolischer (B) interventrikulärer Septumdurchmesser, Fractional Shortening (C), Ejektionsfraktion (D), diastolischer (E) und systolischer (F) linksventrikulärer Innendurchmesser und diastolischer (G) und systolischer (H) linksventrikulärer Hinterwanddurchmesser von männlichen und weiblichen Myomasp/LRRC39-Knockout-Mäusen und Wildtypen jeweils im Vergleich. Es wurden jeweils 10 Tiere untersucht.

Auch in der Echokardiographie zeigten sich zwischen KO- und WT-Tieren keine signifikanten Unterschiede. Der interventrikuläre Septumdurchmesser, der auch beim Menschen als ein Maß für Hypertrophie verwendet wird, zeigte sich bei den Knockout-Tieren sowohl während der Systole als auch während der Diastole im

Vergleich zu den Wildtypen unverändert. Ejektionsfraktion und Fractional Shortening, als Marker der kardialen Funktion, zeigten sich ebenfalls unbeeinflusst. Lediglich zwischen Männchen und Weibchen ließen sich statistisch signifikante Unterschiede ermitteln, die durch den Myomasp/LRRC39-Knockout jedoch nicht beeinflusst wurden. Systolischer und enddiastolischer linksventrikulärer Hinterwanddurchmesser sowie systolischer und enddiastolischer linksventrikulärer Innendurchmesser zeigten sich durch den Knockout ebenso unbeeinflusst (s. Abbildung 14).

3.2.2 Myomasp/LRRC39-Knockout-Mäuse zeigen geschlechtsabhängig veränderte Genexpressionen und Hinweise auf eine Supprimierung von SRF

Proben aus den Herzen von Myomasp/LRRC39-Knockout-Mäusen wurden mittels quantitativer Realtime-PCR auf Veränderungen im Vergleich zu Wildtypen untersucht. Von besonderem Interesse waren hierbei Gene, die durch SRF oder NFAT reguliert sind und/oder bei Hypertrophie eine veränderte Expression aufweisen (s. Abbildung 15).

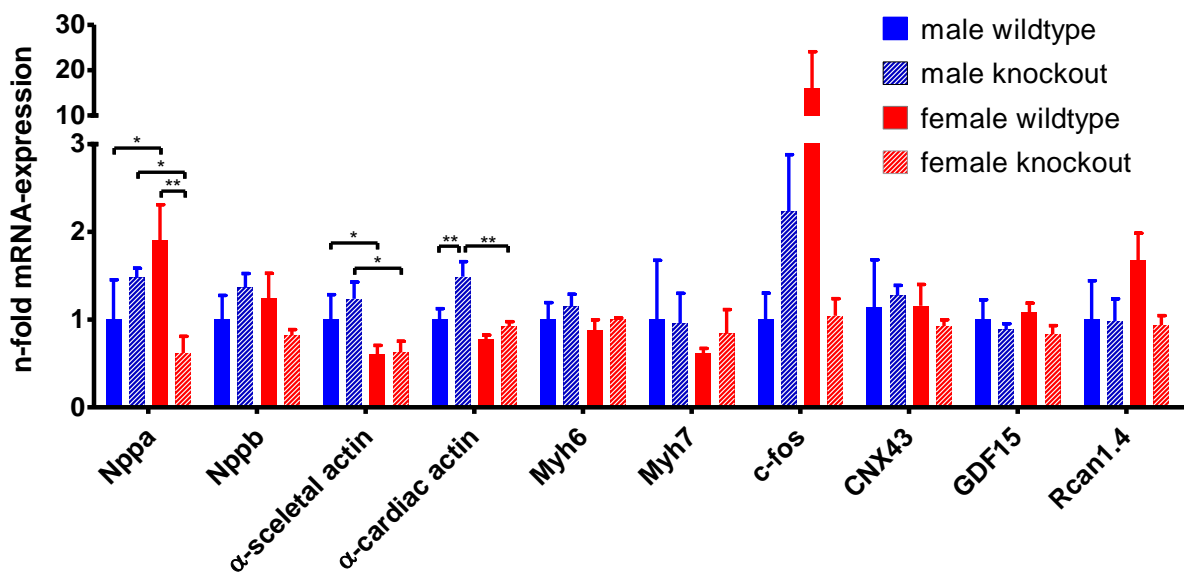


Abbildung 15: Relative Expression hypertropher und stresssensitiver Gene in Myomasp-Knockout-Mäusen. Quantitative Realtime-PCR. Die Myomasp/LRRC39-Knockout-Mäuse wurden im Alter von etwa 10 Wochen durch Genickbruch getötet, das Herz entnommen und daraus RNA isoliert. Pro Gruppe wurden vier Tiere untersucht. Balken mit Angabe des Signifikanzniveaus wurden ausschließlich bei signifikanter Regulation eingefügt, auf die Angabe „n.s.“ wurde aus Gründen der Übersicht verzichtet.

Es zeigte sich, dass Nppa-mRNA in weiblichen Knockouttieren signifikant herunterreguliert war im Vergleich zu weiblichen Wildtypen, während in männlichen

Tieren keine differentielle Regulation erkennbar war. Ebenfalls signifikant reguliert war α -cardiac actin-mRNA. Diese war in männlichen Knockout-Tieren signifikant (1,5-fach) heraufreguliert. In weiblichen Knockout-Tieren ließ sich jedoch kein Unterschied zu Wildtypen desselben Geschlechts nachweisen.

Die ergänzend durchgeführten Westernblotuntersuchungen mit Antikörpern gegen α -cardiac actin ergaben allerdings geschlechtsbezogen gegenteilige Ergebnisse: Hier war in männlichen Myomasp/LRRC39-Knockout-Mäusen kardiales Actin statistisch signifikant herunterreguliert (0,7-fach), in weiblichen Tieren hingegen heraufreguliert (1,7-fach, s. Abbildung 16).

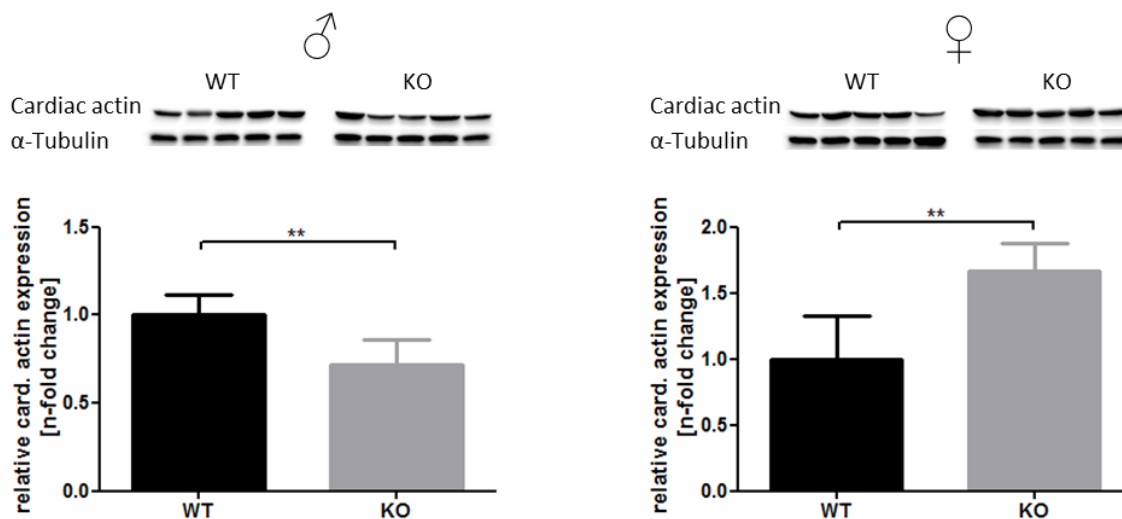


Abbildung 16: Expression von cardialem Actin im Herz der Myomasp/LRRC39-Knockout-Maus. Western Blot (oben) und densitometrische Quantifizierung (unten). Die Tiere wurden im Alter von acht bis zwölf Wochen durch Genickbruch getötet, das Herz entnommen, dessen Proteine isoliert und mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Die detektierten Banden wurden densitometrisch quantifiziert. Verwendet wurde ein monoklonaler, muriner anti-cardiac-Actin-Antikörper von Sigma (A9357).

Ebenfalls geschlechtsabhängig exprimiert waren Myomesin 1 und Myomesin 2. Beide Myomesine sind in männlichen Knockout-Tieren um mehr als 50% statistisch signifikant herunterreguliert im Vergleich zu männlichen Wildtypen. Bei den weiblichen Versuchstieren hingegen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Knockout-Tieren und Wildtypen (s. Abbildung 17).

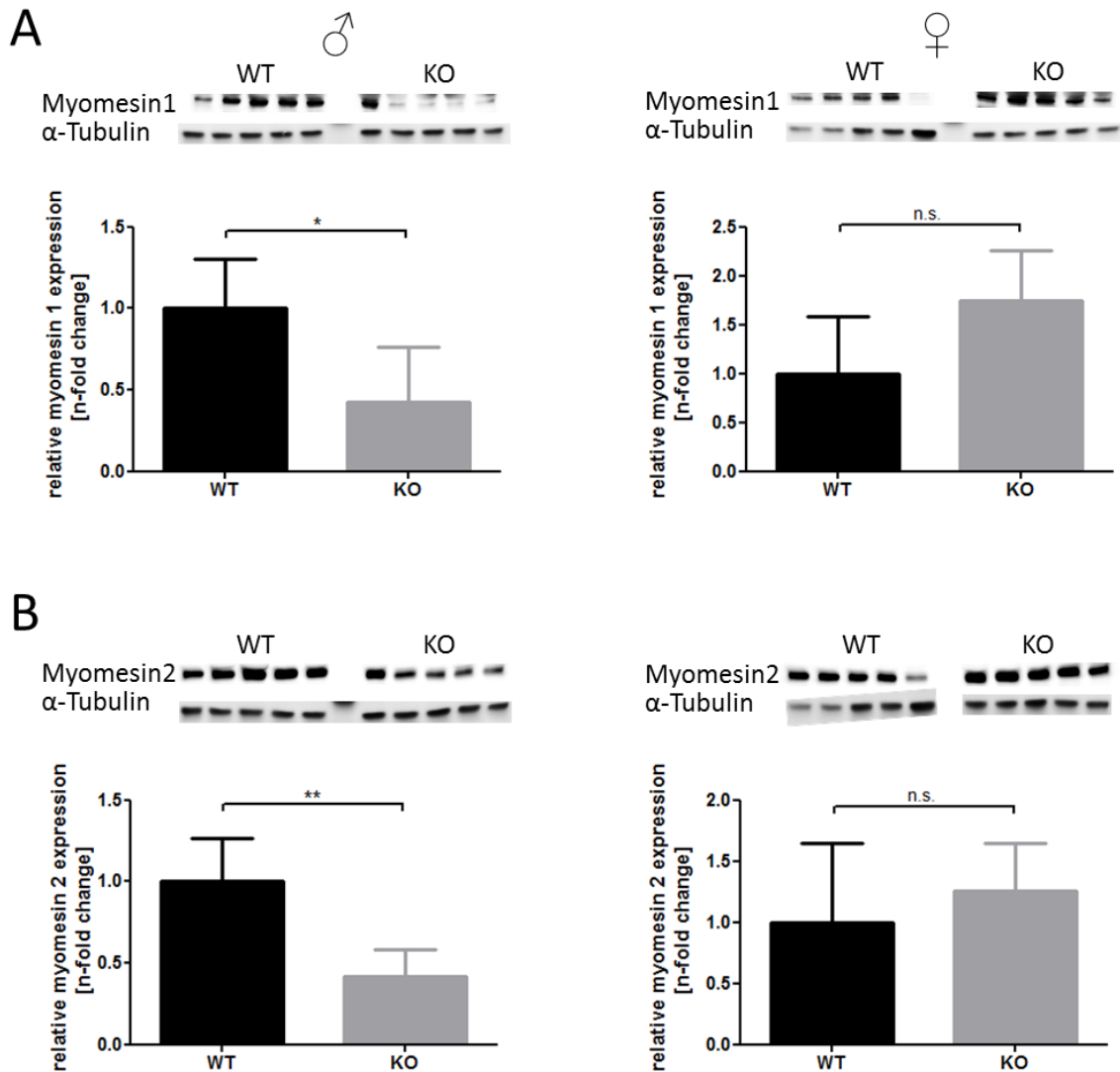


Abbildung 17: Myomesin 1- und 2-Expression im Herz der Myomasp/LRRC39-Knockout-Maus. Western Blot (jeweils oben) und densitometrische Quantifizierung (jeweils unten) von Herzlysaten aus männlichen (links) und weiblichen (rechts) Knockout-Tieren und Wildtypen unter Verwendung von Antikörpern gegen Myomesin 1 (A) und Myomesin 2 (B). Die Tiere wurden im Alter von acht bis zwölf Wochen durch Genickbruch getötet, das Herz entnommen, dessen Proteine isoliert und mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

3.2.3 Myomasp/LRRC39-Knockout-Mäuse zeigen keine veränderte Ultrastruktur ihrer Kardiomyozyten

Da Will, Eden et al. (2010) zeigen konnten, dass der Myomasp/LRRC39-Knockout im Zebrafisch zu einer veränderten Ultrastruktur der M-Bande führte, wurden auch Herz- und Skelettmuskel adulter Myomasp/LRRC39-Knockout-Mäuse elektronenmikroskopisch untersucht. Hier zeigten sich keine Veränderungen der dargestellten Zellstrukturen, insbesondere keine Veränderungen der Sarkomerarchitektur im Bereich der M-Bande / „Bare Zone“ (s. Abbildung 18).

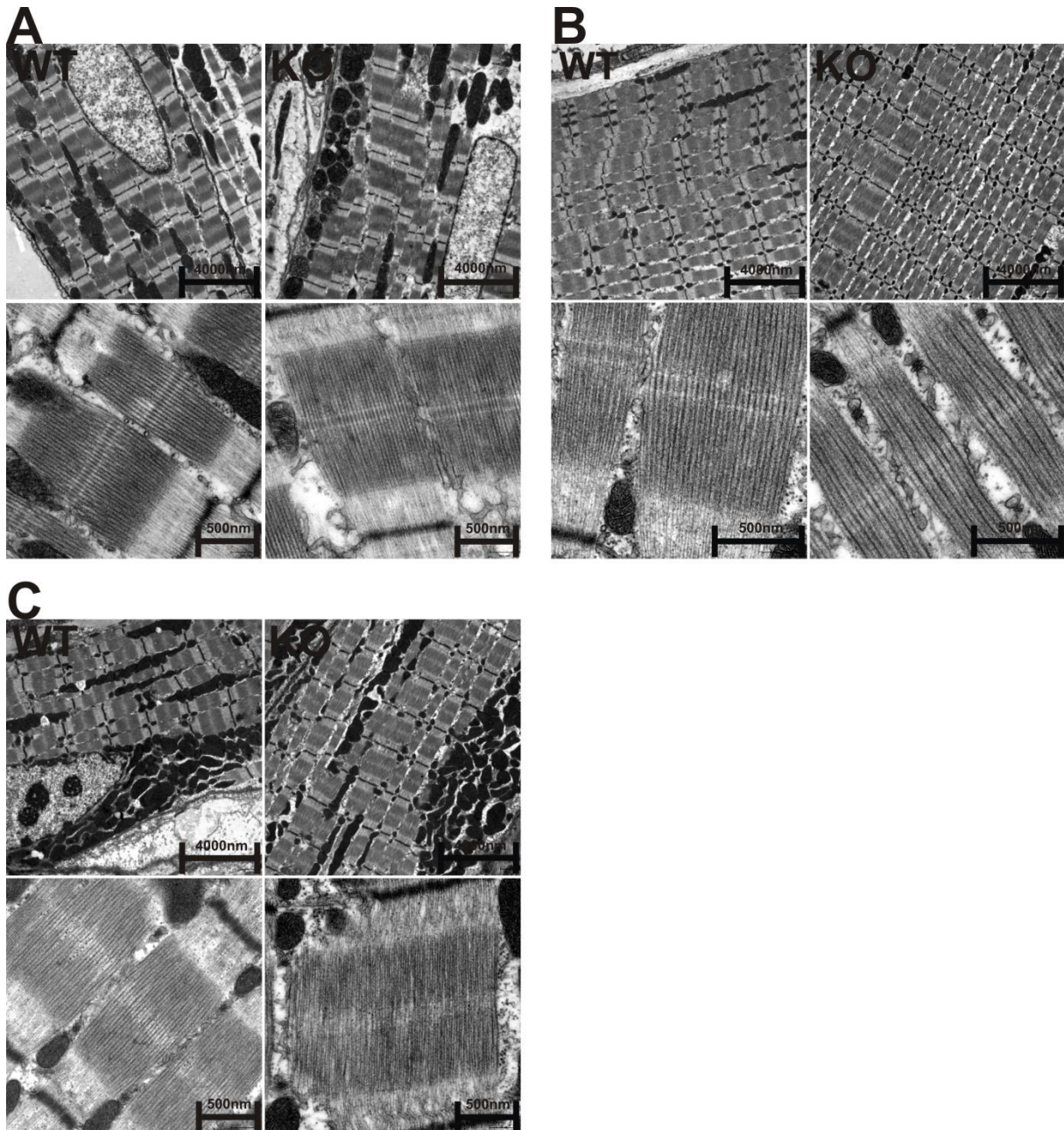


Abbildung 18: Transmissionselektronenmikroskopie adulter Myomasp-Knockout-Mäuse. Die Abbildung zeigt transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von verschiedenen Muskelgeweben der Myomasp/LRRC39-Knockout-Maus mit Fokus auf dem Sarkomer. Dargestellt sind Herzgewebe (A) sowie schnelle (B) und langsame (C) Muskelfasern des Zwerchfells. Die Mäuse wurden im Alter von 10 Wochen mit einer intraperitonealen Injektion von Ketamin/Xylazin getötet und über eine Kanüle im linken Ventrikel mit 6% Glutaraldehyd perfundiert. Die Transmissionselektronenmikroskopie erfolgte durch Prof. Dr. med. Lüllmann-Rauch am anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

4 Diskussion

Die Herzinsuffizienz ist eine häufige Erkrankung mit immenser klinischer und sozioökonomischer Bedeutung in den Industrienationen. Ihr liegen komplexe Veränderungen des Herzgewebes zugrunde, die zusammenfassend als Remodeling bezeichnet werden, und zu denen unter anderem die kardiale Hypertrophie gehört. Die Problemstellung dieser Arbeit war die Charakterisierung des dehnungssensitiven M-Bandenprotein Myomasp/LRRC39 und dessen Auswirkung auf kardiale Hypertrophie in vitro und im Knockout-Maus-Modell unter basalen Bedingungen. Es wurde untersucht, wie sich adenoviraler Knockdown und Überexpression von Myomasp/LRRC39 in neonatalen Rattenkardiomyozyten auf die planimetrische Zellgröße, das hypertrophe Genprogramm und die hypertrophieinduzierenden SRF- und Calcineurin-NFAT-Signalwege auswirken. Für die in-vivo-Charakterisierung erfolgte die Untersuchung einer Myomasp-Knockout-Maus mittels klinischer, makropathologischer, echokardiographischer, molekularbiologischer und histologischer Begutachtung unter basalen Bedingungen.

4.1 Myomasp/LRRC39 wirkt antihypertroph über die Inhibierung des Calcineurin-NFAT-Signalweges

Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Myomasp/LRRC39 sowohl die Induktion des hypertrophen Genprogramms als auch die Zunahme der Zellgröße durch Phenylephrin in neonatalen Rattenkardiomyozyten verhindern konnte. Myomasp/LRRC39 konnte somit erstmalig als Inhibitor kardialer Hypertrophie identifiziert werden.

Da die Überexpression von Myomasp/LRRC39 ebenfalls die Aktivierung eines NFAT-sensiblen Promotors durch konstitutiv aktives Calcineurin (Δ CnA) verhindern konnte, kann vermutet werden, dass Myomasp/LRRC39 über die Hemmung des Calcineurin-NFAT-Signalweges der Entstehung von Hypertrophie entgegenwirkt. Diese Hypothese wird bestärkt durch die exakt gegenteiligen Ergebnisse in Experimenten unter Myomasp/LRRC39-Knockdown: Unter Myomasp/LRRC39-Knockdown in NRVCN wurde die Induktion des hypertrophen Genprogramms sowie die Zunahme der Zellgröße durch Behandlung mit Phenylephrin noch verstärkt, ebenso die Induktion des Calcineurin-NFAT-Signalweges durch Δ CnA.

Die immense Bedeutung dieser Entdeckung ergibt sich aus der zentralen Rolle von Calcineurin in der Entstehung maladaptiver Hypertrophie: Calcineurin ist notwendig für die Entstehung von kardialer Hypertrophie auf hypertrophe Stimuli (Bueno, Wilkins et al. 2002) und ohne weitere Stimuli ausreichend, kardiale Hypertrophie zu erzeugen, wenn es konstitutiv überexprimiert wird (Molkentin, Lu et al. 1998). Die Applikation von Calcineurininhibitoren konnte in Mäusen mit genetischer Disposition für eine hypertrophe Kardiomyopathie die Entstehung einer Hypertrophie verhindern (Sussman, Lim et al. 1998). In menschlichem Myokard konnte eine vermehrte Expression von Calcineurin bei Vorliegen einer Herzinsuffizienz und –hypertrophie nachgewiesen werden (Haq, Choukroun et al. 2001). Die Entwicklung herzspezifischer Calcineurininhibitoren ist daher von großem Interesse. Nach den hier gewonnenen Erkenntnissen gibt es mit Myomasp/LRRC39 nun ein neues, potentiell Target für solch eine spezifische Herzinsuffizienztherapie.

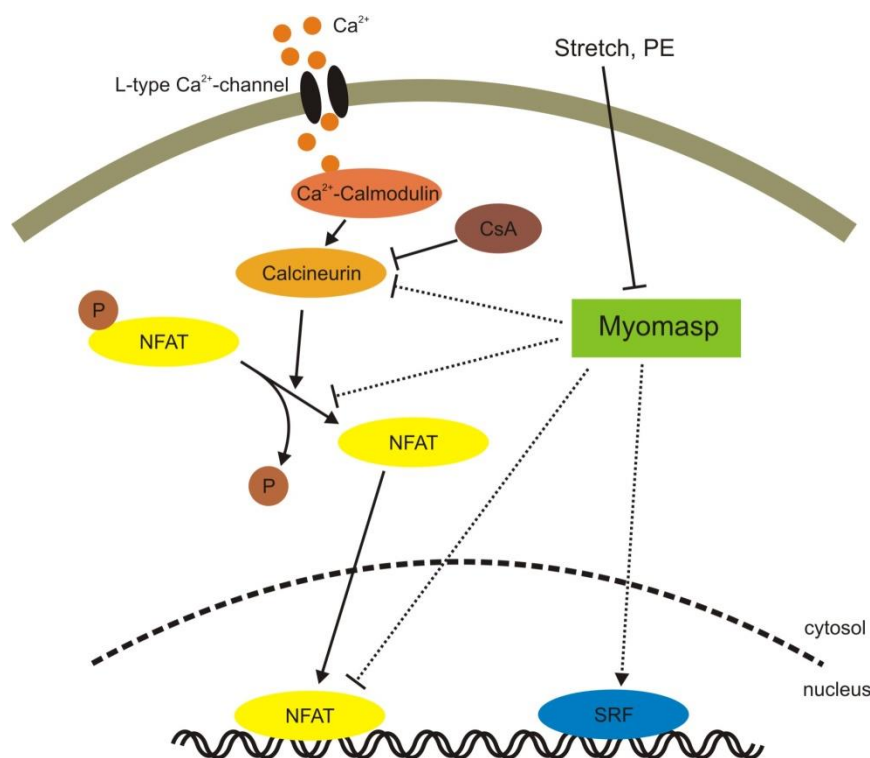


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Interaktionen von Myomasp/LRRC39 in vitro. Die Grafik zeigt die Interaktionen von Myomasp/LRRC39 mit dem Calcineurin-NFAT-Signalweg und SRF. Die Interaktionen sind als gestrichelte Linien dargestellt, da bisher nicht bekannt ist, wo genau Myomasp/LRRC39 mit den Signalwegen interagiert.

Die genaue Interaktion von Myomasp/LRRC39 und dem Calcineurin-NFAT-Signalweg ist noch unklar. Da die Induktion des Signalweges im Luciferaseassay mittels konstitutiv aktivem Calcineurin, das keiner Aktivierung durch Calmodulin oder Ca²⁺ bedarf, erfolgte, kann die Interaktion nicht upstream von Calcineurin stattfinden.

Myomasp/LRRC39 muss also Calcineurin selbst, die Dephosphorylierung von NFAT oder dessen Translokation und Bindung an die DNA direkt oder indirekt beeinflussen. Fraglich ist, wie diese Interaktion möglich ist angesichts der Tatsache, dass Myomasp/LRRC39 an der M-Bande lokalisiert ist (Will, Eden et al. 2010), während Calcineurin überwiegend an der Z-Scheibe lokalisiert ist (Frey, Richardson et al. 2000).

Es existieren drei mögliche Erklärungen für eine Interaktion trotz der vermuteten räumlichen Trennung: 1. Eine Dissoziation von Calcineurin von der Z-Scheibe. Calcineurin befindet sich zu einem großen Teil an der Z-Scheibe, wo es unter anderem durch Calsarcin an α -Actinin gebunden wird (Frey, Richardson et al. 2000). Jedoch gibt es Belege, dass Calcineurin unter bestimmten Bedingungen eine Dislokation von der Z-Scheibe erfährt, beispielsweise durch eine verminderte Expression von muscle LIM protein, kurz MLP (Heineke, Ruetten et al. 2005) oder durch eine vermehrte Expression von protein kinase C-interacting cousin of thioredoxin, kurz PICOT (Jeong, Kim et al. 2008). Es ist somit zu vermuten, dass auch unter physiologischen Bedingungen ein Teil des intrazellulären Calcineurinpools nicht an der Z-Scheibe, sondern beispielsweise frei im Zytosol vorliegt. Eine direkte Interaktion mit Myomasp/LRRC39 wäre demnach möglich.

Die zweite Erklärung wäre, analog zur vorherigen, eine Dissoziation von Myomasp/LRRC39 von der M-Bande. Die bisherigen Erkenntnisse über die intrazelluläre Lokalisation von Myomasp beschränken sich auf die immunhistochemische Kolo-kalisation von Myomasp/LRRC39 mit M-Bandenproteinen unter basalen Bedingungen sowie auf den Nachweis einer Interaktion von Myomasp/LRRC39 mit der M-Banden-Domäne von MYH7 im Yeast-2-Hybrid-Screen (Will, Eden et al. 2010). Nicht bekannt ist hingegen, ob auch Myomasp/LRRC39 unter bestimmten Bedingungen, wie beispielsweise mechanischer Dehnung oder humoraler Stimulation, eine Translokation in andere Zellkompartimente erfährt, die eine direkte Interaktion mit Calcineurin ermöglichen würde.

Eine dritte und letzte Erklärung für die Interaktion von Calcineurin und Myomasp/LRRC39 trotz räumlicher Trennung wäre eine indirekte Interaktion über Mediatoren. So könnte Myomasp/LRRC39 beispielsweise direkt oder über eine Änderung der M-Banden-Architektur, welche angesichts der veränderten

Ultrastruktur im Myomasp/LRRC39-Knockout-Zebrafisch (Will, Eden et al. 2010) sowie der veränderten Expression der Myomesine in der Myomasp/LRRC39-Knockout-Maus (s. Abbildung 17) wahrscheinlich erscheint, einen bisher nicht identifizierten Inhibitor oder Aktivator von Calcineurin binden oder freisetzen, je nachdem ob pro- oder antihypertrophe Stimuli vorliegen.

4.2 Myomasp/LRRC39 induziert den SRF-Signalweg möglicherweise über eine Erhöhung der Stabilität des TK-NBR1-p62-MURF2-Komplexes

Die M-Bande wurde in Bezug auf kardiale Hypertrophie wiederholt mit dem SRF-Signalweg in Verbindung gebracht (Lange, Xiang et al. 2005). Will, Eden et al. (2010) konnten zudem zeigen, dass eine verminderte Expression von M-Banden assoziiertem Myomasp/LRRC39 zu einer Inhibierung des SRF-Signalweges führt (Will, Eden et al. 2010). Ergänzend hierzu konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Überexpression von Myomasp/LRRC39 zu einer Induktion des SRF-Signalweges führt. Dennoch besitzt Myomasp/LRRC39 letztlich eine antihypertrophe Wirkung, wie mittels planimetrischer Bestimmung der Zellgröße von NRVCN gezeigt werden konnte (s. Abbildung 8). Die zuvor diskutierte Hemmung des Calcineurin-NFAT-Signalweges scheint also die Induktion des SRF-Signalweges zu überwiegen.

Für die Induktion des SRF-Signalweges durch Myomasp/LRRC39 gibt es zwei mögliche Erklärungen: Entweder wird der SRF-Signalweg direkt durch Myomasp/LRRC39 beeinflusst oder es handelt sich lediglich um eine kompensatorische Gegenregulation infolge der Repression des Calcineurin-NFAT-Signalweges (theoretisch wäre auch der umgekehrte Fall denkbar, also eine kompensatorische Repression des Calcineurin-NFAT-Signalweges infolge einer Aktivierung des SRF-Signalweges. Da es sich hierbei jedoch angesichts des antihypertrophen Effektes von Myomasp um eine starke Überkompensation handeln würde, erscheint dies weniger wahrscheinlich).

Eine direkte Interaktion mit dem SRF-Signalweg könnte über eine Beeinflussung der Stabilität des TK-NBR1-p62-MURF2-Komplexes erfolgen. Die Bildung dieses an der M-Bande lokalisierten Komplexes wird induziert durch eine mechanische Konformationsänderung der Titinkinasedomäne (TK), welche zur Bindung von NBR1

an die TK führt. Über p62 erfolgt die Rekrutierung von MURF2 an die M-Bande, sodass dieses nicht nach intranukleär translozieren kann, wo es als Inhibitor von SRF fungiert (Lange, Xiang et al. 2005). Es kommt somit zu einer Enthemmung von SRF. Myomasp müsste demnach diesen Komplex stabilisieren, um eine Aktivierung des SRF-Signalweges zu bewirken.

Die Stabilisierung des TK-NBR1-p62-MURF2-Komplexes durch Myomasp/LRRC39 könnte auf zwei Arten erfolgen: die erste wäre ein direkte Interaktion, also eine Bindung von Myomasp an den Komplex bzw. an einen Bestandteil des Komplexes. Zwar waren in einem Yeast-2-Hybrid-Screen keine Bestandteile des Komplexes als direkte Interaktionspartner von Myomasp/LRRC39 identifiziert worden, eine Interaktion ist hierdurch jedoch nicht ausgeschlossen.

Die zweite Möglichkeit einer Komplexstabilisierung durch Myomasp/LRRC39 wäre die indirekte Beeinflussung über eine Veränderung der M-Bandenarchitektur. Zwar konnten in der Myomasp/LRRC39-Knockout-Maus elektronenmikroskopisch keine ultrastrukturellen Veränderungen der M-Bande nachgewiesen werden (s. Abbildung 18). Die veränderte Expression von Myomesin 1 und Myomesin 2 in der Myomasp/LRRC39-Knockout-Maus (s. Abbildung 17) sowie die veränderte M-Banden-Ultrastruktur im Zebrafisch unter Myomasp/LRRC39-Knockout (Will, Eden et al. 2010) lassen jedoch eine Veränderung der M-Bandenarchitektur vermuten, welche sich auf den TK-NBR1-p62-MURF2-Komplex auswirken könnte. Zur weiteren Evaluation dieser Hypothese sind weitere Experimente zur Bestimmung der genauen Lokalisation von NBR1, p62, MURF2 und SRF unter Myomasp/LRRC39-Knockdown und -Überexpression notwendig.

4.3 Der Knockout von Myomasp/LRRC39 in vivo bewirkt eine latente Veränderung der M-Banden-Architektur ohne funktionelle oder morphologische Veränderungen unter basalen Bedingungen

Der Knockout von Myomasp/LRRC39 in Mäusen führte unter basalen Bedingungen zu einem unauffälligen Phänotyp. Die Tiere entwickelten keine spontane Hypertrophie oder signifikante Fibrose und zeigten keine signifikanten funktionellen Unterschiede zu Wildtypen derselben Zucht in der echokardiographischen Untersuchung. Erhöhte Sterblichkeit oder auffälliges Verhalten im Vergleich zu

Wildtypen ließ sich nicht beobachten. Auch ergaben sich keine Hinweise auf eine Lungen- oder Leberkongestion in Folge eines Rechts- oder Linksherzversagen.

Das fetale Genprogramm zeigte sich in quantitativen Realtime-PCR-Untersuchungen nicht erhöht. Lediglich α -cardiac actin zeigte sich signifikant heraufreguliert in weiblichen und signifikant herunterreguliert in männlichen Tieren. Ebenfalls geschlechtsabhängige Veränderungen der Expression zeigten Myomesin 1 und Myomesin 2.

Dass funktionelle und molekularbiologische Unterschiede in der (Patho-) Physiologie des Herzens zwischen männlichen und weiblichen Tieren und Menschen bestehen, wurde bereits mehrfach beschrieben. So ist bekannt, dass adulte weibliche Ratten in ihrem Myokard unter physiologischen Bedingungen signifikant mehr α - und β -MHC, α -skeletal und α -cardiac actin sowie Connexin 43 exprimieren als gleichaltrige Männchen (Rosenkranz-Weiss, Tomek et al. 1994) und dass eine hypertrophe Kardiomyopathie-assoziierte Mutation im kardialen Myosin bindenden Protein C (MyBPC) in Mäusen unter körperlicher Belastung zur Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie in weiblichen, nicht jedoch in männlichen Tieren führt (Najafi, Schlossarek et al. 2015). Durch epidemiologische Studien konnte außerdem festgestellt werden, dass das Gesamtrisiko für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz für Frauen geringer ist als für Männer. Jedoch haben Frauen ein höheres Risiko als Männer, an einer Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion zu erkranken (Meyer, Brouwers et al. 2015).

Als Erklärung für diese Beobachtungen wird die Wirkung von Estrogenen über die im Herzmuskel exprimierten Estrogenrezeptoren α und β diskutiert. So konnte gezeigt werden, dass weibliche Mäuse eine geringere kardiale Hypertrophie durch Druckbelastung infolge einer operativen Verengung der Aorta entwickeln als Männchen, und dass dieser protektive Effekt durch die Deletion des Estrogenrezeptor β entfällt (Skavdahl, Steenbergen et al. 2005). Unter Knockout des Estrogenrezeptor α zeigten sich lediglich minimale funktionelle Unterschiede im Vergleich zu Wildtypen. Es konnten aber 56 Gene identifiziert werden, die in männlichen und weiblichen Tieren unterschiedlich reguliert waren (Devanathan, Whitehead et al. 2014). Jedoch befanden sich weder Myomesin 1 und 2 noch α -cardiac actin hierunter. Ebenso keine Erwähnung finden diese Proteine in der

Publikation von Weinberg et al. (2003): Hier wurde in Mäusen mittels mRNA-microarray-Analyse nach geschlechtsabhängigen Unterschieden in der Reaktion des linken Ventrikels auf Druckbelastung gesucht (Weinberg, Mirotso et al. 2003).

Somit bleibt die Ursache des unterschiedlichen Effekts des Myomasp/LRRC39-Knockouts auf weibliche und männliche Tiere unklar. Von großem Interesse wird sein, ob sich die Phänotypen von weiblichen und männlichen Tieren unter kardialer Belastung (s. unten) unterscheiden werden.

In der Transmissionselektronenmikroskopie von Herz- und Skelettmuskel zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Ultrastruktur zwischen Myomasp/LRRC39-Knockout-Mäusen und Wildtypen. Insbesondere zeigte sich keine Destruktion oder wahrnehmbare Alteration der M-Bande, wie sie in Zebrafischen mit Myomasp/LRRC39-Knockout nachgewiesen werden konnte (Will, Eden et al. 2010). Allerdings ließ sich mittels Westernblot eine signifikant verringerte Expression von Myomesin 1 und Myomesin 2 in männlichen Tieren nachweisen. Dies stand in Einklang mit den Ergebnissen von Will, Eden et al. (2010), die zeigen konnten, dass der Knockdown von Myomasp/LRRC39 zu einer verminderten Expression von Myomesin 1 und 2 in NRVCM führte. Da die Myomesine zentrale Bestandteile der M-Bande sind (Agarkova and Perriard 2005), liegt es nahe, dass eine Veränderung ihrer Expression zwangsläufig mit einer Veränderung der M-Banden-Architektur einhergeht. Somit kann vermutet werden, dass in der Myomasp/LRRC39-Knockout-Maus eine latente, subklinische Veränderung der M-Banden-Architektur vorliegt.

Anders als der Myomasp/LRRC39-Knockdown in vitro führte also der Myomasp/LRRC39-Knockout im Mausmodell nicht zu einem manifesten Phänotyp im Sinne einer Herzinsuffizienz oder einer Hypertrophie. Es gilt jedoch zu bedenken, dass sich Ergebnisse aus Zellkulturexperimenten nicht direkt übertragen lassen auf komplexe Organismen. So bestanden die Zellkulturen, die für diese Arbeit verwendet wurden, zu fast 100% aus Kardiomyozyten. Tatsächlich besteht das adulte Mauserz nur zu etwa 56% aus Kardiomyozyten. Die übrigen 44% setzen sich zusammen aus Fibroblasten (27%), Endothelzellen (7%) und glatten Gefäßmuskelzellen (10%) (Banerjee, Fuseler et al. 2007). Durch oftmals komplexe para- und autokrine Interaktionen haben diese Zellen einen wichtigen Einfluss auf die Regulation von Hypertrophie, der in vitro nur unzureichend berücksichtigt werden kann. So ist

beispielsweise bekannt, dass die vermehrte Angiogenese durch Überexpression des vaskulären Wachstumsfaktor PR39 in adulten Mäusen bereits ohne Zugabe hypertropher Stimuli zur Ausbildung einer kardialen Hypertrophie führt (Tirziu, Chorianopoulos et al. 2007). Ebenso hypertroph wirken im Gefäßendothel synthetisiertes Stickstoffmonoxid (NO) (Jaba, Zhuang et al. 2013) und NRG-1 (Baliga, Pimental et al. 1999), während das ebenfalls im Gefäßendothel synthetisierte Apelin antihypertroph wirkt (Scimia, Hurtado et al. 2012). Kardiale Fibroblasten besitzen eine hypertrophe Wirkung über die Sezernierung der Wachstumsfaktoren TGF- β (Cartledge, Kane et al. 2015), FGF-2 (Schultz, Witt et al. 1999), CTGF (=CCN2) (Hayata, Fujio et al. 2008) und IGF-1 (McMullen, Shioi et al. 2004), sowie eine antihypertrophe Wirkung über die Sezernierung von Adrenomedullin (Tsuruda, Kato et al. 1998, Tsuruda, Kato et al. 1999) und Interleukin-33 (Sanada, Hakuno et al. 2007). Auch Entzündungszellen sind Ausgangspunkt parakriner Interaktionen am Herzen: eine Beeinträchtigung der Makrophagenfunktion führt zu einer verminderten Ausbildung von Hypertrophie und Fibrose auf hypertrophe Stimuli (Ikeda, Ichiki et al. 2013, Li, Zhang et al. 2014), ebenso wie der Verlust von CD4⁺-T-Zellen (Laroumanie, Douin-Echinard et al. 2014). Angesichts dieser vielfältigen Einflüsse durch „Nichtkardiomyozyten“ erscheinen Unterschiede zwischen in vitro- und in vivo-Ergebnissen grundsätzlich nicht verwunderlich.

Des Weiteren gilt es zu bedenken, dass sich die Auswirkungen einer verminderten Expression eines Proteins unterscheiden können, je nachdem, ob es sich um einen Knockdown in neonatalen Zellen, die nur wenige Tage in Kultur gehalten werden können, handelt, oder um einen vollständigen Verlust eines Proteins von Beginn der embryonalen Entwicklung an. Letzteres bedingt oft komplexe Adaptionsmechanismen, die die Lebensfähigkeit des Embryos erhalten sollen. Es ist denkbar, dass die hypertrophe Wirkung des Myomasp/LRRC39-Knockouts durchaus auch in vivo existent ist, jedoch kompensiert wird durch die verminderte Aktivität hypertropher Signale bzw. durch Zunahme antihypertropher Signale. Der Mausorganismus wäre in diesem Fall also in der Lage, eine Homöostase der verschiedenen pro- und antihypertrophen Signalwege unter Berücksichtigung der fehlenden antihypertrophen Wirkung von Myomasp/LRRC39 zu schaffen. Dies würde

die veränderten Expressionen von α -cardiac actin und den Myomesinen 1 und 2 ohne manifesten Phänotyp erklären.

Um die Bedeutung von Myomasp/LRRC39 im Kontext kardialer Hypertrophie in vivo exakter aufzuklären, wird die funktionelle, morphologische und molekularbiologische Charakterisierung der Myomasp/LRRC39-Knockout-Maus unter kardialer Belastung notwendig sein. So kann durch eine operative Verengung des Aortenbogens eine Druckbelastung des linken Ventrikels, wie sie auch bei einer Aortenklappenstenose oder arteriellem Bluthochdruck vorliegt, induziert werden oder durch Implantation einer Isoprenalin sezernierenden Minipumpe eine andauernde neurohumorale Stimulation des Herzens erfolgen. Hierunter wird sich nachweisen lassen, ob der Myomasp/LRRC39-Knockout die Reaktion des Organismus auf diese Hypertrophiestimuli beeinflusst. Es ist denkbar, dass, analog zur verstärkten Wirkung von Phenylephrin durch Myomasp/LRRC39-Knockdown in NRVCN, die fehlende, antihypertrophe Wirkung von Myomasp/LRRC39 zu einer Aggravation der kardialen Hypertrophie führen wird. In einem nächsten Schritt sollte dann die Generierung einer transgenen Mauslinie erfolgen, die Myomasp/LRRC39 überexprimiert. Es wäre zu erwarten, dass diese Tiere eine verminderte Reaktion zeigen auf hypertrophe Stimuli. Wäre dies der Fall, wäre Myomasp/LRRC39 tatsächlich als potentielles Target für eine gezielte Therapie von kardialer Hypertrophie identifiziert.

5 Zusammenfassung

Herzinsuffizienz und -hypertrophie stellen Erkrankungen von immenser medizinischer und sozioökonomischer Bedeutung insbesondere in den Industrienationen dar. Trotz intensiver Erforschung in den letzten Jahrzehnten ist das Wissen um ihre Entstehung immer noch lückenhaft. Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des bisher wenig erforschten M-Bandenproteins Myomasp/LRRC39 im Kontext kardialer Hypertrophie. Hierzu wurde erstens die Wirkung von Myomasp/LRRC39-Überexpression und -Knockdown in neonatalen Rattenkardiomyozyten auf die Entstehung von Hypertrophie untersucht. Zweitens erfolgte die basale Phänotypisierung einer Myomasp/LRRC39-Knockout-Maus nach funktionellen, morphologischen und molekularbiologischen Gesichtspunkten.

Durch diese Arbeit konnte Myomasp/LRRC39 erstmals als Regulator von Hypertrophie in Kardiomyozyten *in vitro* identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass überexprimiertes Myomasp/LRRC39 die durch Phenylephrin induzierte Hypertrophie in neonatalen Rattenkardiomyozyten verhindern kann, während ein Myomasp/LRRC39-Knockdown diese verstärkt und selbst eine Hypertrophie induziert. Des Weiteren wurde gezeigt, dass der Calcineurin-NFAT-Signalweg durch Myomasp/LRRC39-Überexpression inhibiert und durch Myomasp/LRRC39-Knockdown induziert wird. Dies legt nahe, dass Myomasp/LRRC39 seine antihypertrophe Wirkung über den Calcineurin-NFAT-Signalweg entfaltet. Anders als die *in vitro* gewonnenen Daten vermuten ließen, zeigte die Myomasp/LRRC39-Knockout-Maus unter basalen Bedingungen keinen auffälligen Phänotyp: Es konnten hinsichtlich kardialer Morphologie und Funktion keine Unterschiede im Vergleich zu Wildtypen festgestellt werden. Lediglich die Proteine α -cardiac actin, Myomesin 1 und Myomesin 2 waren durch den Knockout bereits unter basalen Bedingungen geschlechtsabhängig beeinflusst. Dies deutet auf latente, subklinische Veränderungen in der Regulation von SRF- und Calcineurin-Signaling sowie der M-Bandenarchitektur hin. Es ist zu vermuten, dass die hypertrophe Wirkung des Myomasp/LRRC39-Knockouts unter basalen Bedingungen durch die Aktivierung antihypertropher Gegenregulationen kompensiert wird. Essentiell für das weitere Vorgehen wird sein, den Phänotyp der Myomasp/LRRC39-Knockout-Maus unter kardialer Belastung zu untersuchen sowie den genauen Mechanismus zu ermitteln, durch den Myomasp/LRRC39 mit dem Calcineurin-NFAT-Signalweg interagiert, um

so die genaue Funktion von Myomasp/LRRC39 als vielversprechendem Regulator kardialer Hypertrophie zu bestimmen.

6 Literaturverzeichnis

- Agarkova, I., D. Auerbach, E. Ehler and J. C. Perriard (2000). "A novel marker for vertebrate embryonic heart, the EH-myomesin isoform." *J Biol Chem* **275**(14): 10256-10264.
- Agarkova, I. and J. C. Perriard (2005). "The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere." *Trends Cell Biol* **15**(9): 477-485.
- Badorff, C., F. H. Seeger, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2005). "Glycogen synthase kinase 3beta inhibits myocardin-dependent transcription and hypertrophy induction through site-specific phosphorylation." *Circ Res* **97**(7): 645-654.
- Baliga, R. R., D. R. Pimental, Y. Y. Zhao, W. W. Simmons, M. A. Marchionni, D. B. Sawyer and R. A. Kelly (1999). "NRG-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. Role of PI-3-kinase, p70(S6K), and MEK-MAPK-RSK." *Am J Physiol* **277**(5 Pt 2): H2026-2037.
- Banerjee, I., J. W. Fuseler, R. L. Price, T. K. Borg and T. A. Baudino (2007). "Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**(3): H1883-1891.
- Bueno, O. F., B. J. Wilkins, K. M. Tymitz, B. J. Glascock, T. F. Kimball, J. N. Lorenz and J. D. Molkenin (2002). "Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta -deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(7): 4586-4591.
- Carlsson, E. and L. E. Thornell (1987). "Diversification of the myofibrillar M-band in rat skeletal muscle during postnatal development." *Cell Tissue Res* **248**(1): 169-180.
- Cartledge, J. E., C. Kane, P. Dias, M. Tesfom, L. Clarke, B. McKee, S. Al Ayoubi, A. Chester, M. H. Yacoub, P. Camelliti and C. M. Terracciano (2015). "Functional crosstalk between cardiac fibroblasts and adult cardiomyocytes by soluble mediators." *Cardiovasc Res* **105**(3): 260-270.
- de Bold, A. J., B. G. Bruneau and M. L. Kuroski de Bold (1996). "Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart." *Cardiovasc Res* **31**(1): 7-18.
- Devanathan, S., T. Whitehead, G. G. Schweitzer, N. Fettig, A. Kovacs, K. S. Korach, B. N. Finck and K. I. Shoghi (2014). "An animal model with a cardiomyocyte-specific deletion of estrogen receptor alpha: functional, metabolic, and differential network analysis." *PLoS One* **9**(7): e101900.
- Dickstein, K., A. Cohen-Solal, G. Filippatos, J. J. McMurray, P. Ponikowski, P. A. Poole-Wilson, A. Stromberg, D. J. van Veldhuisen, D. Atar, A. W. Hoes, A. Keren, A. Mebazaa, M. Nieminen, S. G. Priori and K. Swedberg (2008). "ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)." *Eur Heart J* **29**(19): 2388-2442.
- Flanagan, W. M., B. Corthesy, R. J. Bram and G. R. Crabtree (1991). "Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A." *Nature* **352**(6338): 803-807.
- Frey, N., T. Barrientos, J. M. Shelton, D. Frank, H. Rutten, D. Gehring, C. Kuhn, M. Lutz, B. Rothermel, R. Bassel-Duby, J. A. Richardson, H. A. Katus, J. A. Hill and E. N. Olson (2004). "Mice lacking calsarcin-1 are sensitized to calcineurin signaling and show accelerated cardiomyopathy in response to pathological biomechanical stress." *Nat Med* **10**(12): 1336-1343.
- Frey, N. and E. N. Olson (2003). "Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly." *Annu Rev Physiol* **65**: 45-79.
- Frey, N., J. A. Richardson and E. N. Olson (2000). "Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26): 14632-14637.
- Haq, S., G. Choukroun, H. Lim, K. M. Tymitz, F. del Monte, J. Gwathmey, L. Grazette, A. Michael, R. Hajjar, T. Force and J. D. Molkenin (2001). "Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure." *Circulation* **103**(5): 670-677.
- Hayata, N., Y. Fujio, Y. Yamamoto, T. Iwakura, M. Obana, M. Takai, T. Mohri, S. Nonen, M. Maeda and J. Azuma (2008). "Connective tissue growth factor induces cardiac hypertrophy through Akt signaling." *Biochem Biophys Res Commun* **370**(2): 274-278.

- Heineke, J., H. Ruetten, C. Willenbockel, S. C. Gross, M. Naguib, A. Schaefer, T. Kempf, D. Hilfiker-Kleiner, P. Caroni, T. Kraft, R. A. Kaiser, J. D. Molkenkin, H. Drexler and K. C. Wollert (2005). "Attenuation of cardiac remodeling after myocardial infarction by muscle LIM protein-calcineurin signaling at the sarcomeric Z-disc." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(5): 1655-1660.
- Ikeda, J., T. Ichiki, H. Matsuura, E. Inoue, J. Kishimoto, A. Watanabe, C. Sankoda, S. Kitamoto, T. Tokunou, K. Takeda, G. H. Fong and K. Sunagawa (2013). "Deletion of *phd2* in myeloid lineage attenuates hypertensive cardiovascular remodeling." *J Am Heart Assoc* **2**(3): e000178.
- Jaba, I. M., Z. W. Zhuang, N. Li, Y. Jiang, K. A. Martin, A. J. Sinusas, X. Papademetris, M. Simons, W. C. Sessa, L. H. Young and D. Tirziu (2013). "NO triggers RGS4 degradation to coordinate angiogenesis and cardiomyocyte growth." *J Clin Invest* **123**(4): 1718-1731.
- Janknecht, R., W. H. Ernst, V. Pingoud and A. Nordheim (1993). "Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases." *EMBO J* **12**(13): 5097-5104.
- Jeong, D., J. M. Kim, H. Cha, J. G. Oh, J. Park, S. H. Yun, E. S. Ju, E. S. Jeon, R. J. Hajjar and W. J. Park (2008). "PICOT attenuates cardiac hypertrophy by disrupting calcineurin-NFAT signaling." *Circ Res* **102**(6): 711-719.
- Klee, C. B., G. F. Draetta and M. J. Hubbard (1988). "Calcineurin." *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **61**: 149-200.
- Lange, S., F. Xiang, A. Yakovenko, A. Vihola, P. Hackman, E. Rostkova, J. Kristensen, B. Brandmeier, G. Franzen, B. Hedberg, L. G. Gunnarsson, S. M. Hughes, S. Marchand, T. Sejersen, I. Richard, L. Edstrom, E. Ehler, B. Udd and M. Gautel (2005). "The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover." *Science* **308**(5728): 1599-1603.
- Laroumanie, F., V. Douin-Echinard, J. Pozzo, O. Lairez, F. Tortosa, C. Vinel, C. Delage, D. Calise, M. Dutaur, A. Parini and N. Pizzinat (2014). "CD4+ T cells promote the transition from hypertrophy to heart failure during chronic pressure overload." *Circulation* **129**(21): 2111-2124.
- Li, C., Y. Y. Zhang, R. A. Frieler, X. J. Zheng, W. C. Zhang, X. N. Sun, Q. Z. Yang, S. M. Ma, B. Huang, S. Berger, W. Wang, Y. Wu, Y. Yu, S. Z. Duan and R. M. Mortensen (2014). "Myeloid mineralocorticoid receptor deficiency inhibits aortic constriction-induced cardiac hypertrophy in mice." *PLoS One* **9**(10): e110950.
- Liu, J., J. D. Farmer, Jr., W. S. Lane, J. Friedman, I. Weissman and S. L. Schreiber (1991). "Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes." *Cell* **66**(4): 807-815.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method." *Methods* **25**(4): 402-408.
- Luther, P. K. and J. M. Squire (1980). "Three-dimensional structure of the vertebrate muscle A-band. II. The myosin filament superlattice." *J Mol Biol* **141**(4): 409-439.
- McMullen, J. R., T. Shioi, W. Y. Huang, L. Zhang, O. Tarnavski, E. Bisping, M. Schinke, S. Kong, M. C. Sherwood, J. Brown, L. Riggi, P. M. Kang and S. Izumo (2004). "The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110α) pathway." *J Biol Chem* **279**(6): 4782-4793.
- McMurray, J. J., M. Packer, A. S. Desai, J. Gong, M. P. Lefkowitz, A. R. Rizkala, J. L. Rouleau, V. C. Shi, S. D. Solomon, K. Swedberg and M. R. Zile (2014). "Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure." *N Engl J Med* **371**(11): 993-1004.
- Mercadier, J. J., A. M. Lompre, C. Wisniewsky, J. L. Samuel, J. Bercovici, B. Swynghedauw and K. Schwartz (1981). "Myosin isoenzyme changes in several models of rat cardiac hypertrophy." *Circ Res* **49**(2): 525-532.
- Meyer, S., F. P. Brouwers, A. A. Voors, H. L. Hillege, R. A. de Boer, R. T. Gansevoort, P. van der Harst, M. Rienstra, I. C. van Gelder, D. J. van Veldhuisen, W. H. van Gilst and P. van der Meer (2015). "Sex differences in new-onset heart failure." *Clin Res Cardiol* **104**(4): 342-350.
- Miano, J. M., N. Ramanan, M. A. Georger, K. L. de Mesy Bentley, R. L. Emerson, R. O. Balza, Jr., Q. Xiao, H. Weiler, D. D. Ginty and R. P. Misra (2004). "Restricted inactivation of serum response factor to the cardiovascular system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(49): 17132-17137.
- Miralles, F., G. Posern, A. I. Zaromytidou and R. Treisman (2003). "Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL." *Cell* **113**(3): 329-342.

- Molkentin, J. D. (2000). "Calcineurin and beyond: cardiac hypertrophic signaling." Circ Res **87**(9): 731-738.
- Molkentin, J. D., J. R. Lu, C. L. Antos, B. Markham, J. Richardson, J. Robbins, S. R. Grant and E. N. Olson (1998). "A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy." Cell **93**(2): 215-228.
- Mudd, J. O. and D. A. Kass (2008). "Tackling heart failure in the twenty-first century." Nature **451**(7181): 919-928.
- Nag, A. C. and M. Cheng (1986). "Biochemical evidence for cellular dedifferentiation in adult rat cardiac muscle cells in culture: expression of myosin isozymes." Biochem Biophys Res Commun **137**(2): 855-862.
- Najafi, A., S. Schlossarek, E. D. van Deel, N. van den Heuvel, A. Guclu, M. Goebel, D. W. Kuster, L. Carrier and J. van der Velden (2015). "Sexual dimorphic response to exercise in hypertrophic cardiomyopathy-associated MYBPC3-targeted knock-in mice." Pflugers Arch **467**(6): 1303-1317.
- Nelson, T. J., R. Balza Jr., Q. Xiao and R. P. Misra (September 2005). "SRF-dependent gene expression in isolated cardiomyocytes: Regulation of genes involved in cardiac hypertrophy." Journal of Molecular and Cellular Cardiology **39**(3): 479-489.
- Norman, C., M. Runswick, R. Pollock and R. Treisman (1988). "Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element." Cell **55**(6): 989-1003.
- Packer, M., M. B. Fowler, E. B. Roecker, A. J. Coats, H. A. Katus, H. Krum, P. Mohacsi, J. L. Rouleau, M. Tendera, C. Staiger, T. L. Holcslaw, I. Amann-Zalan and D. L. DeMets (2002). "Effect of carvedilol on the morbidity of patients with severe chronic heart failure: results of the carvedilol prospective randomized cumulative survival (COPERNICUS) study." Circulation **106**(17): 2194-2199.
- Parlakian, A., C. Charvet, B. Escoubet, M. Mericskay, J. D. Molkentin, G. Gary-Boobo, L. J. De Windt, M. A. Ludosky, D. Paulin, D. Daegelen, D. Tuil and Z. Li (2005). "Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the SRF gene in adult heart." Circulation **112**(19): 2930-2939.
- Parlakian, A., D. Tuil, G. Hamard, G. Tavernier, D. Hentzen, J. P. Concordet, D. Paulin, Z. Li and D. Daegelen (2004). "Targeted inactivation of serum response factor in the developing heart results in myocardial defects and embryonic lethality." Mol Cell Biol **24**(12): 5281-5289.
- Parsons, S. A., B. J. Wilkins, O. F. Bueno and J. D. Molkentin (2003). "Altered skeletal muscle phenotypes in calcineurin Aalpha and Abeta gene-targeted mice." Mol Cell Biol **23**(12): 4331-4343.
- Pask, H. T., K. L. Jones, P. K. Luther and J. M. Squire (1994). "M-band structure, M-bridge interactions and contraction speed in vertebrate cardiac muscles." J Muscle Res Cell Motil **15**(6): 633-645.
- Posern, G. and R. Treisman (2006). "Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction." Trends Cell Biol **16**(11): 588-596.
- Rosenkranz-Weiss, P., R. J. Tomek, J. Mathew and M. Eghbali (1994). "Gender-specific differences in expression of mRNAs for functional and structural proteins in rat ventricular myocardium." J Mol Cell Cardiol **26**(2): 261-270.
- Ruvkun, G. (2001). "Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world." Science **294**(5543): 797-799.
- Sanada, S., D. Hakuno, L. J. Higgins, E. R. Schreiter, A. N. McKenzie and R. T. Lee (2007). "IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system." J Clin Invest **117**(6): 1538-1549.
- Schaeffer, P. J., J. Desantiago, J. Yang, T. P. Flagg, A. Kovacs, C. J. Weinheimer, M. Courtois, T. C. Leone, C. G. Nichols, D. M. Bers and D. P. Kelly (2009). "Impaired contractile function and calcium handling in hearts of cardiac-specific calcineurin b1-deficient mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **297**(4): H1263-1273.
- Schoenauer, R., P. Bertoncini, G. Machaidze, U. Aebi, J. C. Perriard, M. Hegner and I. Agarkova (2005). "Myomesin is a molecular spring with adaptable elasticity." J Mol Biol **349**(2): 367-379.
- Schultz, J. E., S. A. Witt, M. L. Nieman, P. J. Reiser, S. J. Engle, M. Zhou, S. A. Pawlowski, J. N. Lorenz, T. R. Kimball and T. Doetschman (1999). "Fibroblast growth factor-2 mediates pressure-induced hypertrophic response." J Clin Invest **104**(6): 709-719.

- Schwartz, K., K. R. Boheler, D. de la Bastie, A. M. Lompre and J. J. Mercadier (1992). "Switches in cardiac muscle gene expression as a result of pressure and volume overload." *Am J Physiol* **262**(3 Pt 2): R364-369.
- Scimia, M. C., C. Hurtado, S. Ray, S. Metzler, K. Wei, J. Wang, C. E. Woods, N. H. Purcell, D. Catalucci, T. Akasaka, O. F. Bueno, G. P. Vlasuk, P. Kaliman, R. Bodmer, L. H. Smith, E. Ashley, M. Mercola, J. H. Brown and P. Ruiz-Lozano (2012). "APJ acts as a dual receptor in cardiac hypertrophy." *Nature* **488**(7411): 394-398.
- Shaw, P. E., H. Schroter and A. Nordheim (1989). "The ability of a ternary complex to form over the serum response element correlates with serum inducibility of the human c-fos promoter." *Cell* **56**(4): 563-572.
- Sheikh, F., A. Raskin, P. H. Chu, S. Lange, A. A. Domenighetti, M. Zheng, X. Liang, T. Zhang, T. Yajima, Y. Gu, N. D. Dalton, S. K. Mahata, G. W. Dorn, 2nd, J. H. Brown, K. L. Peterson, J. H. Omens, A. D. McCulloch and J. Chen (2008). "An FHL1-containing complex within the cardiomyocyte sarcomere mediates hypertrophic biomechanical stress responses in mice." *J Clin Invest* **118**(12): 3870-3880.
- Skavdahl, M., C. Steenbergen, J. Clark, P. Myers, T. Demianenko, L. Mao, H. A. Rockman, K. S. Korach and E. Murphy (2005). "Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**(2): H469-476.
- Sun, Q., G. Chen, J. W. Streb, X. Long, Y. Yang, C. J. Stoeckert, Jr. and J. M. Miano (2006). "Defining the mammalian CARome." *Genome Res* **16**(2): 197-207.
- Statistisches Bundesamt (2010). "Krankheitskosten". Fachserie 12 Reihe 7.2. <https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Krankheitskosten/Krankheitskosten.html> (03.11.2016).
- Sussman, M. A., H. W. Lim, N. Gude, T. Taigen, E. N. Olson, J. Robbins, M. C. Colbert, A. Gualberto, D. F. Wiczorek and J. D. Molkenstin (1998). "Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition." *Science* **281**(5383): 1690-1693.
- Swedberg, K. and J. Kjeksus (1988). "Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure: results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS)." *Am J Cardiol* **62**(2): 60a-66a.
- Testa, G., J. Schaft, F. van der Hoeven, S. Glaser, K. Anastassiadis, Y. Zhang, T. Hermann, W. Stremmel and A. F. Stewart (2004). "A reliable lacZ expression reporter cassette for multipurpose, knockout-first alleles." *Genesis* **38**(3): 151-158.
- Tirziu, D., E. Chorianopoulos, K. L. Moodie, R. T. Palac, Z. W. Zhuang, M. Tjwa, C. Roncal, U. Eriksson, Q. Fu, A. Efenbein, A. E. Hall, P. Carmeliet, L. Moons and M. Simons (2007). "Myocardial hypertrophy in the absence of external stimuli is induced by angiogenesis in mice." *J Clin Invest* **117**(11): 3188-3197.
- Treisman, R. (1986). "Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors." *Cell* **46**(4): 567-574.
- Tsuruda, T., J. Kato, K. Kitamura, M. Kawamoto, K. Kuwasako, T. Imamura, Y. Koiwaya, T. Tsuji, K. Kangawa and T. Eto (1999). "An autocrine or a paracrine role of adrenomedullin in modulating cardiac fibroblast growth." *Cardiovasc Res* **43**(4): 958-967.
- Tsuruda, T., J. Kato, K. Kitamura, K. Kuwasako, T. Imamura, Y. Koiwaya, T. Tsuji, K. Kangawa and T. Eto (1998). "Adrenomedullin: a possible autocrine or paracrine inhibitor of hypertrophy of cardiomyocytes." *Hypertension* **31**(1 Pt 2): 505-510.
- Uchida, S., A. Schneider, M. Wiesnet, B. Jungblut, P. Zarjitskaya, K. Jenniches, K. G. Kreymborg, W. Seeger and T. Braun (2009). "An integrated approach for the systematic identification and characterization of heart-enriched genes with unknown functions." *BMC Genomics* **10**: 100.
- Ueyama, T., H. Kasahara, T. Ishiwata, Q. Nie and S. Izumo (2003). "Myocardin expression is regulated by Nkx2.5, and its function is required for cardiomyogenesis." *Mol Cell Biol* **23**(24): 9222-9232.
- Wang, D., P. S. Chang, Z. Wang, L. Sutherland, J. A. Richardson, E. Small, P. A. Krieg and E. N. Olson (2001). "Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor." *Cell* **105**(7): 851-862.

- Wang, K., B. Long, J. Zhou and P. F. Li (2010). "miR-9 and NFATc3 regulate myocardin in cardiac hypertrophy." J Biol Chem **285**(16): 11903-11912.
- Weinberg, E. O., M. Mirotsov, J. Gannon, V. J. Dzau, R. T. Lee and R. E. Pratt (2003). "Sex dependence and temporal dependence of the left ventricular genomic response to pressure overload." Physiol Genomics **12**(2): 113-127.
- Will, R. D., M. Eden, S. Just, A. Hansen, A. Eder, D. Frank, C. Kuhn, T. S. Seeger, U. Oehl, S. Wiemann, B. Korn, M. Koegl, W. Rottbauer, T. Eschenhagen, H. A. Katus and N. Frey (2010). "Myomasp/LRRC39, a heart- and muscle-specific protein, is a novel component of the sarcomeric M-band and is involved in stretch sensing." Circ Res **107**(10): 1253-1264.
- Zhang, X., G. Azhar, J. Chai, P. Sheridan, K. Nagano, T. Brown, J. Yang, K. Khrapko, A. M. Borras, J. Lawitts, R. P. Misra and J. Y. Wei (2001). "Cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of serum response factor." Am J Physiol Heart Circ Physiol **280**(4): H1782-1792.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der an der Hypertrophieentstehung beteiligten Signalwege in Kardiomyozyten.....	3
Abbildung 2: Aufbau und Ultrastruktur des Sarkomers.....	5
Abbildung 3: Aktivierungswege von SRF.....	8
Abbildung 4: SRF-Signaling unter Myomasp/LRRC39-Knockdown.	11
Abbildung 5: Ultrastruktur von Herz- und Skelettmuskel eines Zebrafisches unter Myomasp/LRRC39-Knockout.	12
Abbildung 6: Primerstrategie zur Genotypisierung der Myomasp/LRRC39-Knockout-Maus.....	18
Abbildung 7: Nppa- und Nppb-mRNA-Expression unter Myomasp/LRRC39-Knockdown und -Überexpression..	52
Abbildung 8: Zellgröße mit und ohne Zugabe von Phenylephrin (PE) unter Myomasp/LRRC39-Überexpression und -Knockdown.....	53
Abbildung 9: SRF-Signaling in NRVCN unter Myomasp/LRRC39-Überexpression.....	54
Abbildung 10: NFAT-Signaling in NRVCN unter Myomasp/LRRC39-Knockdown und -Überexpression.....	55
Abbildung 11: Herzschnitte von Mäusen aus der Myomasp-Knockout-Zucht.....	56
Abbildung 12: Durchschnittliche Organmassen der Myomasp/LRRC39-Knockout-Mäuse.	57
Abbildung 13: Sirius-Red-Färbung von Gefrierschnitten von Mausherzen aus der Myomasp/LRRC39-Knockout- Zucht.....	57
Abbildung 14: Echokardiographische Untersuchung der Myomasp/LRRC39-Knockout-Mäuse.....	58
Abbildung 15: Relative Expression hypertropher und stresssensitiver Gene in Myomasp-Knockout-Mäusen....	59
Abbildung 16: Expression von cardialem Actin im Herz der Myomasp/LRRC39-Knockout-Maus.	60
Abbildung 17: Myomesin 1- und 2-Expression im Herz der Myomasp/LRRC39-Kockout-Maus.....	61
Abbildung 18: Transmissionselektronenmikroskopie adulter Myomasp-Knockout-Mäuse.....	62
Abbildung 19: Schematische Darstellung der Interaktionen von Myomasp/LRRC39 in vitro.....	64

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: NRVCM-Kulturplatten.....	27
Tabelle 2: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE	38
Tabelle 3: Viruskonzentrationen für NFAT-Luciferase-Assay unter Myomasp/LRRC39-Knockdown.....	42
Tabelle 4: Viruskonzentrationen für NFAT-Luciferase-Assay unter Myomasp/LRRC39-Überexpression	42
Tabelle 5: Viruskonzentrationen für SRF-Luciferase-Assay unter Myomasp/LRRC39-Überexpression	42
Tabelle 6: Thermal Cycler-Programm für qualitative Realtime-PCR	47

9 Danksagungen

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Norbert Frey für seine Unterstützung und für die Ermöglichung dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich Dr. Matthias Eden für die umfassenden und zahlreichen fachlichen Gespräche und zielführenden Diskussionen.

Frau Prof. Dr. Lüllmann-Rauch vom Anatomischen Institut der CAU zu Kiel danke ich für die Unterstützung bei meinen elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Dem gesamten Team der AG Molekulare Kardiologie danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit und seine unermüdliche Hilfsbereitschaft bei der praktischen Umsetzung meiner Experimente.

Zu guter letzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich auf meinem Weg durch das Studium und die Dissertation stets motivierend begleitet haben.

10 Lebenslauf

Persönliches

Name	Usinger
Vorname	Philip Alexander
Geburtsdatum und -ort	04. März 1988 in Hannover

Berufliche Tätigkeit

Seit 09/2015	Assistenzarzt am UKSH, Campus Kiel, Klinik für Innere Medizin III – Kardiologie und Angiologie
---------------------	--

Schulische und universitäre Ausbildung

10/2008 bis 05/2015	Studium der Humanmedizin Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Georg-August-Universität Göttingen Staatsexamen, Note: sehr gut
Abschluss	
06/2006	Allgemeine Hochschulreife Kaiser-Wilhelm- und Ratsgymnasium, Hannover, Note: gut

Praktische Tätigkeiten

10/2014 bis 09/2015	Dozententätigkeit UKSH Akademie gemeinnützige GmbH, Kiel Unterrichtung von MTRAs im Fach Krankheitslehre
06/2008 - 04/2011	Rettungsassistent RKT Rettungsdienst GmbH

Berufsausbildung

10/2007 bis 06/2008	Ausbildung zum Rettungsassistent Johanniter Unfallhilfe e.V., Hannover
----------------------------	--

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden als Vorträge bei der 81. und 82. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie am 09.04.2015 und am 01.04.2016 veröffentlicht:

M. Eden, L. Köhler, P. Usinger, N. Frey (2015): „V510 - Myomasp, ein neues herz- und muskelspezifisches M-Banden Protein, reguliert die Hypertrophie von

Kardiomyozyten via differentielle Regulation von Calcineurin-NFAT und SRF“. Clin Res Cardiol 104, Suppl 1, April 2015.

M. Eden, L. Köhler, P. Usinger, C. Tannert, N. Frey (2016): „V1256 - Myomasp, ein neues sarkomerisches M-Banden Protein, moduliert die Calcineurin/NFAT- und SRF-Signaltransduktion und führt in der Knockout-Maus zu einer progressiven Kardiomyopathie.“ Clin Res Cardiol 105, Suppl 1, March 2016.