

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

Die Rolle der „Stretch“-induzierbaren Proteine RND1 und MLF1 in der kardialen Physiologie und Pathophysiologie

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

Vorgelegt von
Annika Kluge
aus Hildesheim
Kiel 2018

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Derk Frank, Klinik für Innere Medizin III mit den Schwerpunkten
Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Peer Wulff, Physiologisches Institut

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2019

Zum Druck genehmigt: 12.09.2019

gez.: Prof. Dr. Johann Roider, Vorsitzender des Ausschusses für Promotion

I. Inhaltsverzeichnis

II.	Abbildungsverzeichnis.....	IV
III.	Tabellenverzeichnis.....	VI
IV.	Abkürzungen.....	VII

1	Einleitung	1
1.1	Kardiale Erkrankungen.....	1
1.2	Der Kardiomyozyt.....	2
1.3	Herzhypertrophie und kardiales „Remodeling“	3
1.3.1	Allgemeines	3
1.3.2	Physiologisch und pathologisch bedingte kardiale Hypertrophie	4
1.3.3	Konzentrische und exzentrische Hypertrophie	4
1.3.4	Hypertrophie-assoziierte Genexpressionsprofile	6
1.3.5	Die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade.....	7
1.3.6	Der SRF-Signalweg.....	8
1.3.7	Auslöser kardialer Hypertrophie	9
1.4	Der Zellzyklus.....	12
1.4.1	Ablauf des Zellzyklus.....	12
1.4.2	Regulationsmechanismen	12
1.4.3	Die Rolle des p53	14
1.4.4	Die Bedeutung der Proliferationsmarker Ki67 und PHH3 für den Zellzyklus.....	15
1.5	Proliferationsmechanismen von Kardiomyozyten.....	16
1.6	Die Apoptose.....	17
1.6.1	Der programmierte Zelltod.....	17
1.6.2	Regulationsmechanismen	18
1.7	Hypoxieinduzierte Zellschädigung.....	22
1.8	Die Proteine RND1 und MLF1.....	23
1.8.1	RND1	24
1.8.2	MLF1.....	24
1.9	Zielsetzung.....	25

2	Material und Methoden	27
2.1	Materialien.....	27
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	27
2.1.2	Chemikalien.....	29
2.1.3	Enzyme.....	31
2.1.4	Puffer	32
2.1.5	Medien.....	35
2.1.6	Primer	36
2.1.7	Antikörper	38
2.1.8	Plasmide.....	39
2.1.9	„Kits“	40
2.1.10	Bakterien	40
2.1.11	Zelllinien	40
2.2	Methoden	41
2.2.1	Mikrobiologische Methoden	41
2.2.2	Zellkulturmethoden	42
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	45
2.2.4	Statistische Auswertung	72
3	Ergebnisse	73
3.1	RND1	73
3.1.1	RND1 ist in Kardiomyozyten exprimiert und zeigt eine ausgeprägte Lokalisation in den Zellkernen	73
3.1.2	Dosisfindung der generierten Adenoviren.....	74
3.1.3	RND1-Überexpression in NRVCs führt zu einer Zellgrößenzunahme	75
3.1.4	RND1 induziert Hypertrophie-assoziierte fötale Gene und <i>Rcan1-4</i> . 78	
3.1.5	RND1-„Knockdown“ führt zur Reduktion der Zellgröße.....	79
3.1.6	RND1-„Knockdown“ reduziert die Auswirkung von Hypertrophie- assoziierten fötalen Genen und <i>Rcan1-4</i>	82
3.1.7	RND1 induziert die Proliferationsmarker Ki67 und PHH3	84
3.1.8	RND1 zeigt keinen Effekt auf die Zellviabilität.....	86
3.1.9	Ergebnisse des „Yeast two-Hybrid Screens“	87
3.1.10	Myozap, ein Interaktionspartner von RND1	89
3.1.11	RND1 aktiviert den SRF-Signalweg	90

3.1.12	RND1-Regulation in transgenen Myozap-Mäusen und Myozap- „Knockout“-Mäusen.....	94
3.2	MLF1	95
3.2.1	Dosisfindung der generierten Adenoviren	96
3.2.2	MLF1-„Knockdown“ führt zu einer Zellgrößenzunahme	97
3.2.3	MLF1-„Knockdown“ induziert Hypertrophie-assoziierte fötale Gene und <i>Rcan1-4</i>	99
3.2.4	MLF1 beeinflusst Apoptose- & Proliferationsvorgänge in Kardiomyozyten	101
3.2.5	MLF1 induziert Apoptose in NRVCMs durch Induktion von Caspase 3, Caspase 7 und PARP	104
3.2.6	Niedrige MLF1-Proteinexpression induziert Zellproliferation über die Aktivierung von D-Cyclinen und die Modulation von p53	107
3.2.7	MLF1-„Knockdown“ reduziert Hypoxie-induzierte Apoptose	111
4	Diskussion.....	116
4.1	Auslösung kardialer Hypertrophie	116
4.2	Ermittlung des Einflusses auf Zellproliferation und Apoptose	119
4.3	Diskussion der Ergebnisse.....	121
4.4	Ausblick.....	129
5	Zusammenfassung.....	131
6	Literaturverzeichnis	133
7	Veröffentlichungen	151
8	Danksagung.....	152

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kardiomyozyt einer neonatalen Ratte	3
Abbildung 2: Schematische Gegenüberstellung von konzentrischer und exzentrischer Hypertrophie.....	5
Abbildung 3: Calcineurin/NFAT-Signalkaskade	8
Abbildung 4: Signalwege des kardialen „Remodelings“ (Frank <i>et al.</i> 2011)	11
Abbildung 5: Vergleich der Ki67- und PHH3-Positivität in verschiedenen Stadien des Zellzyklus	16
Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer nekrotischen und einer apoptotischen Zelle	18
Abbildung 7: Caspase-Kaskade	20
Abbildung 8: Lokalisation von RND1 in NRVCMs	74
Abbildung 9: Dosiskurven der generierten RND1-Viren	75
Abbildung 10: RND1-Überexpression in NRVCMs führt zu einer Zellgrößenzunahme.....	77
Abbildung 11: RND1 induziert Hypertrophie-assoziierte fötale Gene und <i>Rcan1-4</i>	79
Abbildung 12: RND1-„Knockdown“ führt zur Reduktion der Zellgröße	81
Abbildung 13: RND1-„Knockdown“ reduziert die Auswirkung von Hypertrophie-assoziierten Genen und <i>Rcan1-4</i>	83
Abbildung 14: RND1 induziert die Proliferationsmarker Ki67 und PHH3.....	85
Abbildung 15: RND1-„Knockdown“ reduziert die Zellproliferation	86
Abbildung 16: RND1 zeigt keinen Effekt auf die Zellviabilität	87
Abbildung 17: Darstellung interagierender RND1- und Myozap-Domänen	88
Abbildung 18: Myozap, ein Interaktionspartner von RND1.....	90
Abbildung 19: RND1 und Myozap induzieren das SRF-„Signaling“.....	91
Abbildung 20: RND1 zeigt keine RhoA-Abhängigkeit	92
Abbildung 21: RND1 aktiviert den SRF-Signalweg	93
Abbildung 22: RND1-Regulation in transgenen Myozap-Mäusen und Myozap-„Knockout“-Mäusen	95
Abbildung 23: Dosiskurven der generierten MLF1-Viren.....	96
Abbildung 24: MLF1-„Knockdown“ führt zu einer Zellgrößenzunahme.....	98
Abbildung 25: MLF1-„Knockdown“ induziert Hypertrophie-assoziierte fötale Gene und <i>Rcan1-4</i>	100
Abbildung 26: MLF1 moduliert Apoptose und Differenzierung von Kardiomyozyten	102
Abbildung 27: MLF1 induziert Apoptose in Kardiomyozyten	104

Abbildung 28: MLF1 induziert Apoptose in NRVCMs durch Induktion von Caspase 3, Caspase 7 und PARP.....	105
Abbildung 29: Niedrige MLF1-Spiegel wirken protektiv gegenüber Apoptose	106
Abbildung 30: MLF1 reguliert die Proliferation von Kardiomyozyten	108
Abbildung 31: Biomechanischer „Stretch“ und geringe MLF1-Spiegel verstärken die Zellzyklus-Aktivität.....	110
Abbildung 32: MLF1-„Knockdown“ reduziert Hypoxie-induzierte Apoptose.....	112
Abbildung 33: MLF1-„Knockdown“ schwächt Hypoxie-induzierte Apoptosevorgänge über die Aktivierung von D-Cyclinen	115
Abbildung 34: Die Rolle von RND1 im SRF-„Signaling“	125

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht von Cyclin/CDK-Komplexen und ihrer Aktivität.....	13
Tabelle 2: Liste der „Primersequenzen“ für SYBR Green qRT-PCR aus <i>Rattus norvegicus</i> .	36
Tabelle 3: Liste der „Primersequenzen“ für SYBR Green qRT-PCR aus <i>Mus musculus</i>	36
Tabelle 4: Liste der „Primersequenzen“ für „Multiplex“-qRT-PCR aus <i>Rattus norvegicus</i>	36
Tabelle 5: Liste der „Primersequenzen“ für die Klonierung mit dem Gateway® Protokoll.....	37
Tabelle 6: Liste eingesetzter „Primersequenzen“ zur Klonierung synthetischer microRNAs zum „Knockdown“ von RND1 und MLF1	38
Tabelle 7: Liste der primären Antikörper	38
Tabelle 8: Liste der sekundären Antikörper	39
Tabelle 9: Verwendete Zelllinien.....	40
Tabelle 10: Anzahl ausgesäter Zellen in Abhängigkeit vom Plattentyp und geplantem Versuch.....	44
Tabelle 11: Reaktionsansatz für die Polymerase-Kettenreaktion	48
Tabelle 12: Verwendetes Polymerase-Kettenreaktions-Programm („Thermocycler“).....	48
Tabelle 13: Verwendetes Polymerase-Kettenreaktions-Programm („Thermocycler“).....	50
Tabelle 14: Aufbau der „Colony“-PCR	51
Tabelle 15: Verwendetes „Cycler“-Programm für die „Colony“-PCR	51
Tabelle 16: Reaktionsansatz für die „Annealing“-Reaktion	54
Tabelle 17: Reaktionsansatz für die Klonierung in den pcDNA6.2-GW/miR-Vektor	54
Tabelle 18: Zusammensetzung des „Mastermixes“ für die „Multiplex-Real-Time“ PCR.....	59
Tabelle 19: Eingesetzte Antikörper-Menge für die Co-Immunopräzipitation.....	63
Tabelle 20: Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen	64
Tabelle 21: Auflistung einiger im „Yeast two-Hybrid Screen“ detektierten Bindungspartner von RND1.....	87

IV. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AC	engl. acidic chitinase
ACE	engl. Angiotensin converting enzyme
Ad	Adenovirus
ADP	Adenosindiphosphat
ADS	Puffer zur Isolierung von NRVCMS
AML	akute myeloische Anämie
ANOVA	engl. analysis of variance
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AF	Alexa Fluor® (fluoreszierender Farbstoff)
AR	Adrenorezeptor
AT ₁	Angiotensin 1
At ₁ R	Angiotensin 1-Rezeptor
Bcl2	engl. B-cell lymphoma 2
Bcl-xL	engl. B-cell lymphoma-extra large
Bid	engl. BH3 interacting domain death agonist
BIR	engl.: Baculovirus IAP repeat
BNP	natriuretisches Peptid Typ B
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovines Serumalbumin
CaMK	engl. Calcium ²⁺ /Calmodulin-dependent protein kinase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CapZ	engl. capping actin protein of muscle Z-line alpha subunit 1
CARD	engl.: caspase activating and recruitment domain
Cas9	engl. CRISPR associated protein 9
CDK	engl. cyclin dependent kinase
cDNA	komplementäre DNA
CIB1	engl. Calcium and integrin binding protein 1
CIP	engl. cyclin inhibitor protein
Cis	Cisplatin
COP1	engl.: constitutively photomorphogenic 1
CREB	engl. cAMP responsive element binding protein

CRISPR	engl. clustered regulatory interspaced short palindromic repeat
CsA	Ciclosporin A
CSN3	engl.: third component of the COP9 signalosome complex
Ctrl	Kontrolle
C3bot	Clostridium botulinum C3-Transferase
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	engl. detergent compatible
dd	engl. bidest
DED	engl.: death effector domain
DEPC	Diethyldicarbonat
DISC	engl. death-inducing signaling complex
DMEM	engl. Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DR	engl. death receptor
DR3	engl.: death receptor 3
DTT	Dithiothreitol
ECL	engl. enhanced chemiluminescence
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EdU	engl. 5-ethynyl-2'-deoxyuridine
Egr1	engl. early growth response 1
Elf-4E	engl. eukaryotic initiation factor 4E
ENH	engl. Enigma homolog protein
ERK1	engl. extracellular signal-regulated kinase 1
Ets	engl. E26 transformation specific
ET1	Endothelin 1
FADD	Fas-associated death domain protein
FAK	engl. focal adhesion kinase
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Flourescein-Isothiocyanat
FK506	Tacrolimus
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-

	Dehydrogenase
GATA4	GATA-Bindeprotein 4
GPCR	engl. G protein coupled receptor
Gp130	Glycoprotein 130
G _q	G _q -gekoppelter Rezeptor (aktiviert Phospholipase C)
G _s	G _s -gekoppelter Rezeptor (stimulierend)
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HEK	engl. human embryonic kidney
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF1 α	engl. hypoxia inducible factor 1 alpha
HIS3	engl. imidazoleglycerol-phosphate dehydratase
HRP	engl. horseradish peroxidase
IAPs	engl. inhibitors of apoptosis proteins
ICC	Immunzytologie
ICE	engl. interleukin 1 beta converting enzyme
ICR	Interkostalraum
ifu	engl. infectious unit (s)
IGF	engl. insulin-like growth factor
ILK	engl. integrin linked kinase
INK4	engl. inhibitors of CDK4
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl β -D 1-Thiogalactopyranosid
JNK	engl. c-Jun N-terminale kinase
k. A.	keine Angabe
KHK	koronare Herzerkrankung
KIP	engl. kinase inhibitor protein
KLP	Kernlysepuffer
KO	Knockout
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
LacZ	für Beta-Galactosidase kodierendes Gen
LB	engl. lysogeny broth
MACF1	engl. microtubule-actin crosslinking factor 1

MAP-Kinase	engl. mitogen-activated protein kinase
MAPKKK	engl. mitogen-activated protein 3 kinase
MCIP	engl. modulatory Calcineurin-interacting protein
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MDM2	engl. mouse double minute 2
MEF2	engl. myocyte enhancer factor 2
MEK1	engl. serine/threonine protein kinase MEK1
MHC	engl.: myosin heavy chain
MRIP	engl. myosin phosphatase Rho-interacting protein
miRNA	micro-RNA
MLF1	engl. myeloid leukemia factor 1
MLP	engl. muscle LIM protein
mRNA	engl. messenger RNA
mTOR	engl. mechanistic target of Rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MURF3	engl. muscle specific RING finger protein 3
MZP	Myozap
n	Anzahl durchgeführter Versuche
NA	numerische Aperatur
NCBI	engl. national center for biotechnology information
NCS	engl. newborn calf serum
NFAT	engl. nuclear factor of activated T-cells
NFκB	engl. nuclear factor kappa B
NIH	engl. national institute of health
NLB	engl. native lysis buffer
NPM	Nucleophosmin
NRVCMs	engl. neonatal rat ventricular cardiac myocytes
OD ₆₀₀	optische Dichte, gemessen bei 600 nm
ORF	engl. open reading frame
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	engl. phosphate buffered saline

PBS*	engl. predicted biological scores
PLC	Phospholipase C
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phenylephrin
PHH3	Phosphohiston H3
PI	Propiumiodid
PI3K	engl. phosphoinositide 3 kinase
PK	Proteinkinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLB	engl. passive lysis buffer
pRb	Retinoblastoma-Protein
PVDF	Polyvenylidinflorid
qRT-PCR	engl. real-time quantitative PCR
Raf1	engl.: rapidly accelerated fibrosarcoma
RAS	engl. rat sarcoma
RCAN	Regulator des Calcineurins
Rcan1-4	engl. regulator of Calcineurin 1-exon 4 splice isoform
RhoGAP	engl.: GTPase activating protein
RNA	Ribonukleinsäure
RND1	engl. member of the Rho-family of GTPases
ROCK	engl. Rho-associated protein kinase
ROS	engl.: reactive oxygen species
rpm	engl. revolutions per minute
SDS	engl. sodium dodecyl sulfate
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Ser	Serin
SHAM	Scheinoperation
SID	selektiv interagierende Domäne
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SRF	engl. serum response factor
Str	engl. stretch
TAC	engl. transverse aortic constriction
TAE	Tris-Acetat-EDTA
tBid	engl. truncated BH3 interacting domain

	death agonist
TBS	engl. tris-buffered saline
TBST	engl. tris-buffered saline with Tween® 20
T-cap	Thelethonin
TCF	engl. ternary complex factor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TG	transgen
TGFβ	engl. transforming growth factor beta
TL1A	engl.: TNF-like ligand 1A
TNF/-R1	Tumor-Nekrose-Faktor/-Rezeptor 1
TRAIL/-R1/2	engl.: tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand/receptor 1/2
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
VE	vollentsalzt
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
Y2H	engl. yeast two-hybrid
ZFN	Zinkfingernukleasen

1 Einleitung

1.1 Kardiale Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen mit zunehmender Inzidenz die häufigste Todesursache in der westlichen Welt dar (Bonneux *et al.* 1994, Bui *et al.* 2011). Die stetig zunehmende Prävalenz von Risikofaktoren wie Diabetes, Adipositas, erhöhtes Lebensalter, Dyslipidämie und Hypertonie sind für den Großteil der pathologischen Veränderungen am Herzen verantwortlich (Bonneux *et al.* 1994).

Die Herzinsuffizienz macht den größten Anteil an den Herzerkrankungen aus und ist in Deutschland seit 2006 die häufigste Hauptdiagnose für einen stationären Krankenhausaufenthalt (Neumann *et al.* 2009). In den westlichen Industrienationen ist sie für 1-2 % und in Deutschland für etwa 1,1 % der direkten Krankheitskosten verantwortlich (Neumann *et al.* 2009). Damit stellt die Herzinsuffizienz heutzutage eine der häufigsten und kostenintensivsten chronischen Erkrankungen dar (Dickstein *et al.* 2008). Ätiopathologisch können ihr diverse Ursachen zu Grunde liegen. Neben pathologischen Veränderungen des Klappenapparates, arterieller Hypertonie, Kardiomyopathien oder koronarer Herzkrankheit (KHK) kann auch die kardiale Hypertrophie bei ungünstigem Verlauf zu einer Herzinsuffizienz führen (Ho *et al.* 1993).

Die kardiale Hypertrophie ist als Kompensation physiologischer aber vor allem pathologischer Ereignisse zu sehen (Bernardo *et al.* 2010). Dabei bildet die arterielle Hypertonie die Hauptursache (Mancia *et al.* 2013). Mit einer Prävalenz von 9,1-19 % für Frauen und 14,9-16 % für Männer ist die Hypertrophie ein Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse und demnach auch für eine erhöhte Mortalität (Levy *et al.* 1990, Schirmer *et al.* 1999).

Therapeutische Möglichkeiten wie der Einsatz von β -Blockern, ACE-Hemmern oder die Verwendung von AT_1 -Rezeptorblockern sind wesentlich für die Eindämmung des Fortschreitens kardiovaskulärer Pathologien und für die Verbesserung von Lebensqualität und Prognose betroffener Patienten (Yaoita *et al.* 2002, Pfeffer 2003). Um weitere pharmakologische Ansätze zu finden, ist die Kenntnis über involvierte Signalwege und daran beteiligte Proteine von größter Bedeutung.

1.2 Der Kardiomyozyt

Die Herzmuskulatur gehört wie die Skelettmuskulatur zur quergestreiften Muskulatur und weist damit Sarkomere als kleinste kontraktile Einheit auf (Lüllmann-Rauch *et al.* 2015). Diese setzen sich unter anderem aus Aktin-, Myosin- und Titinfilamenten zusammen (Lüllmann-Rauch *et al.* 2015). Das einzelne Sarkomer wird lateral von den Z-Scheiben begrenzt, in welche die Aktin- und Titinfilamente verankert sind (Rassow *et al.* 2016). Die Z-Scheiben bestehen vorwiegend aus α -Actinin und dem CapZ-Protein (Robson *et al.* 1970, Rassow *et al.* 2016). Sie sind nicht nur essenziell für die Muskelkontraktion und interagieren mit dem Zytoskelett und dessen zugehörigen Filamenten, sondern sie befinden sich auch in unmittelbarer Nähe zur Zellmembran (Sequeira *et al.* 2014). Dies weist auf eine zusätzliche Funktion der Übertragung und Erfassung externer und interner Signale hin (Frey *et al.* 2002). Mikroskopisch besteht das Sarkomer aus der M-Linie und den I- und A-Banden (Rassow *et al.* 2016). Die A-Bande setzt sich vor allem aus Myosin und die I-Bande, welche auch die Z-Scheibe umfasst, aus Aktin zusammen (Lüllmann-Rauch *et al.* 2015). Die M-Linie beschreibt einen in der Mitte des Sarkomers gelegenen Bereich, in dem Myosinfilamente miteinander vernetzt sind (Rassow *et al.* 2016). Die dünnen Aktinfilamente und die dicken Myosinfilamente bewirken nach der Gleittheorie von Huxley durch eine gleitende Parallelbewegung die Muskelkontraktion (Yanagida *et al.* 2012, Weeds 2013).

Kardiomyozyten zeigen sich im frühen Stadium ihrer Entwicklung eher klein und rund, während sie später vorwiegend in ihrer Länge an Größe gewinnen (Buggisch 2007). Zunächst sind die Myofibrillen nur gering ausgeprägt oder unregelmäßig angeordnet (Buggisch 2007). Erst im Zuge der Differenzierung bilden sich lange Kardiomyozyten mit parallelen Bündeln von Myofibrillen und deutlich erkennbarem Bandenmuster (Kehat *et al.* 2002, Snir *et al.* 2003, Maillet *et al.* 2013).

Bereits wenige Tage nach Empfängnis beginnen einzelne Kardiomyozyten spontan zu kontrahieren und am 23. bzw. 24. Tag nach Empfängnis können peristaltische Kontraktionen detektiert werden (Hescheler *et al.* 1999). Die Erregungsausbreitung im Herzmuskel ist über Gap junctions möglich, die einzelne Zellen elektrisch miteinander verbinden und das Herz zu einem funktionellen Synzitim machen (Ashikaga *et al.* 2015).

In utero ist zunächst eine starke Proliferation kardialer Myozyten zu verzeichnen, die in der Perinatalperiode jedoch versiegt und in einer dauerhaften Inhibition des Wiedereintrittes in den Zellzyklus bei adulten Kardiomyozyten mündet (Ahuja *et al.* 2007). Diese hypertrophe postnatale Phase führt zwar auch auf physiologische, vorwiegend allerdings auf pathologische Weise zu einer Zunahme von Myofibrillen und Sarkomeren (Clubb *et al.* 1984).

Immunhistochemisch lassen sich Kardiomyozyten mittels des Einsatzes von Antikörpern gegen das muskelspezifisch exprimierte Protein α -Actinin identifizieren. α -Actinin stellt ein Aktin-Bindeprotein dar und wird von sämtlichen Zellen exprimiert (Kao 2015). In der Herzmuskulatur färbt es vor allem die Z-Scheiben und angrenzende Strukturen (Sorimachi *et al.* 1997, Otey *et al.* 2004, Lüllmann-Rauch *et al.* 2015). Dadurch können Kardiomyozyten bereits an ihrer prominenten Querstreifung erkannt werden.

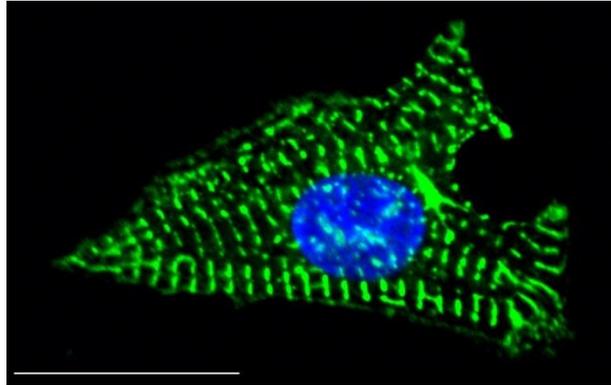


Abbildung 1: Kardiomyozyt einer neonatalen Ratte

Repräsentative Immunfluoreszenzanalyse eines Kardiomyozyten aus dem linken Ventrikel eines neonatalen Rattenherzens (NRVCMs, engl.: neonatal rat ventricular cardiomyocytes). Blau: DAPI, grün: sarkomeres α -Actinin; Maßstabsbalken: 20 μ m.

1.3 Herzhypertrophie und kardiales „Remodeling“

1.3.1 Allgemeines

Kardiales „Remodeling“ ist das Ergebnis molekularer und zellulärer Mechanismen, die zu Veränderungen der Größe, Funktion und Morphologie des Herzens führen (Bernardo *et al.* 2016, Ku *et al.* 2016). Das Herz reagiert auf moderate Anstrengung mit physiologischer Größenzunahme und bewirkt so eine verbesserte kardiale Funktion (Mihl *et al.* 2008, Bernardo *et al.* 2010). Dieses adaptive „Remodeling“ ist durch Hypertrophie, Proliferation, metabolische Anpassungen und den Ausbau der Blutversorgung gekennzeichnet (Bernardo *et al.* 2010). Auf molekularer Ebene kommt es durch Hormone, Wachstumsfaktoren oder biomechanischen Stress zu einer Induktion diverser Signalwege (Bernardo *et al.* 2016). Während geringe Belastungen zu physiologischen Anpassungen führen, kann man bei exzessivem Training neben kardialer Dysfunktion, Schwäche und Arrhythmien auch das Auftreten des plötzlichen Herztodes beobachten (Bernardo *et al.* 2010, Ku *et al.* 2016).

1.3.2 Physiologisch und pathologisch bedingte kardiale Hypertrophie

Kardiales Wachstum kann weitgehend als physiologisch oder pathologisch klassifiziert werden. Auf physiologische Weise induziertes Herzwachstum bzw. entwickelte Hypertrophie umfasst die postnatale Größenzunahme, die schwangerschaftsinduzierte Hypertrophie und die belastungsabhängige Zunahme des Herzvolumens (Zak 1983, Pluim *et al.* 2000, Eghbali *et al.* 2005). Pathologisches Wachstum ist dagegen auf chronische Volumen- bzw. Druckbelastungen im Rahmen von Hypertonie, Klappenerkrankungen, Myokardischämie oder –infarktgeschehen zurückzuführen (Bernardo *et al.* 2010). Während sowohl physiologisches als auch pathologisches Herzwachstum mit einer vermehrten Herzmasse einhergehen, ist die pathologische Hypertrophie zusätzlich mit einem Untergang von Kardiomyozyten, dem fibrotischen Umbau und einem erhöhten Risiko für Herzinsuffizienz und plötzlichen Herztod assoziiert (Levy *et al.* 1990, Weber *et al.* 1993, Cohn 1997). Des Weiteren stellt das pathologisch induzierte Herzwachstum einen in fortgeschrittenen Stadien nur partiell reversiblen Vorgang dar, der das fötale Hypertrophie-assoziierte Genprogramm aktiviert (Grünig 2009, Hou *et al.* 2012, Katanasaka *et al.* 2016). Physiologisch bedingte Hypertrophie wird im Gegensatz dazu als reversible Adaptation im Zusammenhang mit schwangerschaftsinduziertem und belastungsabhängigem kardialen Wachstum verstanden (Fagard 1997, Bernardo *et al.* 2010). Übermäßige Anstrengungen durch langes und exzessives Training können aber nachweislich sehr wohl zu kardialer Dysfunktion und Schwäche führen und scheinen damit ebenfalls pathologisch zu wirken (Maillet *et al.* 2013).

1.3.3 Konzentrische und exzentrische Hypertrophie

Unter der kardialen Hypertrophie versteht man die Massenzunahme des Herzens bedingt durch die Vergrößerung von einzelnen Kardiomyozyten (Cotton 1914, Karsner *et al.* 1925, Dorn *et al.* 2003). Physiologische und pathologische Hypertrophie können makroskopisch sowohl konzentrisch als auch exzentrisch auftreten (Grossman *et al.* 1975, Pluim *et al.* 2000). Konzentrische Hypertrophie ist dabei durch eine Zunahme der Wanddicke und des Herzgewichtes gekennzeichnet, während das Kammervolumen sich nicht verändert (Bernardo *et al.* 2010). Sie ist meist Folge einer starken oder andauernden Druckbelastung des Herzens (Mihl *et al.* 2008). So führen physiologische Stimuli wie isometrisches bzw. statisches Krafttraining, aber auch pathologische Ereignisse wie arterielle Hypertension oder Klappenstenosen zu einer Vermehrung parallel angeordneter Sarkomere und somit zu einem Anstieg der Myozytenbreite (Bernardo *et al.* 2010). Daran beteiligte Signaltransduktionswege

umfassen unter anderem durch extrazelluläre Signale regulierte Kinasen (ERKs, engl.: extracellular signal-regulated kinases) und c-Jun N-terminale Kinasen (JNKs, engl.: c-Jun N-terminal kinases), die Teil der mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPKs, engl.: mitogen-activated protein kinases) sind (Liu *et al.* 2016). Diese spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Herzhypertrophie und dem kardialen „Remodeling“ (Liu *et al.* 2016).

Exzentrische Hypertrophie stellt dagegen die Zunahme des Herzgewichtes mit einhergehendem vergrößertem Kammervolumen dar (Bernardo *et al.* 2010). Die Wanddicke kann dabei normal, verbreitert, aber auch vermindert sein (Bernardo *et al.* 2010). Hier kommt es durch eine serielle Vermehrung von Sarkomeren zu einer Längenzunahme der Kardiomyozyten (Mihl *et al.* 2008). Exzentrische Hypertrophie ist das Resultat inadäquater Volumenbelastung, beispielsweise durch exzessives Ausdauertraining oder durch diverse Klappenerkrankungen (zum Beispiel Aorten- oder Mitralklappeninsuffizienz) (Bernardo *et al.* 2010). In klinischen Studien wurde bereits der Verdacht geäußert, dass die exzentrische Hypertrophie einen größeren Risikofaktor als die konzentrische Hypertrophie darstellt (Berenji *et al.* 2005).

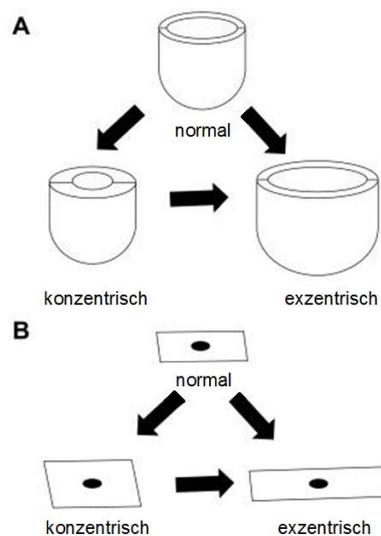


Abbildung 2: Schematische Gegenüberstellung von konzentrischer und exzentrischer Hypertrophie

A, makroskopisch vereinfachte Darstellung des Herzens. Druckbelastungen können zu erhöhten ventrikulären Wanddicken führen, ohne dass eine Zunahme der Kammergröße vorliegt (konzentrische Hypertrophie). Volumenbelastungen induzieren dagegen große Herzhöhlen und verhältnismäßig dünne Ventrikelwände (exzentrische Hypertrophie) (Bernardo *et al.* 2010). B, schematische Darstellung des einzelnen Kardiomyozyten. Während bei der konzentrischen Hypertrophie die Myozytenbreite durch eine Vermehrung parallel angeordneter Sarkomere zunimmt, wächst im Rahmen der exzentrischen Hypertrophie die Kardiomyozytenlänge durch eine Vermehrung seriell angeordneter Sarkomere (Bernardo *et al.* 2010).

1.3.4 Hypertrophie-assoziierte Genexpressionsprofile

Eine zentrale Stellung in der Entstehung kardialer Hypertrophie nimmt das Hypertrophie-assoziierte fötale Genprogramm ein. In Anlehnung an die Herzentwicklung und das fötale Genexpressionsmuster kommt es bei biomechanisch oder humoral induziertem Stress ebenfalls zu einer Reaktivierung bestimmter fötaler Gene (Feldman *et al.* 1993, Lesniak *et al.* 1995, Katanasaka *et al.* 2016).

Eines dieser Gene ist die β -Isoform der Myosin-Schwerketten (β -Mhc, engl.: β -isoform of myosin heavy chain) (Pandya *et al.* 2010). Es wird vor allem während der Entwicklung der kardialen Muskulatur exprimiert und kann besonders bei Druckbelastung im adulten Herzen erneut zu höheren Spiegeln ansteigen (Litten *et al.* 1982, Rappaport *et al.* 1984). Auch *Nppa* wird zum fötalen Genprogramm gezählt und sein Proteinprodukt, das atriale natriuretische Peptid (ANP), wird während der fötalen Entwicklung im gesamten Herzen exprimiert (Kessler-Ickson *et al.* 2002, Cameron *et al.* 2003, Cox *et al.* 2014). Auch im adulten differenzierten Herzen wird ANP weiterhin physiologisch in den Vorhöfen synthetisiert (Dietz 2005). Das atriale natriuretische Peptid ist von großer Bedeutung für die Regulation des Salzwasser-Haushalts und des Blutdrucks (Li *et al.* 2016). So wird es als Reaktion auf Volumenüberlastung der Herzräume und damit bei erhöhter Nachlast exprimiert. Freigesetzt führt es zu vermehrter renaler Natriurese und zur Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (Cannone *et al.* 2014). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ANP die Kontraktilität von hypertrophierten, aber auch von gesunden Kardiomyozyten signifikant verstärken kann (Perera *et al.* 2015). In Volumen- und Druck-überlasteten Mausmodellen führte die Deletion von *Nppa* zu verstärkter kardialer Hypertrophie und Fibrose (Mori *et al.* 2004, Wang *et al.* 2014). *Nppb* zählt ebenfalls zum fötalen Genprogramm und kodiert das natriuretische Peptid Typ B (BNP, engl.: brain natriuretic peptide). Analog zu ANP wird BNP bei vermehrter mechanischer Belastung von Kardiomyozyten ausgeschüttet und wirkt ebenfalls vasodilatatorisch und diuretisch (Carella 2015). Dank seines hohen negativen prädiktiven Wertes kann bei geringen Werten eine Herzschwäche nahezu ausgeschlossen werden (Luchner *et al.* 2003). Sowohl ANP als auch BNP werden als diagnostische Marker für Herzhypertrophie und die Ausprägung einer Herzinsuffizienz in der heutigen Medizin eingesetzt (Wang *et al.* 2004, Burchill *et al.* 2015).

1.3.5 Die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade

Einer der wesentlichen Signalwege, die mit Herzhypertrophie assoziiert sind, wird durch die Calcium/Calmodulin-abhängige Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin vermittelt (Frey *et al.* 2003, Panther *et al.* 2009). Die Funktion des Calcineurins wurde ursprünglich in T-Zellen beschrieben, in denen die hohe zytoplasmatische Calciumkonzentration die Interaktion von Calmodulin und Calcineurin ermöglicht und somit dessen Aktivierung fördert (Frey *et al.* 2003). Des Weiteren ist Calcineurin als ein ubiquitär vorkommender prohypertropher Modulator identifiziert und seine Beteiligung an der Dephosphorylierung und damit Aktivierung der NFAT (engl.: nuclear factor of activated T-cells)-Transkriptionsfaktoren festgestellt worden (Molkentin *et al.* 1998). Diese sind an der Regulation von Genexpressionen, unter anderem auch an der von Zytokinen, beteiligt und infolgedessen essenziell für die immunologische Signaltransduktion und das gesamte Immunsystem (Mulero *et al.* 2009).

Nach erfolgter Dephosphorylierung können die Transkriptionsfaktoren in den Zellkern translozieren und dort die Transkription multipler Hypertrophie-assoziiierter Gene bewirken (Ritter *et al.* 2002, Hogan *et al.* 2003, Frey *et al.* 2008). Auch konnte gezeigt werden, dass ein Teil des Calcineurins selbst in den Kern transloziert, sodass hier noch weitere Zielstrukturen vermutet werden (Burkard *et al.* 2005, Bernt *et al.* 2016). Calcineurin ist mitunter an den Z-Scheiben der Sarkomere lokalisiert und wird vorwiegend durch intrazellulären Calciumeinstrom aktiviert (Frey *et al.* 2000, Zou *et al.* 2001).

Die Erforschung transgener Mäuse führte zu der Erkenntnis, dass die Aktivierung des Calcineurin/NFAT-Signalweges in einer ausgeprägten kardialen Hypertrophie und schwerer Fibrose mündet (Molkentin *et al.* 1998). Die Calcineurin-Inhibitoren Ciclosporin A, Tacrolimus und das modulatorische Calcineurin-interagierende Protein 1 (MCIP1, engl.: modulatory Calcineurin interacting protein 1) bewirken eine Abschwächung myokardialer Hypertrophie, gemessen an vermindert ausgeprägten Reaktionen auf Angiotensin II oder Phenylephrin (PE) (Molkentin *et al.* 1998, Rothermel *et al.* 2001, Hill *et al.* 2002). Umgekehrt konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass die Deletion von Calsarcin 1, einem weiteren Calcineurin-Inhibitor, zu verstärkter Herzhypertrophie führt (Frey *et al.* 2004). Während die Calcineurin-Expression bei pathologischen prohypertrophen Reizen aktiviert wird, ist dies nach physiologischer Stimulation nicht gegeben (Wilkins *et al.* 2004).

Die enzymatische Aktivität des Calcineurins wird durch die inhibitorische Wirkung des RCAN1 (engl.: regulator of Calcineurin 1) reduziert (Yang *et al.* 2009). RCAN1 wurde als Regulator des Calcineurins zunächst in Pilzen und Hefen identifiziert und wird in der quergestreiften Muskulatur und im Nervengewebe exprimiert (Crawford *et al.* 1997, Yang *et al.* 2000). RCAN1 verhindert die Dephosphorylierung von Transkriptionsfaktoren der NFAT-

Familie durch Calcineurin (Peters *et al.* 2016). Es gibt jedoch auch Hinweise, dass RCAN1 für eine optimale Calcineurin-Aktivität erforderlich ist (Kingsbury *et al.* 2000). In einem transgenen RCAN1-Mausmodell konnte außerdem nach transverser aortaler Konstriktion eine verglichen mit den Wildtyp-Mäusen verminderte Hypertrophie festgestellt werden, die auf die Inhibition der Calcineurin-Aktivität zurückzuführen war (Hill *et al.* 2002). RCAN1 vermag folglich eine Abschwächung kardialer Hypertrophie bewirken und dient damit als Biomarker des Calcineurin-Signalweges. In der vorgelegten Arbeit wurde die Expression von *Rcan1-4* (engl. *Rcan1*-exon 4 splice isoform) zur Detektion hypertropher Effekte eingesetzt. Es gilt als Marker für die Calcineurin-Aktivität und ist in hypertrophen Kardiomyozyten verstärkt exprimiert (Landstrom *et al.* 2011).

Neben der großen Bedeutung des Calcineurins im Rahmen zytostatischer Therapien, spielt es demnach auch eine wesentliche Rolle in der Pathogenese von Herzinsuffizienz und Herzhypertrophie (Cooper *et al.* 1993, Maury *et al.* 2002).

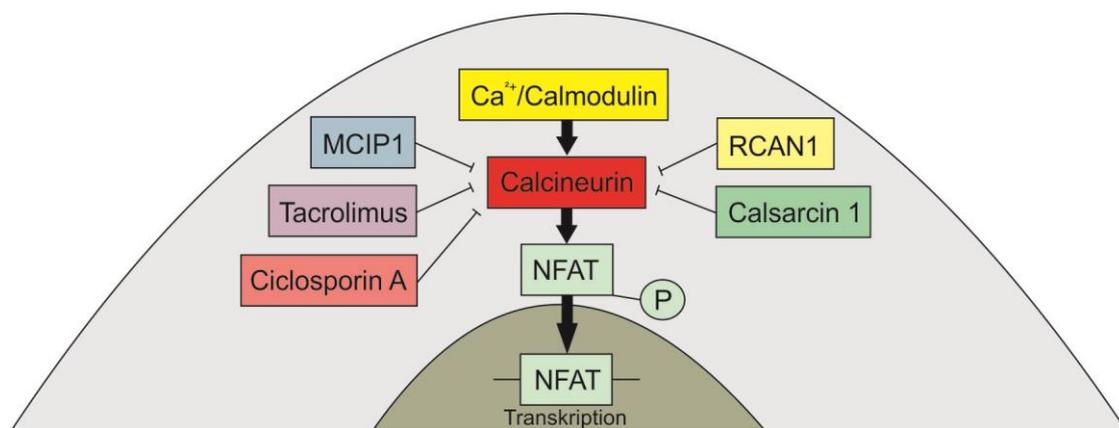


Abbildung 3: Calcineurin/NFAT-Signalkaskade

Schematische Darstellung von an der Calcineurin/NFAT-Signalkaskade beteiligten Proteinen und Signalmolekülen in Kardiomyozyten.

1.3.6 Der SRF-Signalweg

SRF (engl.: serum response factor) ist ein ubiquitär exprimierter und multifunktionaler Transkriptionsfaktor, der an der Regulation zahlreicher Zielgene beteiligt ist (Miano 2010). Ihm wird eine wesentliche Bedeutung für die Organisation des Zytoskelettes, die Modulation des kontraktiven Systems und das Zellwachstum zugeschrieben (Miano 2010). Des Weiteren konnte in Studien eine prädominante SRF-Expression in Skelett-, Herz- und glatten Muskelzelllinien nachgewiesen werden (Belaguli *et al.* 1997). So moduliert SRF auch die Expression spezifischer kardialer Gene während der embryonalen Entwicklung und steht in

engem Zusammenhang mit diversen Herzerkrankungen (Zhang *et al.* 2001a, Rangrez *et al.* 2013). Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von SRF in der Entwicklung des Herzens zu letalen Herzfehlern mit reduzierter Expression spezifischer kardialer Gene führt (Miano *et al.* 2004, Parlakian *et al.* 2004). Umgekehrt sind bei postnataler Überexpression von SRF hypertrophe Kardiomyopathie und erhöhte Expressionen von fötalen Genen nachgewiesen worden (Zhang *et al.* 2001a). Des Weiteren wurde beschrieben, dass SRF für die Induktion von ANP, BNP, α -Actinin und β -MHC erforderlich ist (Nelson *et al.* 2005). SRF spielt damit eine entscheidende Rolle in der Regulation und Induktion von Genen, die mit dem Progress der pathologischen Herzhypertrophie assoziiert sind (Zhang *et al.* 2001a).

Eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung des SRF-Signalweges nimmt Myozap (MZP), ein Zonula occludens 1-assoziiertes myokardiales Protein, ein (Seeger *et al.* 2010, Rickelt *et al.* 2011, Pieperhoff *et al.* 2012). Neben seiner Lokalisation nahe der Glanzstreifen ist es Teil zellulärer Anheftungsproteine, sogenannter zytoplasmatischer Plaques, und epithelialer Zellkontakte (Rickelt *et al.* 2011, Pieperhoff *et al.* 2012). In einem Zebrafischmodell konnte gezeigt werden, dass der „Knockdown“ von Myozap zu Kardiomyopathie und kontraktile Dysfunktion führt (Seeger *et al.* 2010). Darüber hinaus wurde die durch Myozap verstärkte RhoA-abhängige SRF-Aktivierung aufgezeigt (Seeger *et al.* 2010). Ebenfalls durch Myozap aktiviert wird MRIP (engl.: myosin phosphatase RhoA-interacting protein), welches eine Hemmung des SRF-Signalweges bewirkt (Seeger *et al.* 2010). Über einen „Yeast two-Hybrid Screen“ konnte Dysbindin als ein neuer Interaktionspartner von Myozap aufgedeckt werden (Rangrez *et al.* 2013). Das Dystrobrevin-Bindeprotein kommt in zahlreichen Geweben vor und ist bisher vorwiegend in Neuronen erforscht (Schwab *et al.* 2003, Bray *et al.* 2005, Talbot *et al.* 2011). Die Überexpression von Dysbindin induziert ebenfalls die Aktivierung des SRF-Signalweges und umgekehrt führt sein „Knockdown“ zu einer verminderten SRF-Induktion (Rangrez *et al.* 2013). Ähnlich wie Myozap interagiert Dysbindin mit RhoA und aktiviert überdies den ERK1 (engl.: extracellular signal-regulated kinase 1)-abhängigen MAPK-Signalweg (Rangrez *et al.* 2013).

1.3.7 Auslöser kardialer Hypertrophie

Das Herz der Säugetiere steht aufgrund der kontraktile Aktivität von Kardiomyozyten unter konstanter physiologischer Belastung (Huppelsberg *et al.* 2005, Rangrez *et al.* 2017). Diese kontinuierliche und synchron ablaufende Bewegung von Kardiomyozyten führt zur Aktivierung und Regulation mechanosensitiver Signalwege, die zur Aufrechterhaltung von Kardiomyozyten-typischer Morphologie und Funktion führen (Ruwhof *et al.* 2000a, Ruwhof *et*

al. 2000b, van Wamel *et al.* 2000a, van Wamel *et al.* 2000b, Trepap *et al.* 2007, Zablocki *et al.* 2013). Jegliche Ungleichgewichte oder Störungen in der kontraktile Bewegung, wie zum Beispiel pathologische biomechanische Belastungen im Rahmen von arterieller Hypertonie oder kardiovaskulärer Herzerkrankungen, resultieren in einer begrenzt reversiblen kardialen Hypertrophie, die unbehandelt schließlich in der Herzinsuffizienz mündet (Huppelsberg *et al.* 2005, Rangrez *et al.* 2017). Um die Auswirkung solcher Belastungen auf die Zelle zu validieren, besteht die Möglichkeit, kardiale Myozyten dynamischem „Stretch“ zu unterziehen. Es handelt sich dabei um eine Methode, bei der in den NRVCs durch mechanische Dehnung das „Remodeling“ induziert und die Untersuchung beteiligter Signaltransduktionswege ermöglicht wird (Näheres unter 2.2.3.14 und 4.1).

Biomechanischer Stress induziert die Expression fötaler Gene und führt folglich zu hypertrophen Zelleibern (Frank *et al.* 2008). Es wird vermutet, dass ein „Stretch“-Rezeptor im Bereich der Z-Scheibe existiert und mit Proteinen wie Calsarcin 1 und dem MLP (engl.: muscle LIM protein) interagiert (Knöll *et al.* 2002, Frey *et al.* 2004, Frank *et al.* 2006). Ebenfalls in die Mechanotransduktion involviert sind Melusin, ein Integrin-Bindeprotein, welches eine antihypertrophe Wirkung zeigt, und Myopodin, ein Aktin-Bindeprotein, das sich stressabhängig von der Z-Scheibe löst und in den Zellkern transloziert (Weins *et al.* 2001, Brancaccio *et al.* 2003).

Zahlreiche Studien setzen unterschiedliche Verfahren ein, um die Folgen mechanischer Belastung genauer zu erkunden. Neben dem bereits erwähnten „Stretchen“ ist die experimentelle transversale Aortenkonstriktion (TAC, engl.: transverse aortic constriction) ein häufig eingesetztes Modell für die belastungsinduzierte Hypertrophie und Herzinsuffizienz im Klein- und Großtiermodell (deAlmeida *et al.* 2010). Im Zuge der TAC wird eine kardiale Hypertrophie durch Nachlasterrhöhung des Herzens herbeigeführt (Baker *et al.* 1990). Das Herz arbeitet durch die Stenose der Aorta gegen einen erhöhten Widerstand und es kommt zu einer hämodynamischen Mehrbelastung (deAlmeida *et al.* 2010).

Aber auch über neurohumorale Signalwege wird myokardiale Hypertrophie vermittelt (Nakayama *et al.* 2014). Hier seien das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, die adrenergen Signalwege und die Endothelin 1 (ET1)-abhängige Signalkaskade genannt (Sadoshima *et al.* 1993b, Yamazaki *et al.* 1996, O'Connell *et al.* 2003). So konnte in einem Rattenmodell eine deutliche Regression kardialer Hypertrophie durch die Behandlung von Bluthochdruck-Tieren mit Hemmern des Angiotensinkonversionsenzym (ACE, engl.: Angiotensin converting enzyme) erzielt werden (Linz *et al.* 1989). Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die Verabreichung von ACE-Inhibitoren an Tiere mit abdominaler Aortenstenose erfolgreich vor linksventrikulärer Hypertrophie schützt (Baker *et al.* 1990). Auch Katecholamine und α_1 -adrenerge Rezeptoren (AR) gelten in kultivierten Kardiomyozyten und transgenen Mäusen als Auslöser kardialer Hypertrophie (Simpson

1983, Simpson 1985, O'Connell *et al.* 2003). Es konnte nachgewiesen werden, dass Katecholamine über α_1 -AR Hypertrophie-erzeugende Wirkungen zeigen, die bei Überexpression der α_1 -AR verstärkt werden (Milano *et al.* 1994). Endothelin 1 wird als vasoaktives Peptid neben endothelialen und epithelialen Zellen auch von Kardiomyozyten produziert. Es gilt als ein potenter Vasokonstriktor und Wachstumsfaktor, der eine Zunahme der Zelloberfläche und eine Steigerung der Proteinsynthese bewirkt. Weiterhin wurde beschrieben, dass ET1 die Aktivierung von hypertrophen Signalmolekülen wie die Serin/Threonin-Kinase Raf1 (engl.: rapidly accelerated fibrosarcoma) und MAP-Kinasen induziert. Außerdem konnte nach mechanisch ausgelöster Hypertrophie und gleichzeitiger ET1-Rezeptorblockade eine verstärkte ET1-Freisetzung und erhöhte ET1-mRNA-Spiegel gemessen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch humorale Faktoren eine bedeutende Rolle in der Herzhypertrophie spielen.

In der vorliegenden Arbeit wurden das mechanische Dehnen durch den Einsatz des „Stretchers“, die Behandlung von Herzmuskelzellen mit Phenylephrin, einem α -adrenergen Agonisten, und die transverse aortale Konstriktion in einem Mausmodell durchgeführt, um die involvierten Signalwege *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen.

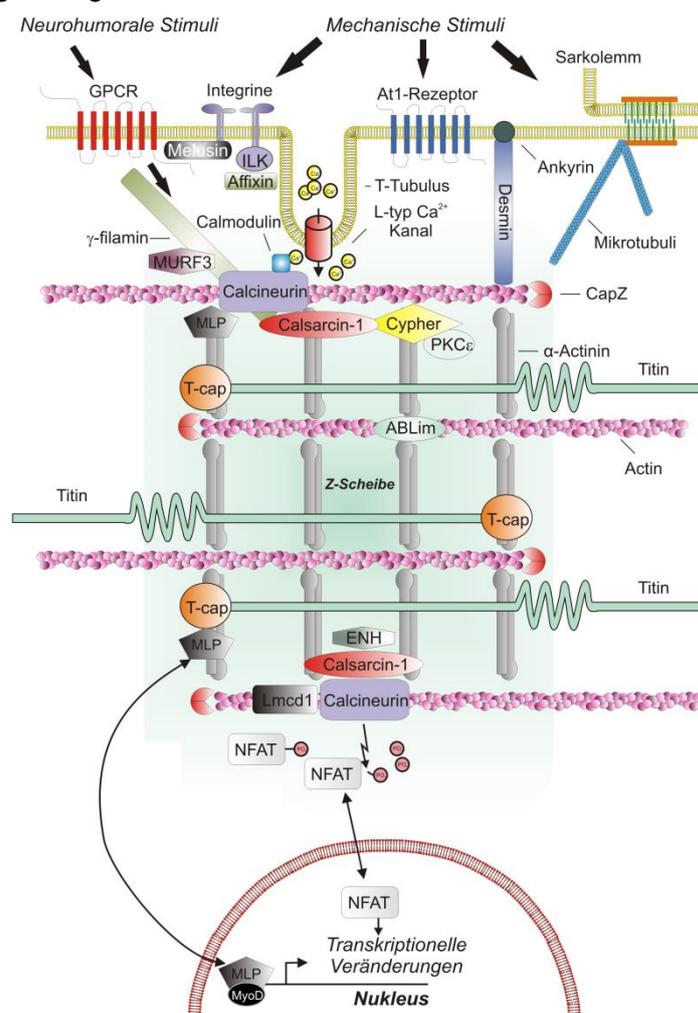


Abbildung 4: Signalwege des kardialen „Remodelings“ (Frank *et al.* 2011)

Schematische Darstellung der kardialen Z-Scheibe mit benachbarten, am kardialen „Remodeling“ beteiligten Strukturen.

1.4 Der Zellzyklus

1.4.1 Ablauf des Zellzyklus

Die Zelle als kleinste lebende Einheit eines Organismus unterliegt multiplen und komplexen Kontrollmechanismen (Dreyer-Schmitt 2009). Zur Ausbildung intakter Zellverbände bedarf es einer strengen Regulation von Zellteilung, -wachstum, -differenzierung und programmiertem Zelltod (Dreyer-Schmitt 2009). Die Zellteilung ist essenziell für die Bildung neuer Gewebe oder abgestorbener Zellen (Rassow *et al.* 2016). Der Zellzyklus beschreibt den periodischen Ablauf von vier Phasen, die in strikter Reihenfolge von jeder Zelle durchlaufen werden (Buggisch 2007, Rassow *et al.* 2016). Nach einer Zellteilung befindet sich die Zelle in der sogenannten G1-Phase (Müller-Esterl *et al.* 2011). Hier beginnt sie zu wachsen, Zellorganellen werden aufgebaut und Enzyme für die Synthese-Phase (S-Phase) werden synthetisiert (Rassow *et al.* 2016). In der daran anknüpfenden S-Phase werden das Erbmaterial dupliziert und weitere Zellbestandteile wie zum Beispiel Histone aufgebaut (Müller-Esterl *et al.* 2011). Die prämitotische G2-Phase dient der Vorbereitung der Zellteilung, bei der die einzelne Zelle sich aus dem Zellverband löst und abrundet (Müller-Esterl *et al.* 2011). In den drei beschriebenen Phasen nimmt die Zelle an Größe zu (Behl *et al.* 2016). Die anschließende Mitose-Phase (M-Phase) lässt sich in Pro-, Prometa-, Meta-, Ana- und Telophase untergliedern (Dreyer-Schmitt 2009, Müller-Esterl *et al.* 2011, Rassow *et al.* 2016). Hierbei werden die synthetisierten Strukturen sowie das verdoppelte Genom getrennt und aufgeteilt, sodass letztendlich aus einer Mutterzelle zwei identische Tochterzellen entstehen (Behl *et al.* 2016).

1.4.2 Regulationsmechanismen

Der Ablauf des Zellzyklus ist von diversen Kontroll- und Regulationsmechanismen abhängig (Buggisch 2007). Eine entscheidende Rolle nehmen dabei die Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs, engl.: cyclin-dependent kinases) ein (Behl *et al.* 2016). Diese sind für ihre Aktivierung auf Cycline angewiesen (Buggisch 2007). Bei den CDKs handelt es sich um

spezifische Serin/Threonin-Kinasen, die andere Zielproteine phosphorylieren und sie auf diesem Weg aktivieren bzw. inaktivieren (Behl *et al.* 2016).

Die ruhende, sich in der G0-Phase befindende Zelle wird über Wachstumsfaktoren oder proliferationsaktivierende Signale stimuliert und tritt nach Aktivierung wieder in die G1-Phase ein (Engel 2008). Anschließend wird über die Cycline mit der Bildung aktiver Cyclin/CDK-Komplexe begonnen und dadurch die Phosphorylierung von Zielstrukturen kontrolliert (Engel 2008). Die Cyclin/CDK-Komplexe sind durch Substratphosphorylierung in allen Phasen des Zellzyklus tätig und führen zum Fortschreiten des Zellzyklus (Ekholm *et al.* 2000). Die Cycline werden über die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege wie die RAS-Kaskade, die NF- κ B (engl.: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells)-Aktivierung oder den MAP-Kinase-Signalweg reguliert (Ekholm *et al.* 2000). Durch die Bildung von Cyclin/CDK-Komplexen kommt es zu Strukturveränderungen der CDKs, die zur Aktivierung der Kinasen führen (Keyomarsi *et al.* 1997). In jeder Zellzyklus-Phase sind bestimmte Cycline aktiv (siehe Tabelle 1) (Matsushime *et al.* 1994). Sie werden streng reguliert nur in der jeweiligen Phase exprimiert und anschließend im Proteasom degradiert (Keyomarsi *et al.* 1997).

Tabelle 1: Übersicht von Cyclin/CDK-Komplexen und ihrer Aktivität

Cyclin	CDK	Aktivität
Cyclin D	CDK 4, CDK 6	frühe G1-Phase
Cyclin E	CDK 2	späte G1-Phase, G1/S-Übergang
Cyclin A	CDK 2 CDK 1	S-Phase, G2-Phase Ende S-Phase, S/G2-Übergang
Cyclin B	CDK 1	G2/M-Übergang, M-Phase

Ein wichtiges Zellzyklus-Kontrollprotein ist das Retinoblastoma-Protein (pRb) (Behl *et al.* 2016). Dieses kontrolliert den Übergang von der G1- zur S-Phase, indem es an Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie bindet und diese inhibiert (Wu *et al.* 1995). Das Retinoblastoma-Protein wurde erstmals im Zusammenhang mit der Entstehung von Tumorerkrankungen beschrieben und war der erste entdeckte Tumorsuppressor (Rassow *et al.* 2016). pRb wird durch das Heterodimer aus Cyclin D und CDK4 oder CDK6 phosphoryliert bzw. inhibiert und führt so zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren (Rassow *et al.* 2016). Dadurch kommt es zum Übergang in die S-Phase und damit zum Beginn der DNA-Replikation (Engel 2008).

An den Übergängen von der G1- zur S-Phase sowie von der G2- zur M-Phase liegen Kontrollpunkte, an denen auf mögliche Replikationsfehler untersucht wird (Müller-Esterl *et al.* 2011). Diese Kontrollpunkte werden von Proteinen wie dem pRb gebildet (Rassow *et al.* 2016).

Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren (CDKIs, engl.: cyclin-dependent kinase inhibitors) schwächen die Aktivität der CDKs ab und lassen sich in zwei Subfamilien unterteilen: Die INK4 (engl.: inhibitors of CDK4)-Familie, bestehend aus den Proteinen p15, p16, p18 und p19, bindet spezifisch CDK4 sowie CDK6 und hemmt so die Cyclin D/CDK-Aktivität, was eine Arretierung in der G1-Phase bedeutet (Pavletich 1999, Roussel 1999, Martins *et al.* 2002, Dreyer-Schmitt 2009). Die sich in ihrer Struktur und Spezifität von dieser Familie abgrenzende CIP (engl.: cyclin inhibitor protein)/KIP (engl.: kinase inhibitor protein)-Gruppe umfasst die Proteine p21, p27 und p57 und bindet multiple Cyclin/CDK-Komplexe während des G1/S-Übergangs, der G1- und S-Phase (Pavletich 1999, Martins *et al.* 2002). Aber auch die Inhibitoren der CDKs werden durch weitere Regulatorproteine wie zum Beispiel durch p53 moduliert, wodurch ein geregelter Ablauf des Zellzyklus ermöglicht wird (Behl *et al.* 2016).

1.4.3 Die Rolle des p53

P53 ist ein sequenzspezifisches und kurzlebiges Tumorsuppressorgen, das in niedrigen Konzentrationen in multiplen Geweben exprimiert wird, während es in beschädigten, entzündeten oder tumorösen Geweben in seiner Expression hochreguliert wird (el-Deiry 1998, Fierabracci *et al.* 2016). Es ist ein Schlüsselprotein, welches die ungehemmte Proliferation von Zellen verhindert (53 steht für sein Molekulargewicht von 53 kDa) (Behl *et al.* 2016). Der zelluläre p53-Spiegel wird durch Ubiquitynylierung und proteolytischen Abbau niedrig gehalten und *via* Phosphorylierung angehoben (Rassow *et al.* 2016). Wird ein DNA-Schaden am p53-Kontrollpunkt detektiert, so wird der Zellzyklus in der späten G1-Phase angehalten (Hirsch-Kauffmann *et al.* 2009, Behl *et al.* 2016). P53 wird bei zellulärem Stress durch ansteigende Proteinspiegel (Akkumulation) sowie durch regulatorische Modifikationen, beispielsweise durch Phosphorylierung, aktiviert (el-Deiry 1998). Das „Expressionslevel“ des p53 nimmt Einfluss auf die pRb-Expression und steht mit dieser in enger Wechselbeziehung: Intaktes pRb induziert p53-vermittelten Zellzyklusarrest, defektes pRb bewirkt dagegen die Einleitung des programmierten Zelltodes durch p53 (Lemaire *et al.* 2005, Godefroy *et al.* 2006). Nach Abschluss der Reparationsvorgänge wird am Kontrollpunkt der Zellzyklusprogress wieder freigegeben (Rassow *et al.* 2016). Bleiben die eingeleiteten Mechanismen ohne Erfolg, wird die Apoptose über spezifische „Targetgene“ wie *Bax* oder *Fas/Apo1* eingeleitet (Miyashita *et al.* 1994).

Bei bestimmten Mutationen des *p53*-Gens geht seine Tumorsuppressorfunktion verloren und es kann die Funktion eines Onkogens annehmen, was bedeutet, dass *p53* übermäßig exprimiert und dadurch die Kontrolle normaler Wachstums- und Differenzierungsprozesse

gestört wird (Hirsch-Kauffmann *et al.* 2009). Studien konnten zeigen, dass mehr als die Hälfte aller humanen Tumore Mutationen im *p53*-Gen aufwiesen (Hollstein *et al.* 1991). Somit stellt *p53* das am häufigsten mutierte Gen menschlicher Krebszellen dar (el-Deiry 1998).

1.4.4 Die Bedeutung der Proliferationsmarker Ki67 und PHH3 für den Zellzyklus

Ki67 ist ein nukleäres Antigen, welches im Zellkern und ausschließlich während des Zellwachstums und der Zellteilung exprimiert wird (Gerdes *et al.* 1983, Scholzen *et al.* 2000). Der dazugehörige Antikörper wurde von der gleichen Kieler Arbeitsgruppe nach der Immunisierung von Mäusen mit der „Hodgkin“-Lymphomzelllinie L428 hervorgebracht (Ki steht für Kiel; 67 steht für die Klon-Nummer, in welcher der Antikörper gefunden wurde) (Gerdes *et al.* 1983). Die Ki67-Expression ist während der Zellteilung erhöht und in der G2- und M-Phase maximal (Sasaki *et al.* 1987, Scholzen *et al.* 2000). Ki67 wird dagegen nicht von sich in der G0-Phase befindenden Zellen exprimiert und ist auch nicht in zelluläre Reparaturmechanismen involviert (Scholzen *et al.* 2000). Somit ist Ki67 ein geeigneter Marker, um die Proliferation diverser Zellverbände zu prüfen (Shah *et al.* 2009, Barutcu *et al.* 2016, Penault-Llorca *et al.* 2017). Nicht zuletzt wird es als etablierter Indikator in der Krebsforschung eingesetzt und erlaubt eine Aussage bezüglich der Prognose verschiedener Krebsarten (de Azambuja *et al.* 2007, Viale *et al.* 2008, Williams *et al.* 2011).

Histon H3 gilt als Bestandteil des Chromatins und ist an der Verpackung der DNA beteiligt (Hendzel *et al.* 1997). Seine Phosphorylierung am Ser10 und Ser28 ist an der Chromosomenkondensation, die im Rahmen der Zellteilung stattfindet, beteiligt, beginnt in der Mitose während der späten G2-Phase und endet nach Ablauf der Anaphase (Hendzel *et al.* 1997). Phosphohiston H3 wird damit zu einem präzisen Marker von Zellen, die sich in der mitotischen Phase des Zellzyklus befinden, und ist ebenfalls in vielen Krebsarten beschrieben worden (Zhu *et al.* 2016). Im Gegensatz zu Ki67 ist PHH3 also mitosespezifisch (Chow *et al.* 2016). Dies bedeutet, dass das Antigen ausschließlich während der M-Phase vorliegt und demnach lediglich hier zu detektieren ist (Juan *et al.* 1998). Der Nachweis von PHH3 in Kombination mit der Ki67-Färbung kann nahezu sämtliche maligne entarteten Hautkrebs-Zellverbände identifizieren, während Einzelnachweise der Proteine nur eine unzureichende Sensitivität erreichen (Wandler *et al.* 2016).

Ki67 und PHH3 gelten damit als geeignete Proliferationsmarker mit unterschiedlicher Positivität in Abhängigkeit des jeweiligen Zellzyklus-Stadiums.

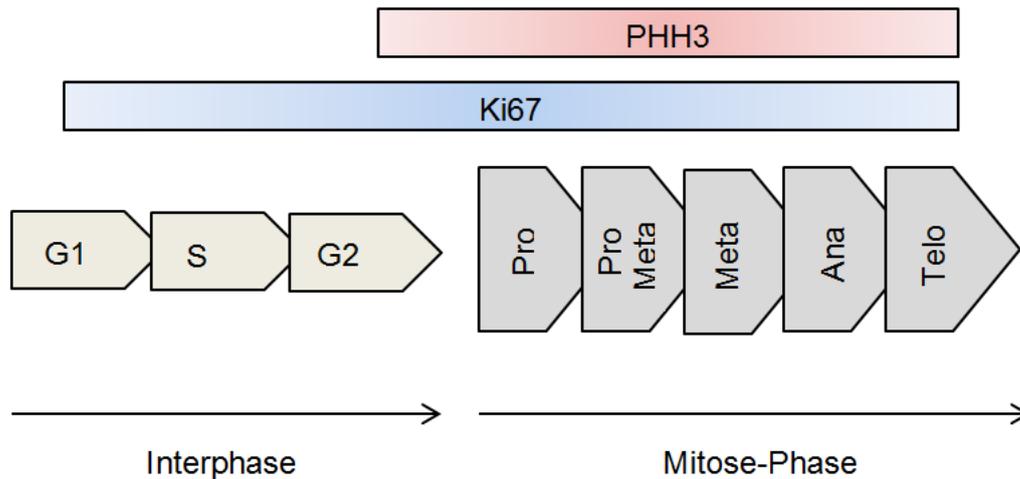


Abbildung 5: Vergleich der Ki67- und PHH3-Positivität in verschiedenen Stadien des Zellzyklus

1.5 Proliferationsmechanismen von Kardiomyozyten

Das kardiovaskuläre System bildet sich als erstes Organsystem im Wirbeltier-Embryo und ist in der Lage, diesen mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen (Brand 2003). Bereits nach drei Wochen Gravidität nimmt das menschliche Herz seine Pumpfunktion auf und behält diese bei, während es kontinuierlichen Umbauvorgängen unterliegt, bis schließlich nach der 4.-6. Entwicklungswoche vier vollständig ausgebildete Herzkammern vorliegen (Brand 2003, Sadler 2008). Auch Kardiomyozyten gehören zu den ersten Zelltypen, die aus embryonalen Stammzellen entstehen (Hescheler *et al.* 1999).

Die Möglichkeit einer kardialen Regeneration nach Schädigungen, die eine Neubildung myokardialen Gewebes erfordern würden, wird kontrovers diskutiert. Der Annahme, dass das adulte Herz ein postmitotisches Organ ist und kardiale Muskelzellen als enddifferenzierte Zellen ihr regeneratives Potenzial verlieren, stehen neuere Studien gegenüber, die postulieren, dass adulte Kardiomyozyten, wenn auch nur in geringem Maße, immer noch proliferieren können (Ueno *et al.* 1988, Soonpaa *et al.* 1998, Beltrami *et al.* 2001). Es wird von Myozyten-Subpopulationen berichtet, die noch nicht terminal differenziert sind und dadurch mitotische Aktivität zeigen (Beltrami *et al.* 2001, Urbanek *et al.* 2003). So konnte nachgewiesen werden, dass es in den an Infarktzone grenzenden Regionen zu einem vermehrten Wiedereintritt von Myozyten in den Zellzyklus kommt, wobei die proliferative Kapazität nicht ausreichend ist, um geschädigte Areale wieder mit neuem Gewebe zu reparieren (Cheng *et al.* 2016, Turan *et al.* 2016).

Im Unterschied zu den embryonalen Herzmuskelzellen konnte das Fehlen von nukleär angereichertem Cyclin D1 in adulten Kardiomyozyten detektiert werden (Ledda-Columbano

et al. 2006). Eine *in vitro* induzierte Steigerung der Cyclin D1-Expression führte nachweislich zu einem Wiedereintritt in den Zellzyklus (Pasumarthi *et al.* 2005, Ledda-Columbano *et al.* 2006). Diese fehlende Zytokinexpression könnte ein wesentliches Kennzeichen für postmitotische und ausgereifte Zellen darstellen (Tamamori-Adachi *et al.* 2003).

1.6 Die Apoptose

1.6.1 Der programmierte Zelltod

Die Apoptose beschreibt den von der Zelle selbst induzierten programmierten Zelltod, der physiologisch durch innere oder äußere Faktoren ausgelöst wird und während des gesamten Lebens auftritt (Lüllmann-Rauch *et al.* 2015). Der streng gesteuerte Zelltod ist unerlässlich für die Entwicklung und Funktion sämtlicher Gewebe (Rassow *et al.* 2016). So werden potenziell entartete Zellen eliminiert oder die Zellzahl und damit die Größe von Organen unter Kontrolle gehalten (Rassow *et al.* 2016).

Zu den die Apoptose auslösenden Ereignissen zählen der Entzug von Wachstumsfaktoren, DNA-Schäden, Störungen des Zellmetabolismus oder die Stimulation der Zelloberfläche über entsprechende Rezeptoren (Rassow *et al.* 2016). Über diese werden Regulationsmechanismen aktiviert, die schließlich zum Zelltod führen (Rassow *et al.* 2016). Nach Aktivierung des Programmes zur eigenen Beseitigung durchläuft der betroffene Zellleib multiple morphologische Charakteristika (Lüllmann-Rauch *et al.* 2015). So verliert die Zelle an Größe, die DNA kondensiert, wird degradiert und es bilden sich einzelne Zellfragmente (Apoptosekörperchen), die letztendlich von Makrophagen phagozytiert werden können (Lüllmann-Rauch *et al.* 2015).

Pathologisch führt eine übermäßige Apoptose von Zellen zum Beispiel zu neurodegenerativen Erkrankungen wie Chorea Huntington oder Morbus Parkinson, während eine gehemmte Apoptose in einer Tumorbildung resultieren kann (Rassow *et al.* 2016).

Von der Apoptose ist die Nekrose als unkontrolliertes Absterben von Zellen abzugrenzen (Lüllmann-Rauch *et al.* 2015). Bei der Nekrose kommt es beispielsweise durch Verletzung der Zelle oder das Aussetzen diverser Noxen zu einer Störung des zelleigenen Aktionspotentials und folglich zu osmotisch bedingter Ruptur des Zellkörpers (Müller-Esterl *et al.* 2011). Der unkontrolliert austretende Zellinhalt mitsamt seinen lysosomalen Enzymen fördert schließlich das Entstehen und Ausbreiten einer Entzündungsreaktion (Lüllmann-Rauch *et al.* 2015).

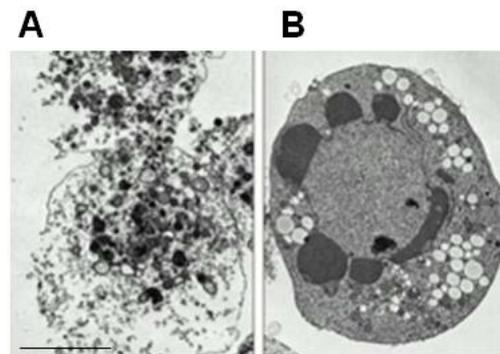


Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer nekrotischen und einer apoptotischen Zelle

Die nekrotische Zelle (A) zeigt eine rupturierte Zellmembran mit bereits ins umliegende Gewebe austretendem Zellinhalt. B lässt dagegen eine apoptotische Zelle mit fragmentiertem Kern, kondensiertem Chromatin und multiplen Zellvesikeln erkennen. Maßstabsbalken: 10 µm.

(Abb. modifiziert aus www.pathologie.ukerlangen.de/e1848/e603/e638/inhalt678/5.Sem_05a-Apoptose.pdf)

Neben Apoptose und Nekrose besteht mit der sogenannten programmierten Nekrose oder Nekroptose eine weitere Form des Zelltodes (Newton *et al.* 2004, Vanden Berghe *et al.* 2010). Die Nekroptose zeichnet sich durch die Aktivierung von Todesrezeptoren analog zur Apoptose aus und wird bei Hemmung der Apoptose eingeleitet (Vanden Berghe *et al.* 2010, Murphy *et al.* 2014). Anschließend leiten die Zellen jedoch statt der Apoptose die Selbstverdauung ein (Vanden Berghe *et al.* 2010). Neben auch an der Apoptose beteiligten Signalmolekülen sind mitunter zwei weitere Schlüsselproteine dieses streng regulierten Signalweges, die Enzyme Rezeptor-interagierendes Protein 1 (RIP1, engl.: receptor interacting protein 1) und Rezeptor-interagierendes Protein 3 (RIP3, engl.: receptor interacting protein 3), bekannt (Newton *et al.* 2004). Morphologisch zeigen sich wie bei der Nekrose Membranruptur und Entzündungsreaktion (Vanden Berghe *et al.* 2010).

1.6.2 Regulationsmechanismen

1.6.2.1 Die Komponenten der Apoptose

Caspasen nehmen eine essenzielle Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase durch die Regulation von Zelltod und Entzündungsreaktionen ein (McIlwain *et al.* 2013, Rassow *et al.* 2016). Es handelt sich hierbei um endogene Cysteinproteasen, die Proteine hinter Aspartatresten spalten und dadurch deren Aktivität verändern (Rassow *et al.* 2016). Die

durch Caspasen vermittelten katalytischen Spaltungen können sowohl zu Substratinaktivierungen aber auch -aktivierungen führen, die an Apoptose- und Entzündungsgeschehen beteiligt sind (McIlwain *et al.* 2013). Dementsprechend wurden die Caspasen weitgehend durch ihre Mitwirkung am Zelltod (Caspase 3, 6, 7, 8 und 9) und an Inflammationsreaktionen (Caspase 1, 4, 5 und 12) klassifiziert (McIlwain *et al.* 2013). Alle Caspasen liegen zunächst als inaktive monomere Procaspasen vor und erlangen erst durch Dimerisierung und katalytische Spaltung ihre Aktivität (Hirsch-Kauffmann *et al.* 2009, Müller-Esterl *et al.* 2011, McIlwain *et al.* 2013).

Caspasen, die an der Apoptose beteiligt sind, werden anhand ihrer Wirkmechanismen in Initiator-Caspasen (Caspase 8 und 9) und Effektor-Caspasen (Caspase 3, 6 und 7) untergliedert. Die Initiator-Caspasen 8 und 9 liegen zunächst als inaktive Procaspase-Monomere vor, die durch Dimerisierung aktiviert werden. Diese Dimerisierung erleichtert die anknüpfende autokatalytische Spaltung der Caspase-Monomere in eine große und eine kleine Untereinheit, was zu einer Stabilisierung des Dimers beiträgt. Die daraus hervorgehende aktivierte Caspase wird auch als „cleaved“ Caspase bezeichnet. Die Effektor-Caspasen werden als inaktive Procaspase-Dimere produziert und müssen durch die Initiator-Caspasen in eine große und eine kleine Untereinheit gespalten werden (Riedl *et al.* 2004). Dies ermöglicht eine Konformationsänderung, die die beiden aktiven Zentren des Dimers zusammenführt und eine funktionelle, reife Protease schafft (Riedl *et al.* 2004). Einmal aktiviert, kann eine Effektor-Caspase andere Effektor-Caspasen spalten und aktivieren, was zu einer positiven Rückkopplungsschleife der Caspase-Aktivierung führt (McIlwain *et al.* 2013).

Weitere Komponenten des Apoptose-Apparates sind die Proteine der Bcl2 (engl. B-cell lymphoma 2)-Familie (Rassow *et al.* 2016). Sie lassen sich in pro- und antiapoptotische Subfamilien aufteilen, entfalten ihre Wirkung in Mitochondrien und sind wesentlich für die Regulation des programmierten Zelltodes (Rassow *et al.* 2016). So sind zum Beispiel Bcl2 und Bcl-xL (engl. B-cell lymphoma-extra large), beides Mitglieder der Bcl2-Familie, in der Lage, an das C-terminale Ende des apoptotischen Protease-Aktivierungs-Faktor 1 (APAF1, engl.: apoptotic protease activating factor 1) zu binden, dadurch die Assoziation der Caspase 9 an APAF1 zu inhibieren und so deren Aktivierung zu verhindern. Auf diese Weise kann der ansonsten durch die aktivierte Caspase 9 eingeleitete Zelltod abgewendet werden. Des Weiteren ist bekannt, dass Bcl2 die Freisetzung des Cytochrom c aus Mitochondrien verhindern kann. Auf der anderen Seite vermitteln proapoptotische Proteine wie Bid die Freisetzung des Cytochrom c.

Ebenfalls an der Apoptose beteiligt sind die sogenannten Apoptose-Inhibitorproteine (IAPs, engl.: inhibitors of apoptosis proteins) (Rassow *et al.* 2016). Diese endogenen Caspase-Inhibitoren können sowohl den intrinsischen als auch den extrinsischen Weg der Apoptose

inhibieren (Montrobert 2010). Sie hemmen direkt sowohl die Initiator-Caspase 9 als auch die Effektor-Caspasen 3 und 7 (Hunter *et al.* 2007). Allen IAPs gemein ist das Vorhandensein von mindestens einer sogenannten BIR (engl.: Baculovirus IAP repeat)-Domäne, die für die Hemmung der Apoptose verantwortlich ist (Müller 2004).

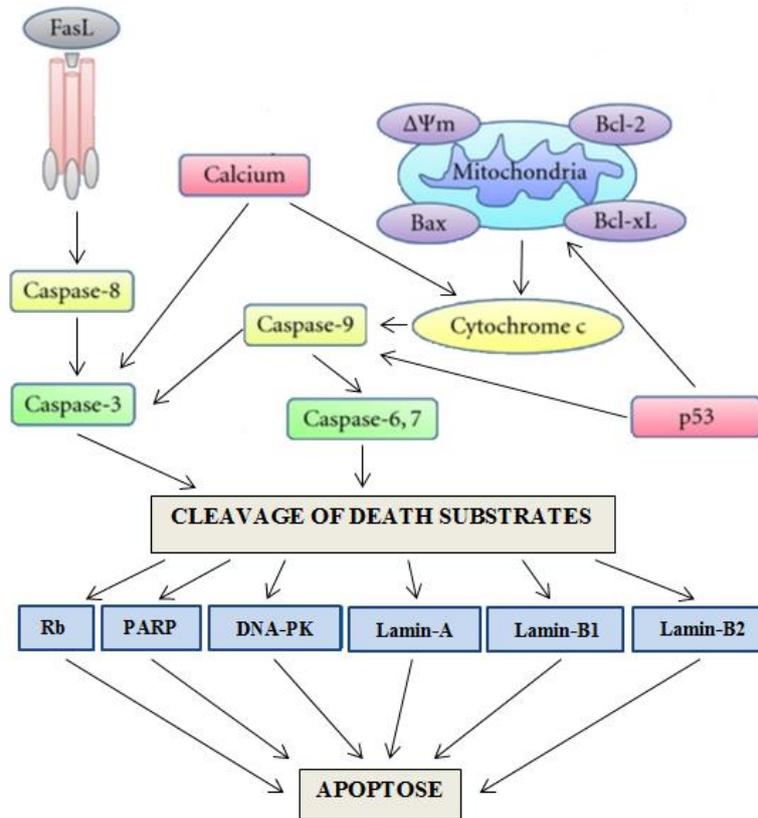


Abbildung 7: Caspase-Kaskade

Dargestellt sind die zellulären Caspase-Signalwege und ihre nukleären Zielstrukturen. (Abb. modifiziert aus <https://www.hindawi.com/journals/ijp/2012/637429/fig3/>)

Darüber hinaus ist auch die Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) in die Apoptose-Vorgänge involviert. Ihre proteolytische Spaltung durch die Caspase 3 stellt einen Zwischenschritt des programmierten Zelltodes dar und ihr Abbau kann als Marker betroffener Zellen genutzt werden (Satoh *et al.* 1992, Nicholson *et al.* 1995, Tewari *et al.* 1995, Cohen 1997, Oliver *et al.* 1998).

1.6.2.2 Der extrinsische Weg

Die Auslösung des programmierten Zelltodes ist über die beiden bis heute bekannten Hauptwege der Apoptose, die als der extrinsische und der intrinsische mitochondriale Signalweg bezeichnet werden, möglich (Müller-Esterl *et al.* 2011).

Die extrinsisch eingeleitete Apoptose wird durch extrazelluläre Signale ausgelöst (Müller-Esterl *et al.* 2011). Dabei interagiert die extrazelluläre Domäne eines transmembranen Zelloberflächenrezeptors mit einem spezifischen Liganden, der entweder einen löslichen Faktor oder ein Zellmembran-assoziiertes Protein darstellt. Die Rezeptoren werden auch Todesrezeptoren (DRs, engl.: death receptors) genannt und gelten als Mitglieder der Tumornekrose-Faktor (TNF)-Superfamilie. Zu ihnen zählen der TNF-Rezeptor 1 (TNFR1), CD95, Todesrezeptor 3 (DR3, engl.: death receptor 3), TNF-verwandter Apoptose-induzierender Ligand Rezeptor 1 (TRAIL-R1, engl.: tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand receptor 1) und TRAIL-R2. Die Gruppe der Todesliganden umfasst die homotrimeren Proteine TNF, CD95-Ligand, TRAIL und TNF-artiger Ligand 1A (TL1A, engl.: TNF-like ligand 1A) (Dreyer-Schmitt 2009, McIlwain *et al.* 2013). Nach der Ligandenbindung kommt es zur Cluster-Bildung (Trimerisierung) des Rezeptors und schließlich durch die zytosolische Bindung von Adaptermolekülen wie Fas-assoziierten Todesdomäne-Proteinen (FADDs, engl.: Fas-associated death domain proteins) zur Bildung des Zelltod-induzierenden Signalkomplexes (DISC, engl.: death inducing signaling complex) (Rassow *et al.* 2016). Über die Adaptermoleküle des DISC wird das Procaspase 8-Monomer über seine Todeseffektordomäne (DED, engl.: death effector domain) rekrutiert, was zu ihrer Dimerisierung und Aktivierung beiträgt. Die Schlüsselposition der Caspase 8 konnte in einem Mausmodell verdeutlicht werden, welches die Resistenz Caspase 8-defizienter Zellen gegenüber DR-induzierter Apoptose aufzeigte (Juo *et al.* 1998, Varfolomeev *et al.* 1998, Kang *et al.* 2004). Das Resultat der DR-vermittelten Aktivierung von Caspase 8 ist vom Zelltyp abhängig: In sogenannten Typ I-Zellen (zum Beispiel Thymozyten, periphere T-Zellen) initiiert Caspase 8 den Zelltod direkt durch die Rekrutierung von Effektor-Caspasen; in den phylogenetisch älteren Typ II-Zellen (zum Beispiel Hepatozyten) muss Caspase 8 zuerst den intrinsischen apoptotischen Weg aktivieren, um einen wirksamen Zelltod auslösen zu können (Samraj *et al.* 2006, Rassow *et al.* 2016). Typ I- und Typ II-Zellen unterscheiden sich in ihrem intrazellulären Gehalt an IAPs, die die Funktion der Effektor-Caspasen blockieren, sofern die IAPs nicht durch mitochondriale Proteine unterdrückt werden (Jost *et al.* 2009, Spencer *et al.* 2009).

Überdies bestehen Regulationsmechanismen, die zur zusätzlichen Aktivierung des intrinsischen Signalweges führen (Rassow *et al.* 2016). So kann Caspase 8 auch das

proapoptotische Bcl2-Protein Bid zu tBid katalysieren, welches seine Wirkung über die Mitochondrien entfaltet (Wei *et al.* 2000).

1.6.2.3 Der intrinsische Weg

Unabhängig der Stimulation von Zellmembranrezeptoren kann es über intrazelluläre Signale zur Freisetzung Apoptose-induzierender Proteine aus permeabilisierten Mitochondrien kommen (Rassow *et al.* 2016). Diese auch als mitochondriale Apoptose bekannte Signalkaskade kann durch eine Vielzahl von zellulären Stressauslösern, wie DNA-Schäden, Mangel an Wachstumsfaktoren oder Hypoxie, aktiviert werden (McIlwain *et al.* 2013). Die Initiator-Caspase 9 ist für die Einleitung dieses Apoptoseweges verantwortlich (McIlwain *et al.* 2013). Die zu ihrer Aktivierung erforderliche Dimerisierung erfolgt, wenn ihre CARD-Domäne (CARD, engl.: caspase activating and recruitment domain) an APAF1 bindet (Shiozaki *et al.* 2002). APAF1 und Caspase 9 liegen in der ruhenden Zelle als zytosolische inaktive Monomere vor. Bei intrazellulärem Stress kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen zugunsten der Apoptose-fördernden Proteinfamilie (Rassow *et al.* 2016). Es werden Permeabilitäts- und Transitionsporen gebildet, das Membranpotential der Mitochondrien bricht zusammen und es werden mitochondriale Apoptose-Mediatorproteine wie Cytochrom c ins Zytoplasma freigesetzt (Müller-Esterl *et al.* 2011, Rassow *et al.* 2016). Cytochrom c bindet an APAF1 und induziert eine Konformationsänderung des Monomers. Desoxy-ATP löst nachfolgend eine weitere Konformationsänderung von APAF1 aus. Sieben solcher aktivierten APAF1-Monomere bilden einen oligomeren Komplex, dessen Zentrum durch die CARDS gebildet wird und zur Bindung der Caspase 9 führt. Der Komplex, bestehend aus Cytochrom c, APAF1 und Caspase 9, wird als Apoptosom bezeichnet (Kang *et al.* 2000). Über dieses wird die Caspase 9 aktiviert, welche schließlich die Apoptose durch Rekrutierung der Effektor-Caspasen initiiert (Shi *et al.* 2016).

1.7 Hypoxieinduzierte Zellschädigung

Die verminderte Sauerstoffversorgung des Gesamtorganismus oder bestimmter Gewebsregionen wird als Hypoxie bezeichnet (Brahimi-Horn *et al.* 2007). Der Verlust von Kardiomyozyten durch den programmierten Zelltod infolge von hypoxischen Zuständen stellt einen wichtigen Mechanismus bei der Entwicklung von Herzerkrankungen dar (Stephanou *et*

al. 2000). Hypoxie wird durch verminderten kardialen Blutfluss verursacht und verhindert, dass das Herz ausreichend mit Sauerstoff versorgt wird (Feng *et al.* 2016). Während der Hypoxie wird die mitochondriale oxidative Phosphorylierung, die unter physiologischen Bedingungen die metabolischen Bedürfnisse der Zelle erfüllt, eingestellt und ATP wird über die weniger effiziente anaerobe Glykolyse produziert (Kang *et al.* 2000). Nach Ausschöpfung der Kapazität der anaeroben Glykolyse kann es zu Zelltod, intestinaler Fibrose und kardialer Hypertrophie kommen (Stephanou *et al.* 2000, Zheng *et al.* 2015, Nehra *et al.* 2016). Makroskopisch ist nach manifester Hypoxie mit Nekrose- und Narbenbildung zu rechnen (Gottlieb *et al.* 1994). In einem Versuchsmodell konnte gezeigt werden, dass eine 6-stündige Hypoxie die Hypertrophie von Kardiomyozyten induziert und dass eine anschließende Reperfusion sowohl apoptotische als auch hypertrophe Vorgänge in der Zelle weiter verstärkt (El Jamali *et al.* 2004).

Im Rahmen der Hypoxie kommt es zunächst zur Aktivierung verschiedener Proteine wie NF- κ B, GATA-Bindeprotein 4, CREB (engl.: cAMP responsive element binding protein) oder HIF1 α (engl.: hypoxia inducible factor 1 alpha) und neben einer vergrößerten Zelloberfläche ist auch ein Anstieg des Hypertrophie-assoziierten fötalen Genprogrammes (zum Beispiel ANP) ermittelt worden (Huang *et al.* 2003, El Jamali *et al.* 2004). Ebenfalls beteiligt sind die sogenannten reaktiven Sauerstoffradikale (ROS, engl.: reactive oxygen species), die bei oxidativem Stress und vor allem bei Reperfusion gebildet werden (Nishida *et al.* 2000). Es handelt sich um reaktive Moleküle und freie Radikale, die sich von molekularem Sauerstoff ableiten und zu schädlichen zellulären Ereignissen führen können (Hancock *et al.* 2001). Sie tragen zur Zytokin-vermittelten Hypertrophie bei und aktivieren ERKs und die Serin/Threonin-Kinasen AKTs (Nishida *et al.* 2000, El Jamali *et al.* 2004).

1.8 Die Proteine RND1 und MLF1

Zahlreiche Gene und ihre Proteine sind bereits im Zusammenhang mit kardialem „Remodeling“ beschrieben worden. Dennoch sind viele Signalwege unzureichend erforscht und eine Vielzahl beteiligter Proteine noch nicht identifiziert. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde ein „Microarray“ von RNA aus biomechanisch belasteten Herzmuskelzellen durchgeführt. Zwei der hierbei aufgedeckten und differenziell regulierten Gene waren die *Rho-family GTPase 1 (Rnd1)* und der *Myeloid leukemia factor 1 (Mlf1)* (Pott 2017, Rangrez *et al.* 2017).

1.8.1 RND1

RND1, ein Vertreter der Rho-GTPase-Familie, ist vor allem in der Leber und im Gehirn exprimiert und spielt eine entscheidende Rolle in der Kanzerogenese (Nobes *et al.* 1998, Okada *et al.* 2015). So nimmt RND1 Einfluss auf den Zellzyklus über RAS/MAP-Kinasen und scheint in einigen Tumorgeweben vermehrt exprimiert zu werden (Xiang *et al.* 2016). Des Weiteren wurde beschrieben, dass die Überexpression der Rho-family GTPase die zelluläre Größenzunahme und die Migration von Krebszellen fördert, während der „Knockdown“ das Wachstum, die Lokomotion und die Metastasierung betroffener Zellen hemmt (Xiang *et al.* 2016). Außerdem konnte gezeigt werden, dass RND1 den ERK-Signalweg aktiviert (Xiang *et al.* 2016).

Auch im Rahmen der neuronalen Differenzierung und der Modulation von Mikrotubulistabilität wird RND1 eine wichtige Funktion beigemessen (Tolias *et al.* 2011, de Souza *et al.* 2014). So ist nach Herunterregulation von RND1 ein vermindertes Axonwachstum und nach Überexpression das Bestehen multipler Axone beobachtet worden (Li *et al.* 2009). In Fibroblasten hemmt die GTPase die Bildung von Aktin-Stressfasern und die zelluläre Adhäsion (Nobes *et al.* 1998).

Darüber hinaus antagonisiert RND1 die RhoA/ROCK-induzierte Aktomyosin-Kontraktilität und nimmt dadurch eine regulatorische Position in der Zellmigration, Kontraktion glatter Muskulatur und Neuritenausdehnung ein (Nobes *et al.* 1998, Chardin 2006, Riou *et al.* 2010). Durch die Interaktion mit dem GTPase-Aktivierungsprotein p190 RhoGAP (engl.: GTPase activating protein) wird eine verminderte Kontraktilität induziert, die neben der Zellwanderung auch die Kontraktion glatter Muskulatur beeinflusst (Chardin 2006, Ishikawa *et al.* 2006, Riou *et al.* 2010). Der RhoA/ROCK-Signalweg ist außerdem an der Entwicklung der Herzhypertrophie beteiligt (Higashi *et al.* 2003). So wurde bereits beschrieben, dass die Hemmung der RhoA/ROCK-Signalkaskade das pathologische Herzwachstum verhindert (Kobayashi *et al.* 2002, Higashi *et al.* 2003, Hattori *et al.* 2004, Noma *et al.* 2006). Die Implikationen von RND1 in verschiedenen Modellen und Studien zur hypertrophen Kardiomyopathie lassen eine Rolle in der pathologischen Veränderung des Herzens vermuten.

1.8.2 MLF1

MLF1 wurde bisher vor allem im Zusammenhang mit akuter myeloischer Anämie (AML) und dem myelodysplastischen Syndrom (MDS) beschrieben (Yoneda-Kato *et al.* 1996). In einem

Mausmodell konnte gezeigt werden, dass MLF1 vorwiegend in gonadalem Gewebe und der Skelett-, Herz- und nur begrenzt in der glatten Muskulatur exprimiert wird (Hitzler *et al.* 1999). In lympho-hämatopoetischem Gewebe tritt MLF1 physiologisch nicht auf (Hitzler *et al.* 1999). Erst im Kontext von AML und MDS konnte eine Hochregulation des MLF1 festgestellt werden (Yoneda-Kato *et al.* 1999, Matsumoto *et al.* 2000, Falini *et al.* 2006). In einem MLF1-„Knockdown“-Mausmodell zeigten sich die Lymphozyten gegenüber apoptotischer Stimulation resistenter als die Zellen der Wildtyp-Tiere und auch auf Zellebene konnte die durch MLF1 vermittelte Apoptoseinduktion bestätigt werden (Sun *et al.* 2015). In einem weiteren Tiermodell wurde eine verstärkte Proliferationsfähigkeit von Kardiomyozyten nach MLF1-„Knockdown“ verifiziert (Muralidhar *et al.* 2014).

Die Überexpression von MLF1 bewirkt in der Skelettmuskulatur die Akkumulation von Proteinaggregationen, senkt aber gleichzeitig die Toxizität solcher Aggregate (Kazemi-Esfarjani *et al.* 2002, Li *et al.* 2008).

Weiterhin ist bekannt, dass MLF1 den p53/p21-Signalweg aktiviert und als nukleäres „Shuttle“-Protein fungiert (Yoneda-Kato *et al.* 2008). Über die Interaktion mit CSN3 (engl.: third component of the COP9 signalosome complex) und die Hemmung der Expression von COP1 (engl.: constitutively photomorphogenic 1) wird zusätzlich eine Stabilisierung von p53 erzielt (Yoneda-Kato *et al.* 2005). Dies bedeutet einen verstärkten Zelluntergang infolge der über p53 vermittelten Apoptoseeinleitung.

Im Kontext möglicher kardialer Funktionen von MLF1 sind bisher keine Informationen bekannt.

1.9 Zielsetzung

Kardiales „Remodeling“ wird unter anderem durch mechanischen oder humoralen Stress induziert und führt zu multiplen pathologischen Veränderungen von Morphologie und Funktion des Herzens. Das Verständnis der daran beteiligten pathologischen Mechanismen ist entscheidend für die Entwicklung potenzieller Therapien. Trotz umfangreicher Studien in diesem Bereich sind noch immer einige der durch Stress aktivierten Signalkaskaden und darin involvierte Proteine unbekannt.

Ziel dieses Projektes war die ausführliche Untersuchung und detaillierte Darstellung zweier Proteine. Dabei sollte insbesondere die Rolle des jeweiligen Proteins am Prozess des kardialen „Remodelings“ herausgearbeitet werden. Die vorliegende Forschungsarbeit basiert auf einem bereits erfolgten „Microarray“, der mittels RNA aus „gestreckten“ neonatalen Rattenkardiomyozyten durchgeführt wurde. Ziel war die Erfassung neuer, an der kardialen Hypertrophie beteiligter Zielgene. Zwei der im „Microarray“ signifikant regulierten Gene

waren *Mif1* und *Rnd1*. So konnten bereits erste Untersuchungen dazugehöriger Proteine bezüglich ihrer Regulation in weiteren Hypertrophie-Modellen durchgeführt werden. Dazu zählen mitunter die Behandlung der Kardiomyozyten mit Phenylephrin oder *in vivo* die transverse aortale Konstriktion am Mausmodell (Pott 2017).

Nachdem erforscht wurde, inwiefern *Rnd1* und *Mif1* nach Hypertrophie-erzeugenden Reizen in Kardiomyozyten reguliert werden, sollte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss der besagten Gene und ihrer zugehörigen Proteine auf die kardialen Muskelzellen weiter analysiert werden. Dazu sollten Adenoviren zur Überexpression und zum „Knockdown“ des jeweiligen Proteins generiert und anschließend die Effekte auf Zellgröße, ausgewählte Hypertrophie-Marker, Zellzyklus-Progression und Zellviabilität genauer beschrieben werden. Darüber hinaus sollte zur Identifizierung potenzieller Bindungspartner von RND1 ein „Yeast two-Hybrid Screen“ durchgeführt werden, um mögliche Beteiligungen an Signalwegen aufzudecken. Zur Bestätigung der im „Y2H-Screen“ identifizierten Interaktionen sah der Arbeitsplan Co-Immunopräzipitationen vor. Ebenfalls von Interesse war die Darstellung der intrazellulären Colokalisation zur Erforschung gemeinsamen physiologischen Auftretens. Weiterhin waren Luciferase-„Assays“ zur Analyse des regulatorischen Einflusses der interagierenden Proteine aufeinander und auf spezifische Signalwege geplant.

Auf diese Weise soll eine möglichst genaue Einordnung der beiden ausgewählten Proteine in das kardiale Gesamtgeschehen bei gleichzeitigem Entschlüsseln der molekularen Mechanismen sowie der Ableitung potenzieller Therapieansätze ermöglicht werden.

2 Material und Methoden

Dieses Kapitel dient der Erläuterung und Auflistung von sowohl mikro- und molekularbiologischen Verfahren als auch Zellkultur-spezifischen Methoden sowie der dazu benötigten Geräte und Materialien.

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Amersham Hybond-P PVDF membrane	GE Healthcare
Axiovert 40 C Microscope	Zeiss
BD Microlance™ 3	Becton Dickinson GmbH
Bioflex® Plates Collagen I	Flexcell International
Borsilikat-Petrischale 6 cm	Paracelsus
BZ-9000E HS All-in-one fluorescence microscope	Keyence
Cell Scraper 16 cm 2-position blade	Sarstedt
Cellstar cell culture dishes 6, 12, 24 well; 6 cm, 10 cm dishes	Greiner Bio one
Centrifuge 5810	Eppendorf
CFX96 Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad
Confocale Microscope LSM 510	Zeiss
Coverslips (18 mm Durchmesser)	Karl Hecht KG
CO ₂ Series Incubator	Shel Lab
DynaMag™-2 Magnetic Particle Concentrator	Invitrogen
Econo-Pac® Chromatography Columns	Bio-Rad
ECX-F26.M UV-trans illuminator	Peqlab
Electroporation cuvette	Peqlab
Filter, Papier (Whatman-Filterpapier), 110 mm Durchmesser	Schleicher & Schuell
Flexlink FX5000T-FLK-Stretcher	Flexcell International Corporation
FluorChem Q Camera	Alpha Innotech
Galaxy Ministar Microcentrifuge	VWR
Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo Scientific

Heraeus Pico 21 Centrifuge	Thermo Scientific
Herasafe Biologische Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific
Infinite M200 PRO Microplate Reader	Tecan
Injektionsmatrize	Adaptive Science Tools
MicroPulser™ Electroporator	Bio-Rad
Mikrowelle Sharp R-340F	Sharp
Mini PROTEAN Tetra System	Bio-Rad
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Scientific
MyCycler Thermal Cycler	Bio-Rad
NanoDrop 2000 spectrophotometer	Thermo Scientific
Neubauer-Zählkammer	Assistant
Parafilm	BEMIS
Pasteur Pipetten, Glas	Carl Roth
PC-10 Puller	Narishige
PD-10 Columns	GE Healthcare
Petrischalen 4 cm, 6 cm	Greiner Bio-One
PhosphorImager SI	GE Healthcare
Pipetten 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL	Sarstedt
Pipetten Eppendorf-Reference	Eppendorf Research
Pipettenspitzen Biosphere Filter Tip	Sarstedt
Pipettenspitzen, mit Filter	Sarstedt
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Power Pac HC	Bio Rad
Power Pack P25	Biometra
PP-Microplate 96 well	Greiner-Bio One
Precellys®24	Bertin InstrumentsF
Pressure Cell Press System	SIM-Aminco; Spectronic Instruments
Prolene 4-0	Ethicon
qRT-PCR plates, 96 well, semi skirted	Bio-Rad
RCT Basic magnetic stirrer	IKA
Rotator SB3	Stuart
Sartorius TE124S Waage	Sartorius
Sartorius TE1502S Waage	Sartorius
Seven Easy pH-Meter	Mettler-Toledo
Stemi 2000-C microscope	Zeiss
Steri-Cult 200 incubator	Labotect
Sterile filter 0,2 µm pores	Nalgene Labware

SterilGARD Hood	The Baker Company
Steritop-Flaschenaufsatzfilter Millipore	Carl Roth
Systec VX-65	Systec GmbH
TE1502S Präzisionswaage	Sartorius
ThermoMixer® Comfort	Eppendorf
Titan PCR-working station	Scanlaf
Tubes 0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL, 5 mL	Sarstedt
Tubes 15 mL, 50 mL	Sarstedt
Ultra-Turrax T25	IKA Labortechnik
Vacunsafe ventilation	Integra Biosciences
Variomag Poly Magnetrührer	Thermo Scientific
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Zellkultur-Flaschen 75 cm ² , 175 cm ²	Sarstedt

2.1.2 Chemikalien

Agarose	Biozym Scientific GmbH
Albumin fraction V, bovine	Merck KG
Albumin fraction V, bovine	Merck KG
Adenosine 5'-Triphosphate	New England Biolabs
Benzamidine–Sepharose Beads	AP Bioscience, LLC
Bromophenolblau	Sigma-Aldrich
BSA	New England Biolabs
Calciumnitrat	Carl Roth
Carbenicillin (Lösung und Salz)	Sigma-Aldrich
Cisplatin	ENZO Life Science
Ci [³² P]NAD ⁺	GE Healthcare
Collagen I – solution	BD Biosciences
Complete™ Protease Inhibitor Cocktail	Roche
DAPI	Sigma-Aldrich
dNTPs	Thermo Scientific
DEPC	Sigma-Aldrich
DMEM	PAA Laboratories
DMSO	Sigma-Aldrich
DNA Loading Dye 6 x	Fermentas
DTT 0,1 M	Invitrogen

DreamTaq 10 x green buffer	Thermo Scientific
Dynabeads™ Protein G	Thermo Scientific
EDTA	Serva Electrophoresis
Elution Buffer	Qiagen
Essigsäure	Carl Roth
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Invitrogen
EXPRESS SYBR® GreenER™	Invitrogen
FCS Gold	PAA Laboratories
First Strand RT-Buffer 5 x	Invitrogen
FluorPreserve Reagent	Merck KG
Gelatin	Sigma-Aldrich
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Fermentas
Glucose	Carl Roth
Glutathione Sepharose® 4B	GE Healthcare
Glycerol	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
HEPES	Carl Roth
IPTG (Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranosid)	Sigma-Aldrich
Isofluran Baxter	Baxter AG
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth
LB-Medium	Carl Roth
LB-Agar	Carl Roth
LB Broth Base	Thermo Scientific
Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen
L-Glutamine 100 x	Invitrogen
Methanol	Carl Roth
Natriumacetat	Carl Roth
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth
Natriumhydroxid	AppliChem
Magnesiumchlorid	Carl Roth
Magnesiumsulfat	Carl Roth
2-Mercaptophenol	Sigma-Aldrich
NCS	PAA Laboratories

NIH U Thrombin	GE Healthcare
NP40 Cell Lysis Buffer	Thermo Scientific
PageRuler Plus prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Pancreatin	Sigma-Aldrich
PCR Buffer 10 x	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen/GIBCO
Percoll	GE Healthcare
PGEX-2T Plasmid	GE Healthcare
Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol	Carl Roth
Phenolrot Indikator-Lösung	Hach®
Phenylephrin	Sigma-Aldrich
Phusion® Buffer 5 x	New England Biologicals
2-Propanol	Carl Roth
Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bradford)	Bio-Rad
Propirumiodid	Sigma-Aldrich
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen
Hexanukleotid Random-Primer-Mix	Carl Roth
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth
Salzsäure	Carl Roth
SDS	Serva Electrophoresis
TEMED 99 % p.a. Electrophoresis	Carl Roth
Temgesic®	Indivior Eu Limited
Trichlormethan/Chloroform	Carl Roth
Tris-Base	Carl Roth
Tris-HCl	Carl Roth
Triton X-100	Serva Electrophoresis
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA-solution	Invitrogen/GIBCO
Tween® 20	Carl Roth
Vectashield HardSet Mounting Medium	Vecta-Labs

2.1.3 Enzyme

Collagenase type 2	Worthington/Cellsystems
Complete-Proteinase Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics

C3 Transferase (Clostridium botulinum)	Sigma-Aldrich
Desoxyribonuclease I (DNase I)	Sigma-Aldrich
DreamTaq DNA-Polymerase (GreenTaq)	Thermo Scientific
LR-Clonase® II	Invitrogen
BP-Clonase® II	Invitrogen
iQ™ Multiplex Powermix	Bio-Rad
Pacl-Endonuklease®	Thermo Scientific
Pancreatin	Sigma
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs
Phosphatase-Inhibitor 2 und 3	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Invitrogen
Power SYBR™ Green Master Mix	Thermo Scientific
RNase OUT™	Invitrogen
SuperScript® III RT (200 units/μL)	Invitrogen
T4 DNA Ligase	New England Biolabs

2.1.4 Puffer

ADS-Puffer (10-fach)

1160	mM	NaCl
197	mM	HEPES
94	mM	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O
55,5	mM	Glucose
53,6	mM	KCl
8,3	mM	MgSO ₄

pH 7,4; steril gefiltert

Kern-Lyse-Puffer (KLP)

50	mM	Tris-HCL
ad pH 7,5		NaOH (1 M)
150	mM	NaCl
1	mM	EDTA
5	% (v/v)	Glycerol

Zu 1 mL KLP wurden hinzugefügt:

40 μL	25-fach Protease-Inhibitor-Cocktail
-------	-------------------------------------

10 µL	Phosphatase-Inhibitor 2
10 µL	Phosphatase-Inhibitor 3
1 µL	1M DTT

Laufpuffer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (10-fach)

0,25 M	Tris
1,9 M	Glycin
1 % (w/v)	SDS

Laemmli-Puffer (4-fach)

250 mM	Tris pH 6,8
5 % (w/v)	SDS
40 % (v/v)	Glycerin
5,8 ⁻³ % (w/v)	Bromophenolblau
10 % (v/v)	2-Mercaptoethanol

PCR-Reaktionspuffer (10-fach)

100 mM	Tris-HCl; pH 8,3; 25 °C
500 mM	KCl
15 mM	MgCl ₂
10 ⁻² %	Gelatine

Phosphate Buffered Saline (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

Sammelgel-Puffer

0,5 M	Trispuffer
0,4 % (w/v)	SDS
pH 6,8	HCL

TAE-Puffer 50-fach (1 L)

0,5 M	Tris Base
0,05 M	EDTA
pH 8	Essigsäure

ad ddH₂O

TBS (10-fach)

0,25 M Tris Base
 1,5 M NaCl
 pH 7,5 HCL 25 %
 ad ddH₂O

TBST

1-fach 10-fach TBS
 0,1 % (v/v) Tween® 20
 ad ddH₂O

Transfer-Puffer

20 % (v/v) Methanol
 25 mM Tris
 192 mM Glycin
 3⁻³ % (w/v) SDS

Trenngel-Puffer

1,5 M Tris
 0,4 % (w/v) SDS
 pH 8,8 HCl

Trypsin-EDTA-Lösung

0,25 % (w/v) Trypsin
 0,53 mM EDTA
 in PBS

Verdauungs-Lösung (500 mL)

300 mg Pankreatin (0,6 mg/mL)
 250 mg Collagenase Typ 2 (0,5 mg/mL)

Percoll-Gradient (8 Gradienten):

Stocklösung:	Percoll	45 mL
	10-fach ADS-Puffer	5 mL
Top-Layer:	Stocklösung	18 mL

	1-fach ADS-Puffer + Phenolrot	22 mL
Bottom-Layer:	Stocklösung	26 mL
	1-fach ADS-Puffer farblos	14 mL

2.1.5 Medien

Kulturmedium für die Kardiomyozyten

DMEM-Medium 500 mL +

50 mL FCS Gold

5,5 mL Penicillin-Streptomycin

5,5 mL Glutamin

Kulturmedium für HEK293A-Zellen

„advanced“ DMEM-Medium 500 mL +

50 mL FCS Gold

5,5 mL Penicillin-Streptomycin

5,5 mL Glutamin

LB-Medium (500 mL)

10 g LB

7,5 g Agarose

ad 500 mL H₂O

Je nach Verwendung wurde 1 mL (100 µg/mL) Carbenicillin oder Kanamycin hinzugegeben.

LB-Agar (500 mL)

10 g LB Broth Base

7,5 g Agarose

500 mL ddH₂O

500 µL Carbenicillin-Lösung (100 µg/mL)

50 mg Carbenicillin-Salz

0,1 % NP40-PBS (100 mL)

10 mL PBS (10-fach)

1 mL NP40 (10 %)

ad 89 mL ddH₂O

2.1.6 Primer

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG bezogen.

qRT-PCR-„Primer“ (SYBR Green)

Tabelle 2: Liste der „Primersequenzen“ für SYBR Green qRT-PCR aus *Rattus norvegicus*

Gen	„Forward“	„Reverse“
<i>Rnd1</i>	ACAGTGCCTCAAGAAGTGGAG	CAACTGCTTGGCTATCGCAC
<i>Mlf1</i>	TTGGGAGGTTTGGCGGAATG	TCCATTGAAAGCTGGCCAAAG
<i>Nppa</i>	AAACTGAGGGCTCTGCTCGC	GGCTGTTATCTTCGGTACCGGAAG
<i>Nppb</i>	TCCGGATCCAGGAGAGACTTCG	TCCTAAAACAACCTCAGCCCCTC

Tabelle 3: Liste der „Primersequenzen“ für SYBR Green qRT-PCR aus *Mus musculus*

Gen	„Forward“	„Reverse“
<i>Rnd1</i>	ACAGTGCCTCAAGAAGTGGAG	CAACTGCTTGGCTATCGCAC
<i>Mlf1</i>	GCCTTTTGAAGGTTTGGTGG	GTTGGCCAAAGTTTCTTTGTAAGTC
<i>Myozap</i>	GCTGGCACCATGCTGCGCTCCACGTCC	GCTGGGTCGCCCTAAGTCAGCGTTTTCTT
<i>Nppa</i>	CCCTGGGCTTCTTCCTCGTCTT	TCCAGGTGGTCTAGCAGGTTCTTG
<i>Nppb</i>	GTCGTTTGGGCTGTAACGCACT	CACTTCAAAGGTGGTCCCAGAGC
<i>Rpl32</i>	GGTGGCTGCCATCTGTTTTACG	CCGCACCCTGTTGTCAATGC

qRT-PCR-„Primer“ („Multiplex“)

Tabelle 4: Liste der „Primersequenzen“ für „Multiplex“-qRT-PCR aus *Rattus norvegicus*

<i>Nppa</i>	„Forward“	GGAGCAAATCCTGTGTACAGTG
	„Reverse“	ACCTCATCTTCTACCGGCAT
	„Probe“	FAM-TGATGGATTTCAAGAACCTGCTAGACCA-BHQ1
<i>Nppb</i>	„Forward“	AGAAGATAGACCGGATCGGC
	„Reverse“	AGCCAGGAGGTCTTCCTAAA
	„Probe“	HEX-TCAGCCCGTCACAGCCCAAGCGA-BHQ1
<i>Rcan1-4</i>	„Forward“	TAGCTCCCTGATTGCTTGTG
	„Reverse“	GGATTCAAATTTGGCCCTGG
	„Probe“	CY5.5 - ACGATGATGTCTTCAGCGAAAGTGAGAC – Eclipse
<i>Rpl32</i>	„Forward“	CTGCTGATGTGCAACAAATCT
	„Reverse“	GCTGTGCTGCTCTTTCTACAAT

	„Probe“	TexasRed - ACTGTGCTGAGATTGCTCACAATGTGT - BHQ2
--	---------	---

Gateway® „Primer“

Tabelle 5: Liste der „Primersequenzen“ für die Klonierung mit dem Gateway® Protokoll

Name	Sequenz	Funktion
attB-1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCTGGCACC	attB-seitiger „Adapter-Forward-Primer“
attB-2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCGC	attB-seitiger „Adapter-Reverse-Primer“
M13-(-20)-F	GTAAAACGACGGCCAG	„Forward-Primer“ für das „Insert“ im pDONR221-Vektor
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC	„Reverse-Primer“ für das „Insert“ im pDONR221-Vektor
Rnd1_gw_F	GCTGGCACCATGAAGGAGAGACGGACA	„Forward-Primer“ für ORF von RND1 in <i>Rattus norvegicus</i> + Anteil der attB-„Site“
Rnd1_gw_R	GCTGGGTCCGCTCACATGATAGAACAGCT	„Reverse-Primer“ für ORF von RND1 in <i>Rattus norvegicus</i> + Anteil der attB-„Site“
Rnd1_gw_hu-F	GCTGGCACCATGAAGGAGAGACGGGCCCC	„Forward-Primer“ für ORF von RND1 in <i>Homo sapiens</i>
Rnd1_gw_hu-R	GCTGGGTCCGCCGCTTTTGGCCTTTTCCTTCTTGAAGGT	„Reverse-Primer“ für ORF von RND1 in <i>Homo sapiens</i>
Mlf1_gw_F	GCTGGCACCATGTTCCGGATGTTGAGC	„Forward-Primer“ für ORF von MLF1 in <i>Rattus norvegicus</i> + Anteil der attB-„Site“
Mlf1_gw_R	GCTGGGTCCGCTTATTTTTTGGTGATTTTC	„Reverse-Primer“ für ORF von MLF1 in <i>Rattus norvegicus</i> + Anteil der attB-„Site“
Mlf1_iso1_gw_hu_F	GCTGGCACCATGTTCCAGGATGCTGAACAGCAGTTTTG	„Forward-Primer“ für ORF von MLF1 Isoform 1 in <i>Homo sapiens</i>
Mlf1_iso1_gw_hu_R	GCTGGCACCATGTTCCAGGATGCTGAACAGCAGTTTTG	„Reverse-Primer“ für ORF von MLF1 Isoform 1 in <i>Homo sapiens</i>
pGL_4.34_attB	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCTGGCTAGTATGTCATATTAGGACATCTACC	„Forward-Primer“ für „Firefly“- und Renilla-Luciferase + Anteil der attB-„Site“
pGL_4.74_attB	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCTGGCTAAATGAGTCTTCGGACCTCG	„Forward-Primer“ für „Firefly“- und Renilla-Luciferase + Anteil

		der attB-„Site“
pGL4_attBR pA	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTA CCACATTTGTAGAGGTTTACTTG	„Reverse-Primer“ für „Firefly“- und Renilla-Luciferase + Anteil der attB-Site
pAd/CMV/V5 -F	TAATACGACTCACTATAGGG	„Forward-Primer“ für das „Insert“ im pAd/CMV/V5 „Destination“- Vektor

Tabelle 6: Liste eingesetzter „Primersequenzen“ zur Klonierung synthetischer microRNAs zum „Knockdown“ von RND1 und MLF1

Name	Sequenz	Funktion
Block-iT_miR- <i>Rnd1</i> _Top	TGCTGTACATCTGACCACCACTGGCTGTTTTGGCCACTGACTG ACAGCCAGTGGGTCAGATGTA	micro-RNA- Sequenz gegen RND1
Block-iT_miR- <i>Rnd1</i> _Bot	CCTGTACATCTGACCCACTGGCTGTCAGTCAGTGGCCAAAACA GCCAGTGGTGGTCAGATGTAC	
Block-iT_miR- <i>Mlf1</i> _Top	TGCTGAAGAGGTTTCAGAGAACTTCTGTTTTGGCCACTGACTG ACAGAAGTTTCTGAACCTCTT	micro-RNA- Sequenz gegen MLF1
Block-iT_miR- <i>Mlf1</i> _Bot	CCTGAAGAGGTTTCAGAACTTCTGTCAGTCAGTGGCCAAAACA GAAGTTTCTCTGAACCTCTT	

2.1.7 Antikörper

2.1.7.1 Primärantikörper

Tabelle 7: Liste der primären Antikörper

Anti-	Wirt	mono- /polyklonal	Hersteller	Verdünnung WB	Verdünnung ICC	Verdünnung IP
Caspase 3	Kaninchen	monoklonal	Cell signaling	1:1.000	k. A.	1:50
Caspase 7	Kaninchen	monoklonal	Cell signaling	1:1.000	k. A.	k. A.
Cyclin D1	Kaninchen	polyklonal	Biozol	1:1.000	k. A.	k. A.
Cyclin D2	Maus	polyklonal	Cell signaling	1:500	k. A.	k. A.
Cyclin D3	Maus	polyklonal	Biozol	1:1.000	k. A.	k. A.

GAPDH	Maus	monoklonal	Sigma	1:10.000	k. A.	k. A.
HA	Kaninchen	polyklonal	Sigma	1:750	k. A.	1:200
Histidin	Maus	monoklonal	Sigma	1:3.000	k. A.	1:500
Histon H3	Kaninchen	polyklonal	Abcam	1:1.000	1:500	k. A.
Ki67	Kaninchen	monoklonal	Abcam	k. A.	1:50	1:50
MLF1	Kaninchen	polyklonal	Proteintech	1:1.000	1:10	1:500
Myozap	Maus	monoklonal	Progen	1:10	unverdünnt	unverdünnt
PARP	Kaninchen	monoklonal	Cell signaling	1:1.000	k. A.	k. A.
PHH3	Kaninchen	monoklonal	Cell signaling	1:500	1:200	1:100
p53	Kaninchen	monoklonal	Cell signaling	1:1.000	k. A.	1:200
RND1	Kaninchen	polyklonal	LS Bio	1:1.000	1:10	1:10
Tubulin	Maus	monoklonal	Sigma	1:10.000	k. A.	k. A.
α -Actinin	Maus	monoklonal	Sigma	1:1.000	1:200	k. A.

2.1.7.2 Sekundärantikörper

Tabelle 8: Liste der sekundären Antikörper

Anti-	gekoppelt mit	Wirt	mono- /polyklonal	Hersteller	Verd. WB	Verdünnung ICC
Kaninchen	HRP	Esel	polyklonal	Santa Cruz	1:2.000	k. A.
Maus	HRP	Ziege	monoklonal	Santa Cruz	1:2.000	k. A.
Maus	AF546	Esel	polyklonal	Life Technologies	1:1.000	1:500
Kaninchen	AF488	Ziege	polyklonal	Dianova	1:1.000	1:500

2.1.8 Plasmide

pAd/CMV/V5 Dest

Invitrogen

pcDNA3.1

Invitrogen

pDONR 221

Invitrogen

pGEX-2T

Addgene

2.1.9 „Kits“

Block-iT™ Pol II miR RNAi - Expression Vector Kit	Invitrogen
Cell proliferation Kit, MTT I	Roche
ECL-Select detection system	GE Healthcare
DC™ Protein Assay	Bio-Rad
Dual-Glo® Luciferase Assay System	Promega
Nucleo Spin Plasmid Kit	Macherey-Nagel
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix	Invitrogen
Qiagen <i>Plus</i> Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Superscript III First Strand Kit	Invitrogen
ViraPower™ Adenoviral Kit	Invitrogen

2.1.10 Bakterien

DH10B Escherichia coli, elektrokompetent	Life Technologies
OneShot® TOP10-Bakterien, elektrokompetent	Life Technologies
Escherichia coli TG1, elektrokompetent	Agilent Technologies

2.1.11 Zelllinien

Tabelle 9: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
HEK 293A (human embryonic kidney)	menschliche embryonale Nierenzellen mit adhärentem Wachstum
NRVCMs (neonatal rat ventricular cardiomyocytes)	präparierte Rattenkardiomyozyten aus neonatalen Tieren (1-3 Tage); zeigen ebenfalls adhärentes Wachstum

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Generierung elektrokompetenter Bakterien

Zur Transformation mittels Elektroporation werden Bakterien benötigt, die zur Aufnahme von Plasmiden aus dem Kulturmedium nach der Anwendung von hohen Spannungen fähig sind.

Um kompetente Bakterien herzustellen, wurden 50 mL LB-Medium mit DH10B-Bakterien angeimpft und bei 37 °C ü. N. bei 200 rpm inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde 1 L LB-Medium mit der Übernachtskultur vermischt und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,8 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur zügig in einem Eis-Wasserbad abgekühlt und die Zellen bei 4 °C, 11.000 g und für 15 min zentrifugiert. Das „Pellet“ wurde zweimal mit eiskaltem ddH₂O resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nachfolgend wurde das gebildete „Pellet“ in 250 mL 10 % (v/v) Glycerol aufgenommen und ein weiteres Mal zentrifugiert. Der Niederschlag wurde umgehend in 1,5 mL 10 % (v/v) Glycerin gelöst und aliquotiert. Diese elektrokompetenten Bakterien wurden auf Trockeneis bis -80 °C abgekühlt und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.2 Elektroporation

Um ausgewählte Plasmide in elektrokompetente Bakterienzellen (zum Beispiel E. coli DH10B) einzuschleusen, lässt sich mittels Elektroporation die Zellmembran kurzfristig permeabilisieren.

Die elektrokompetenten E. coli-Bakterien wurden für 5 min auf Eis gelagert und anschließend mit 5 ng der Plasmid-DNA inkubiert. Die Suspension wurde in eine vorgekühlte (-20 °C) Elektroporationsküvette übertragen und bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF transformiert. Danach wurde 1 mL LB-Medium zu der Bakterien-Suspension gegeben und das Gemisch in ein neues „Tube“ überführt. Es folgte eine Inkubation der transformierten Bakterien für 1 h bei 37 °C und 770 rpm in einem ThermoMixer®. Die Bakterien wurden anschließend auf LB-Agarplatten, die zuvor mit geeignetem Antibiotikum versetzt wurden, ausplattiert.

2.2.1.3 Herstellung von Agarplatten

Zunächst wurde LB-Medium mit 1,5 % Agarpulver angesetzt und anschließend autoklaviert. Die Lösung wurde auf 55 °C abgekühlt, mit Antibiotika behandelt und in vorgesehene 10 cm Petrischalen gegossen. Nach Abkühlen der Schalen wurden diese bei 4 °C zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.1.4 Anzucht von Bakterien auf Agar-Nährböden

Die transformierten Bakterien wurden auf Agarplatten gegeben und mithilfe von Glasperlen möglichst gleichmäßig verteilt. Je nach Plasmid gaben wir ein unterschiedliches Volumen (50-200 µL) des Transformationsansatzes auf die Nährböden. Anschließend wurden die Platten bei 37 °C ü. N. inkubiert. Am Folgetag konnten mittels Pipettenspitzen einzelne Klone für weiterführende Experimente ausgesucht werden.

2.2.1.5 Wachstum von Bakterien in Flüssigkulturen

Nach Aufnahme von Klonen in jeweils 6 mL LB-Medium, welches zuvor mit entsprechendem Antibiotikum versetzt wurde, konnten die transformierten Bakterien ü. N. bei 37 °C und 200 rpm proliferieren. Die daran anschließende Plasmid-Isolierung war nach 14-16 h möglich.

2.2.2 Zellkulturmethoden

2.2.2.1 Kultur und Behandlung von neonatalen Kardiomyozyten

Sämtliche Arbeitsschritte, bei denen NRVCs involviert waren, wurden ausschließlich unter der sterilen Sicherheitswerkbank durchgeführt, um jedwede Kontamination zu vermeiden. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.2.2 Kollagenisierung von Zellkulturschalen und -platten

Durch das Kollagenisieren wird die Anheftung von Zellen an den Wachstumsflächen von Zellkulturschalen und -platten optimiert.

Bevor die Zellen ausgesät werden konnten, wurden alle Kulturschalen und -platten zuvor mit Kollagen beschichtet. Dafür wurde eine Kollagen I-Stamm-Lösung (3,1 mg/mL) zu einer Konzentration von 50 µg/mL verdünnt. Zellkulturschalen wurden mit 5-10 µg/cm² Kollagen I-Lösung ü. N. beschichtet, nach zweimaligem Waschen mit ddH₂O bei 4 °C getrocknet und bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

2.2.2.3 Präparation neugeborener Rattenkardiomyozyten (NRVCMs)

Eine sorgfältige Präparation von Kardiomyozyten aus den Ventrikeln neonataler Rattenherzen stellt die Basis anknüpfender biomolekularer Methoden dar. So können exakte Aussagen bezüglich des Herzmuskelgewebes getroffen werden, da übrige Gewebe zuvor sauber entfernt worden sind.

Um primäre Kulturen von neonatalen Rattenkardiomyozyten herzustellen, wurden ca. 30-150 1-3 Tage alte Ratten vom Wistar-Stamm pro Präparation weiterverarbeitet. Nach kurzem, aber vollständigem Eintauchen der Tierkörper in 75 % Ethanol wurden die Ratten mittels scharfer Scheren zügig enthauptet, ihre Herzen entnommen und diese in kalten ADS-Puffer gegeben. Im weiteren Verlauf wurden die Vorhöfe entfernt und die Ventrikel in frischen ADS-Puffer umgesetzt. Nachdem der Puffer abgenommen war, konnte mithilfe kleiner Scheren das restliche Herzgewebe grob zerkleinert werden, bevor es in die vorgewärmte Verdauungslösung überführt wurde. Diese wurde vor der Präparation hergestellt. Für 100 mL Verdauungslösung benötigte man 60 mg Pankreatin (-20 °C) und 50 mg Kollagenase 2 (4 °C), die in ADS-Puffer (1-fach) aufgelöst wurden. Die Lösung wurde nun bei 40 rpm und 37 °C für 20 min im Wasserbad geschüttelt. Der Überstand konnte anschließend abgenommen und verworfen werden. Frische Verdauungslösung wurde hinzugegeben und es erfolgte erneutes Inkubieren im Wasserbad für 20 min. Nachfolgend wurde der Überstand mit einer Pipette abgenommen und weiterverarbeitet, während zu dem verbliebenen Gewebe wiederholt Verdauungslösung zugegeben werden musste, bis dieses vollständig gelöst war. Der Überstand wurde dabei jedes Mal auf einen Filter gegeben. Dieser wurde mit NCS (engl.: newborn calf serum) gespült, um aufgefangene Kardiomyozyten herauszuwaschen.

Die Suspension wurde in einem 50 mL Röhrchen aufgefangen. Anschließend konnte das Kardiomyozyten/NCS-Gemisch bei 1.000 rpm für 5 min zentrifugiert werden. Das „Zellpellet“ wurde mit 5 mL NCS resuspendiert und bei 37 °C inkubiert. Nach 4-5 dieser Verdauungsschritte wurden die „gepoolten“ und in NCS gelösten Zellen zentrifugiert, pelletiert und in 50 mL ADS-Puffer aufgenommen. Da neben Kardiomyozyten noch andere Zelltypen wie Erythrozyten oder Fibroblasten in der Lösung enthalten waren, wurden die Zellen ihrer Dichte nach mittels eines Percoll-Gradienten aufgetrennt. Zunächst setzten wir eine Stocklösung des Percoll-Gradienten aus 27 mL Percoll und 3 mL 10-fachem ADS-Puffer an. Aus dieser Stammlösung wurde je eine Lösung mit hoher und niedriger Dichte erzeugt. Die Lösung mit der geringeren Dichte enthielt dabei 9 mL der Stammlösung und 11 mL ADS-Puffer. 4 mL der geringen Dichte-Lösung wurden in einen 15 mL Reaktionsröhrchen pipettiert. Die Percoll-Lösung mit höherer Dichte enthielt dagegen 13 mL Stammlösung und 7 mL ADS-Puffer und wurde zu dem 15 mL Röhrchen gegeben. Anschließend wurde die Percoll-Lösung höherer Dichte mit äußerster Sorgfalt durch diejenige mit geringerer Dichte auf den Boden des Röhrchens pipettiert. Es wurde darauf geachtet, dass möglichst langsam und ruhig pipettiert wurde, um die Bildung von Luftblasen zu verhindern. Die Zugabe von Phenolrot auf die Lösung mit der geringeren Dichte ermöglichte anschließend die Visualisierung der Gradienten-Phasentrennung. Je 500 µL der Zellsuspension wurden vorsichtig auf einen Gradienten gegeben und bei 7.000 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Die enthaltenen Zellen wurden ihrer Dichte nach auf die drei Phasen der Säule verteilt. So enthielt die obere Phase die Fibroblasten, die daran anknüpfende Interphase die Kardiomyozyten und am Boden des 50 mL Röhrchens befand sich das „Erythrozytenpellet“. Die Interphase mit den Myozyten wurde in zwei 50 mL Röhrchen überführt und dann mit kaltem ADS-Puffer (1-fach) auf 50 mL aufgefüllt. Nach 5 min Zentrifugation bei 1.000 rpm wurden die „Pellets“ vereinigt und erneut mit ADS-Puffer (1-fach) gewaschen. Die „Pellets“ wurden jeweils in 1 mL Kulturmedium aufgenommen. Danach konnten die Kardiomyozyten mittels der Neubauer-Methode nach Anfärben mit Trypanblau ausgezählt werden. Die Myozyten wurden je nach weiterer Versuchsplanung in unterschiedlicher Anzahl auf zuvor kollagenisierte Platten ausgesät (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Anzahl ausgesäter Zellen in Abhängigkeit vom Plattentyp und geplantem Versuch

Plattentyp	geplanter Versuch	Zellen pro Well
10 cm Schale	Co-IP	8.000.000
6 „Well“ Platte	Proteinernete	1.000.000
6 „Well“ Platte	RNA-Ernte	750.000
6 „Well“ „Stretcher“-Platte	Proteinernete	1.500.000
6 „Well“ „Stretcher“-Platte	RNA-Ernte	1.000.000
6 „Well“ „Stretcher“-Platte	Zellgröße, Bestimmung der Proliferation	800.000

12 „Well“ Platte	Luciferase-„Assay“	350.000
12 „Well“ Platte mit „Coverslips“	Zellgröße, Bestimmung der Proliferation	180.000

Die ausgesäten NRVCs wurden auf beschichteten Platten in Wachstumsmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 h kultiviert.

Die Tötung zur Organentnahme und Isolation von NRVCs wurde durch das Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigt und unter strikter Berücksichtigung der Ethikrichtlinien durchgeführt.

2.2.2.4 Kultur und Behandlung von HEK239A-Zellen

Das Kultivieren von HEK239A-Zellen ist in der vorliegenden Arbeit wesentlich für die Produktion rekombinanter Adenoviren.

Kryokonservierte HEK239A-Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert und rasch in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Nach Zugabe von jeweils 1 mL aufgewärmtem Wachstumsmedium zu den Zellen konnte die Suspension in eine T75-Kulturtasche mit weiteren 8 mL Medium überführt werden. Die HEK239A-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70-80 % herausgelöst. Dies erfolgte, nachdem der Zellrasen zunächst mit warmer Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, engl.: phosphate buffered saline) gewaschen wurde. 2 mL einer Trypsin-EDTA-Lösung wurden hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 1-2 min bei 37 °C konnten 10 mL Wachstumsmedium der Zellsuspension hinzugefügt werden, um die Trypsinaktivität zu stoppen. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 3.800 rpm und RT zentrifugiert. Das „Zellpellet“ resuspendierten wir mit warmem Wachstumsmedium und zählten die Zellen mithilfe der Methode nach Neubauer aus. Im Folgenden konnten die Zellen auf frische Platten umgesetzt werden.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Extraktion von Plasmid-DNA - Mini-Präparation

Die Extraktion von Plasmid-DNA erfolgte aus 3 mL einer ü. N. angesetzten E. coli-LB-Kultur. Hierfür wurde das NucleoSpin® Mini-Präparations-„Kit“ verwendet. Die kultivierte

Bakteriensuspension wurde portionsweise in ein 2 mL „Tube“ überführt und bei 11.000 rpm und RT für jeweils 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Auf jedes „Pellet“ wurden nun 500 µL des bei 4 °C gekühlten A1-Puffers pipettiert und diese vollständig resuspendiert. Des Weiteren wurden 500 µL A2-Puffer hinzugegeben und die Suspension sorgfältig gemischt. Nach einer Inkubation bei RT für 5 min wurden 600 µL A3-Puffer hinzugefügt und der Ansatz erneut bei 11.000 rpm und RT für 5 min zentrifugiert. Der Überstand konnte anschließend auf eine Säule gegeben und diese in ein neues „Tube“ gesetzt werden. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 11.000 rpm und RT für 2 min. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule konnte nun mit 500 µL AW-Puffer (Waschpuffer) gewaschen werden. Nach erneutem Zentrifugieren (11.000 rpm, RT, 2 min) wurden 600 µL A4-Puffer auf die Membran gegeben und die „Tubes“ für 2 min zentrifugiert (11.000 rpm, RT). Um die DNA eluieren zu können, mussten die Säulen in frische „Tubes“ gesetzt und die Membranen mit 30 µL AE-Puffer benetzt werden. Nach einer Inkubation von 2 min wurden die „Tubes“ bei RT und 11.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt folglich die Plasmid-DNA, deren Konzentration anschließend am NanoDrop 2000 gemessen werden konnte.

2.2.3.2 Extraktion von Plasmid-DNA - Midi-Präparation

Wurden größere Mengen an Plasmid-DNA benötigt, konnten diese mithilfe des Qiagen Plasmid Plus Maxi Kit extrahiert werden. E. coli-Bakterien, LB-Medium und das gewünschte Plasmid wurden dafür ü. N. bei 37 °C hochgezogen. 100 mL der Bakteriensuspension wurden anschließend bei 4.700 rpm und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Nach Abnahme der Überstände wurden die „Pellets“ in 2 mL 4 °C kaltem P1-Puffer resuspendiert und 2 mL P2-Puffer hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei RT. Danach wurden 2 mL P3-Puffer zu dem Lysat gegeben und die Proben 6-8 x invertiert. Für jede Probe wurde eine QIAfilter „Cartridge“ auf ein 50 mL Reaktionsröhrchen gesteckt und das jeweilige Reaktionsgemisch eingefüllt. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT konnte das Lysat mithilfe eines Stempels durch einen Filter in das „Tube“ gedrückt werden. Pro Lysat wurde eine Säule auf die QIAvac 24 Plus gesetzt und zusätzlich ein „Tubeextender“ auf die Säule gesteckt. Nachdem jeweils 2 mL BB-Puffer zu den Proben gegeben und diese invertiert worden waren, konnten sie in die entsprechenden „Tubeextender“ überführt werden. Mit 300 mbar wurde das Lysat durch die Säule bewegt. Nun folgte ein Waschschrift, bei dem 700 µL ETR-Puffer auf die Säule gegeben und anschließend wieder abgesaugt wurden. Im Anschluss wurden 700 µL PE auf die Membranen pipettiert, abgesaugt und die Säulen zur vollständigen Entfernung des Puffers

für 1 min bei 10.200 rpm zentrifugiert. Nachdem die Säulen in frische „Tubes“ übergesetzt worden waren, konnte die in den Membranen gefangene DNA mit jeweils 200 µL EB-Puffer eluiert werden.

2.2.3.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, mittels derer die DNA ihrer Größe nach aufgetrennt werden kann.

Zunächst wurde ein 1 %-iges Agarosegel gegossen. Hierfür lösten wir Agarose-Pulver in TAE-Puffer durch Erwärmen in der Mikrowelle auf. Nach Abkühlen der Lösung konnte diese mit 10 µL Ethidiumbromid versetzt werden. Die Lösung wurde anschließend in eine Gelelektrophorese-Kammer gegossen und nach Setzen eines angemessenen Taschenkammes bei RT für 20 min aushärten lassen. Im Anschluss konnte der Kamm entfernt, das polymerisierte Gel in eine Elektrophoresekammer gelegt und diese mit TAE-Puffer gefüllt werden. Nach Versetzen der 25 µL-Proben mit 5 µL Ladepuffer wurden diese in die entsprechenden Geltaschen pipettiert. Außerdem wurden neben die DNA-Proben 10 µL eines Markers aufgetragen, um später die Molekulargröße der Nukleinsäuren besser abschätzen zu können. Danach wurde ein elektrisches Feld von 110 V für etwa 30 min angelegt. Im nächsten Versuchsschritt konnte das Gel entnommen und mittels eines UV-Transilluminators das Ergebnis detektiert werden.

2.2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion ist es möglich, selektiv DNA-Fragmente zu amplifizieren. Hierzu ist eine DNA-Polymerase notwendig, die die zu vervielfältigende cDNA als Matrize nutzt. Die Kettenreaktion setzt sich aus drei immer wieder ablaufenden Reaktionsschritten zusammen: Zunächst erfolgt die Denaturierung, bei der sich die DNA-Stränge voneinander lösen. Nach Absenken der Temperatur können die im „Mastermix“ enthaltenen „Oligonukleotidprimer“ an die einzelsträngige DNA lagern („Annealing“). Es folgt die Elongation, bei der die thermostabile Taq-Polymerase die „Primer“ verlängert, bis schließlich wieder doppelsträngige Nukleinsäuren vorliegen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Reaktionsansätze mit einem Gesamtvolumen von 50 µL eingesetzt. Die jeweilige Zusammensetzung der Ansätze unterschied sich zum einen in der Größe der „Template“-DNA und zum anderen in der Anzahl und Länge der notwendigen Zyklen. Die „Annealing“-Temperatur musste abhängig vom jeweiligen „Primerpaar“ optimiert werden.

Tabelle 11: Reaktionsansatz für die Polymerase-Kettenreaktion

ddH ₂ O	19,45 µL
10-fach PCR-Puffer	2,5 µL
dNTPs	1,25 µL
„Primer“ („Forward“-/ „Reverse“-)	jeweils 0,75 µL
Taq-Polymerase	0,3 µL

Tabelle 12: Verwendetes Polymerase-Kettenreaktions-Programm („Thermocycler“)

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	95	5	1
Denaturierung	95	0,5	30
„Annealing“	59	0,5	30
Elongation	72	0,5	30
finale Elongation	72	10	1
Kühlung	4	∞	1

2.2.3.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Nachdem die DNA-Fragmente ihrer Größe nach mithilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt worden sind, erfolgt ihre Aufreinigung mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kit.

Hierfür wurde die gewünschte DNA-Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein 2 mL „Tube“ überführt. Je nach Gewicht der Probe wurde anschließend das dreifache Volumen an QG-Puffer in das „Tube“ gegeben. Das „Reaktionstube“ wurde dann bei 55 °C für 10 min im „Thermocycler“ inkubiert. Bei diesem Reaktionsschritt löste sich das Gel vollständig auf, sodass die Lösung nach kurzem „Vortexen“ in 500 µL Schritten auf eine Säule pipettiert werden konnte. Nach kurzer Inkubation bei RT wurden die Proben für 1 min bei 11.000 rpm zentrifugiert. Schließlich wurden 500 µL QG-Puffer auf die jeweilige Säule gegeben und ebenfalls zentrifugiert. Der Durchfluss wurde stets nach jeder Zentrifugation verworfen und die Siliziumdioxid-Membranen der Säulen mit 600 µL Ethanol enthaltenden PE-Puffer gewaschen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei RT und 11.000 rpm für 3 min. Abschließend wurden die

Säulen in frische „Tubes“ gesetzt und wir eluierten die membrangebundene DNA mit 20 μ L EB-Puffer.

2.2.3.6 Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

Die Konzentration der zu bestimmenden Plasmid-Lösung wurde in $\text{ng}/\mu\text{L}$ mithilfe des Spektrophotometers, des NanoDrop 2000, gemessen. Dies erfolgte durch die Messung der optischen Dichte, mittels derer die Konzentration der Nukleinsäuren ermittelt werden konnte. Es galt zu beachten, dass die Absorption der verwendeten Nukleinsäuren bei unterschiedlichen Wellenlängen zu messen war (siehe hierzu die Herstellerangaben). Nachdem zunächst zweimal mit ddH_2O kalibriert worden war, konnte ein Probenvolumen von je 1 μL auf die Messfläche gegeben und die Konzentration bestimmt werden.

2.2.3.7 Klonierung

Sowohl für die Adenovirus-Herstellung zur Überexpression und zum „Knockdown“ von RND1 und MLF1 als auch für den „Yeast two-Hybrid Screen“ wurden Plasmide nach dem Gateway® Protokoll von Invitrogen kloniert. Hierdurch können gewünschte DNA-Segmente mithilfe bestimmter Rekombinationssequenzen zwischen kompatible Vektoren des Gateway® Systems transferiert werden. Dabei wird zuerst die PCR-amplifizierte DNA-Sequenz mittels BP-Reaktion in einen „Entry“-Vektor und im Anschluss daran durch LR-Reaktion in entsprechende „Destination“-Vektoren kloniert.

Zu Beginn mussten passende „Primer“ mit dem Primer Designing Tool von NCBI entworfen werden, um in einer PCR den ORF des jeweiligen Proteins aus einem cDNA-„Template“ zu amplifizieren und zusätzlich attB-„Sites“ anzuknüpfen. Sämtliche der hier benötigten und verwendeten „Primersequenzen“ sind im Abschnitt 2.1.6 wiederzufinden. Für die PCR wurde ein Reaktionsansatz aus 10 μL Phusion®-Puffer (5-fach), 1 μL dNTPs, je 2,5 μL des Gateway® „Forward“- und „Reverse-Primers“ in einer Konzentration von 10 nM, 0,5 μL der Phusion®-Ploymerase (2000 units/mL) und 5 ng der „Template“-DNA zusammenpipettiert und mit ddH_2O auf ein Gesamtvolumen von 50 μL aufgefüllt. Der Aufbau der PCR ist der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 13: Verwendetes Polymerase-Kettenreaktions-Programm („Thermocycler“)

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	98	0,5	1
Denaturierung	98	0,5	35
„Annealing“	55	0,5	35
Elongation	68	2	35
finale Elongation	68	10	1
Kühlung	4	∞	1

Die Richtigkeit der PCR wurde durch eine Gelelektrophorese mit 25 µL des PCR-Endprodukts durchgeführt. Bei Nachweis von Banden in der Größe des jeweiligen ORFs durch den Einsatz von UV-Licht konnte mit 10 µL des PCR-Ansatzes eine erneute PCR gestartet werden, in welcher die „Primer“ attB1 und attB2 eingesetzt wurden. Im Zuge dieser PCR wurden ebenfalls die noch fehlenden Sequenzen der attB-„Sites“ angeknüpft. Auch das Endprodukt aus dieser PCR wurde mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die passende Bande unter Zuhilfenahme eines Skalpellens aus dem Gel geschnitten. Anschließend konnte die DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit aus dem Gel extrahiert werden. Im darauffolgenden Reaktionsschritt wurde eine BP-Reaktion mit dem „Entry“-Vektor pDONR221 durchgeführt. Dabei wurde die attP-flankierte Sequenz innerhalb des „Entry“-Vektors mithilfe der katalytischen Aktivität einer BP-Clonase® durch den attB-flankierten ORF von RND1/MLF1 aus Ratte bzw. Mensch ersetzt. Hierfür wurden 300 ng der aus der Gelextraktion gewonnenen DNA und 300 ng des „Entry“-Vektors pDONR221 miteinander vermischt und mit „Elution“-Puffer auf ein Volumen von 8 µL aufgefüllt. Nun konnten 2 µL der BP-Clonase® hinzugefügt und der Reaktionsansatz bei RT für 1 h inkubiert werden. Nach Zugabe von 1 µL Proteinase K und einer Inkubation der Proben bei 37 °C für 10 min wurde die BP-Reaktion beendet. Das Produkt konnte schließlich durch Elektroporation in DH10B-*E. coli*-Bakterien transformiert werden. Dies erfolgte durch Hinzugabe von 3 µL des BP-Reaktionsproduktes in 50 µL eines frisch aufgetauten DH10B-Stocks. Nach kurzem und vorsichtigem Mischen wurde das Reaktionsgemisch in eine gekühlte Elektroporationsglasküvette überführt und zwischen die beiden Elektroden des Elektroporators platziert. Die gewünschte Transformation erfolgte durch die Applikation eines kurzen Stromimpulses von 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF. Die Bakteriensuspension wurde in 1 mL LB-Medium aufgenommen und in ein frisches „Reaktionstube“ übersetzt. Es folgte eine Inkubation der Proben bei 700 rpm und 37 °C für 1 h im ThermoMixer®. 50 µL der *E. coli*-Kultur wurden nun zur Selektion auf einem kanamycinhaltigen Agar ausgestrichen und ü. N. bei 37 °C im Inkubationsschrank hochgezogen. Nur solche Bakterienkolonien, die über den das Kanamycin-Resistenzgen umfassenden pDONR221-Vektor verfügten, waren befähigt, auf dem Agar zu wachsen. Am Folgetag wurden einzelne Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte aufgelesen und jeweils in 6 mL LB-Medium und 6 µL

Kanamycin aufgenommen. Die Ansätze konnten im Anschluss bei 37 °C für 24 h inkubiert und das jeweilige Plasmid anschließend mittels Mini-Präp isoliert werden. Nach Konzentrationsbestimmung durch den NanoDrop 2000 folgte die „Colony“-PCR. Hierzu wurden 2,5 µL Taq-Puffer (10-fach), 0,5 µL dNTP-Mix, jeweils 0,75 µL des „Forward“- und des „Reverse-Primers“ (jeweils 10 nM) und 0,125 µL der Taq-Polymerase (5 U/µL) zusammenpipettiert und mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 25 µL aufgefüllt. Für die Amplifikation des „Inserts“ im pDONR221-Vektor wurden die „Primer“ M13(-20)-F und M13-R eingesetzt. Die „Colony“-PCR setzte sich aus folgenden Reaktionsschritten zusammen:

Tabelle 14: Aufbau der „Colony“-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	95	3	1
Denaturierung	95	0,5	35
„Annealing“	45	0,5	35
Elongation	72	2	35
finale Elongation	72	10	1
Kühlung	4	∞	1

Anschließend wurde das PCR-Produkt in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und die sich darstellenden Banden auf ihre Positivität geprüft. War eine Bande auf entsprechend erwünschter Höhe sichtbar, so konnte mit M13-„Primern“ die Sequenz durch die Firma GATC ermittelt werden. Nach Abgleich mit der kodierenden mRNA-Sequenz von RND1 bzw. MLF1 aus *Rattus norvegicus* und *Homo sapiens* folgte die LR-Reaktion, bei der das „Insert“ aus dem „Entry“-Vektor in den „Destination“-Vektor transferiert wurde.

Für die Virusproduktion wurde der pAd/CMV/V5-„Destination“-Vektor verwendet. 200 ng des „Entry“-Vektors mit „Insert“ und 200 ng des „Destination“-Vektors wurden mit „Elution“-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 8 µL gebracht und mit 2 µL LR-Clonase® bei RT für 24 h inkubiert. Am Folgetag wurde durch Zugabe von 1 µL Proteinase K und einer Inkubation bei 37 °C für 10 min die LR-Reaktion beendet. Auch dieses Reaktionsprodukt wurde durch Elektroporation in DH10B-E. coli-Bakterien transformiert und anschließend auf einem Carbenicillin-haltigen Agar ausgestrichen. Beide Vektoren verfügten über ein Carbenicillin-Resistenzgen, sodass nur solche Bakterienkolonien, die erfolgreich transformiert wurden, auf dem Agar anwachsen konnten. Analog zum BP-Reaktionsprodukt wurden die Kolonien in einer „Colony“-PCR untersucht. Die PCR war wie folgt aufgebaut:

Tabelle 15: Verwendetes „Cycler“-Programm für die „Colony“-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	95	3	1
Denaturierung	95	0,5	35

„Annealing“	50	0,5	35
Elongation	72	2	35
finale Elongation	72	10	1
Kühlung	4	∞	1

Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und durch Anlegen einer Spannung aufgetrennt. Positive Klone wurden in 6 mL LB-Medium aufgenommen, mit 6 µL Carbenicillin versetzt und über 24 h im Inkubator bei 200 rpm geschüttelt. Die DNA wurde isoliert und sequenziert. Bei Korrektheit der Sequenzen konnten Kulturen von 50 mL angesetzt und auch hier die DNA extrahiert werden.

2.2.3.8 Transfektion

Die Transfektion ermöglicht es, Fremd-DNA in Bakterien einzubringen. Eine Möglichkeit stellt die Lipofektion dar, bei welcher man sich die Funktion der Lipide zunutze macht.

Für die Virusproduktion wurden die Plasmide mittels Lipofectamin in HEK293A-Zellen transfiziert. Dazu wurden 4×10^5 HEK-Zellen pro „Well“ auf einer 6 „Well“ Platte ausgesät. Bei einer Zellkonfluenz von etwa 80 % wurden die Zellen mit warmem PBS gewaschen und mit serum- und antibiotikafreiem Medium beschichtet (pro „Well“ 1,5 mL). Anschließend stellten wir den Transfektionsansatz her. Pro „Well“ wurden 2 µg Plasmid in 250 µL serum- und antibiotikafreiem Medium und parallel 6 µL Lipofectamin in ebenfalls 250 µL Medium aufgenommen. Beide Ansätze wurden schließlich zusammengegeben und vorsichtig miteinander vermischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurden auf jedes „Well“ 500 µL pipettiert. Nun wurden die Platten nach vorsichtigem Schwenken in den Inkubationsschrank gestellt und nach weiteren 24 h erfolgte ein Mediumwechsel.

2.2.3.9 Generierung von Adenoviren zur Überexpression von RND1

Um die Effekte von überexprimiertem RND1 analog zu bereits bestehendem MLF1-Adenovirus in NRVCs näher analysieren zu können, wurden rekombinante Adenoviren mit dem ViraPower™ Adenoviral Kit hergestellt.

Zu Beginn wurde eine Klonierung des ORF aus *Rattus norvegicus* nach dem Gateway® Protokoll durchgeführt (siehe 2.2.3.7). Die Plasmide konnten anschließend durch die Pac I-

Restriktionsendonuklease verdaut und in HEK293A-Zellen, wie unter 2.2.3.8 beschrieben, transfiziert werden. Bei einer Konfluenz von 80 %, etwa 48 h nach Transfektion, konnten die Zellen mit 200 µL Trypsin/EDTA pro „Well“ behandelt und in 75 cm² Flaschen umgesetzt werden. Die Flaschen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nun folgten alle 48 h ein Mediumwechsel und regelmäßige mikroskopische Kontrollen, bis schließlich eindeutige und ubiquitäre Veränderungen im Zellrasen festgestellt werden konnten. Hierzu zählen gekugelte Zelleiber und Aufrisse im Zellrasen. Diese Zytopathologien zeigten sich meist bis zu 12 d nach Transfektion. Die Zellen wurden im Folgenden vom Flaschenboden abgeklopft, die Zellsuspension in ein 50 mL Röhrchen überführt und bei 1.000 rpm und RT für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde zunächst die wässrige Phase in ein frisches Röhrchen umgesetzt und das „Zellpellet“ mit 1 mL Vollmedium resuspendiert. Danach folgten drei Zyklen von Einfrieren bei -80 °C und Auftauen bei 30 °C der Proben. Nach einer Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C für 15 min konnte der virenhaltige Überstand abgenommen und zur übrigen Zellsuspension gegeben werden. Im nächsten Versuchsschritt wurden pro Konstrukt HEK293A-Zellen in zwei 175 cm² Flaschen ausgesät und mit 5 mL des „Crudelysates“ beimpft. Auch hier folgte eine Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂, bis die Zellen ebenfalls bereits erwähnte zytopathologische Effekte und eine 80 %-ige Konfluenz zeigten. Sobald dieser Zeitpunkt erreicht war, konnten die restlichen, am Flaschenboden haftenden Zellen abgeklopft werden und das Lysat in ein 50 mL Röhrchen überführt werden. Es folgte eine Zentrifugation bei 1.000 rpm und RT für 10 min. Der Überstand wurde in einem frischen Röhrchen aufgenommen und das „Pellet“ in 1,5 mL PBS aufgelöst. Nun konnte das „Pellet“ die wie zuvor beschriebenen Einfrier- und Auftau-Zyklen durchlaufen. Anschließend erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 14.000 rpm und 4 °C für 15 min. Der Überstand wurde zu dem restlichen Lysat gegeben, die Suspension aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Das „Zellpellet“ wurde verworfen.

2.2.3.10 Generierung von microRNAs zum „Knockdown“ von RND1 und MLF1

Die Erzeugung von microRNAs dient dem „Knockdown“ ausgewählter Gene. Ziel ist es auch hier, rekombinante Adenoviren zu generieren, mittels derer diese microRNAs überexprimiert werden können.

Für die Klonierung von synthetischen microRNA-Konstrukten, wurde das Gateway®BlockIT System eingesetzt. Entsprechende Oligonukleotide sind auf eine Konzentration von 200 µM

verdünnt und anschließend durch eine „Annealing“-Reaktion in ihre doppelsträngige Form überführt worden.

Tabelle 16: Reaktionsansatz für die „Annealing“-Reaktion

Reagenz	Volumen [μL]
200 μM „Forward“-Oligonukleotide	5
200 μM „Reverse“-Oligonukleotide	5
10 x Oligo-„Annealing“-Puffer	2
ddH ₂ O	8

Der gesamte Reaktionsansatz zeigte somit bei einem Gesamtvolumen von 20 μL eine Konzentration von 50 μM . Nachdem der Ansatz für 4 min bei 95 °C geschüttelt und anschließend bei RT für 10 min abgekühlt worden war, wurde er zentrifugiert. Darauf folgend wurden die Proben auf eine Konzentration von 10 nM verdünnt und in den pcDNA6.2-GW/miR-Vektor kloniert.

Tabelle 17: Reaktionsansatz für die Klonierung in den pcDNA6.2-GW/miR-Vektor

Reagenz	Volumen [μL]
pcDNA6.2-GW/miR (5 ng/ μL)	2
dsOligonukleotide (10 nM)	4
T4 DNA Ligase (1 U/ μL)	1
Ligationspuffer (5-fach)	4
dd H ₂ O	9

Zunächst wurde der Ansatz geschüttelt und bei 25 °C für 30 min inkubiert. Die Ligase wurde anschließend durch Inkubation bei 65 °C im „Thermocycler“ für 10 min hitzeaktiviert. Das erzeugte Plasmid transformierten wir schließlich in E. coli OneShot® TOP10-Bakterien. Der pcDNA6.2-GW/miR-Vektor vermittelte eine Spectinomycin-Resistenz und ermöglichte es nur solchen Bakterien, die das Plasmid in sich trugen, auf einem spectinomycinhaltigen Nährboden zu überleben. Nach Amplifikation der Plasmide wurden einzelne Bakterienklone mit Pipettenspitzen aufgelesen und jeweils eine ü. N.-Kultur angesetzt. Wie bereits unter 2.2.3.7 geschildert, folgten BP- und LR-Reaktion.

2.2.3.11 Titerbestimmung von Adenoviren

Unmittelbar an die Adenovirusherstellung knüpft die Bestimmung der quantitativen Menge an infektiösen Viren pro μL , um später eine Dosis-Wirkungs-Beziehung aufstellen zu können.

Die adenovirale Titerbestimmung erfolgte mittels HEK293A-Zellen, die auf einer 12 „Well“ Platte ausgesät wurden (500.000 Zellen pro „Well“). Unmittelbar danach fügten wir je „Well“ 50 μL eines zuvor angesetzten und verdünnten Adenovirus hinzu. Die Verdünnungsreihe des jeweiligen Virus wurde mit Vollmedium hergestellt. Es wurden ausschließlich Verdünnungen von 10^{-2} bis 10^{-7} verwendet. Die infizierten Zellen kamen anschließend für 48 h in einem Inkubator unter (37 °C, 5 % CO_2). Im Folgenden wurde das Medium abgenommen und nach kurzem Trocknen der Zellen konnten diese mit 1 mL eiskaltem Methanol bei -20 °C für 10 min inkubiert werden. Der nächste Schritt sah die Abnahme des Methanols und dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS und 1 % bovinem Serumalbumin (BSA, engl.: bovine serum albumin) vor. Nun wurden pro „Well“ 200 μL des FITC-gekoppelten Anti-Hexon-Antikörpers eingesetzt und die 12 „Well“ Platte für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach Abnahme des Antikörpers und nochmaligem Waschprozedere mit PBS und 1 % BSA wurden die Zellen mit PBS beschichtet. Das Auszählen der angefärbten und damit virushaltigen Zellen erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop. Dabei wurden die grün leuchtenden HEK293A-Zellen aus zehn Gesichtsfeldern mit einem 10 x Objektiv gezählt und der Titer nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Titer (ifu / mL)} = \frac{\text{Infizierte Zellen / Gesichtsfeld} \times \text{Gesichtsfelder / „Well“}}{\text{Virusvolumen (mL)} \times \text{Verdünnungsfaktor}}$$

2.2.3.12 Erstellen einer Dosiskurve

Nach der Titerbestimmung der hergestellten RND1- und MLF1-Adenoviren wurde zur Sicherstellung der Funktion und zur Ermittlung der in Zukunft einzusetzenden Viruslast eine Dosiskurve erstellt.

Hierfür wurde sowohl Protein als auch RNA aus unbehandelten NRVCs isoliert und auf die Expression von RND1 bzw. MLF1 untersucht. Dazu wurden die ausgesäten Kardiomyozyten nach 24 h mit warmem PBS zweimal gewaschen und mit serumfreiem und Virus-versetztem Medium beschichtet. Dabei wurden je zwei „Wells“ mit 50 ifu/ μL LacZ-Adenovirus bzw. synthetische nonsense-microRNA exprimierendem Adenovirus sowie mit 5, 25 und 50 ifu/ μL RND1- bzw. MLF1-Virus infiziert. Um die Viruslast für alle Zellen gleich hoch zu halten, wurde mit dem Kontrollvirus jeweils auf 50 ifu/ μL aufgefüllt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen erneut gewaschen und mit neuem Medium beschichtet. Im Anschluss an eine weitere Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 konnten die NRVCs schließlich geerntet werden.

2.2.3.13 Transverse aortale Konstriktion

Die experimentelle TAC bedingt eine akute Drucksteigerung im Herzen und führt zunächst zu kompensatorischer kardialer Hypertrophie. Im Laufe der Zeit kann die Reaktion auf die chronische hämodynamische Überlastung maladaptiv werden und in einer Herzdilatation und –insuffizienz münden.

Um eine Druckbelastung des Herzens zu erzeugen, wurde die transverse aortale Konstriktion an acht Wochen alten Mäusen durchgeführt. Zunächst erfolgte zur Analgesie der Tiere die Gabe von Temgesic (0,1 mg/kg s.c.) und eine inhalative Narkose mit Isofluran (4 % in 0,8 L/min O₂) bei einer Erhaltungsdosis von 2 %. Anschließend wurden die Mäuse mit einer Braunüle intubiert. Die Beatmung erfolgte mechanisch mit einem Tidalvolumen von 0,15 mL und einer Frequenz von 150/min. Im Anschluss wurde eine laterale Thorakotomie im 2. ICR durchgeführt und ein Prolene 4-0 Faden um die Aorta transversalis zwischen dem Truncus brachiocephalicus und der linken A. carotis communis gelegt. Gegen eine an die Aorta angelegte Nadel (27 G) wurde der Faden geknotet und die Nadel entfernt. Mithilfe dieser Technik wurde eine leichte Stenose erzeugt. Abschließend konnte der Thorax wieder verschlossen und die im Pleuraspalt verbliebene Luft entfernt werden. Als Kontrolle dienten scheinoperierte Mäuse (SHAM-Mäuse). Diese Tiere wurden bis auf die aortale Konstriktion nach gleichem Protokoll behandelt. Vier Wochen nach der Operation erfolgten die Tötung der Mäuse und die Entnahme ihrer Herzen.

Die beschriebenen Operationen wurden in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe durchgeführt. Der zugrunde liegende Tierversuch wurde durch das Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigt und unter strikter Berücksichtigung der Ethikrichtlinien durchgeführt. In dieser Arbeit konnte die bereits isolierte RNA genutzt werden, um die Genexpression von Rnd1 in transgenen Myozap-Tieren bzw. Myozap-„Knockout“-Mäusen zu prüfen.

2.2.3.14 Stimulation der Zellen mit dynamischem „Stretch“

Mithilfe des dynamischen „Stretchens“ ist es möglich, den Einfluss von mechanischem Stress auf Kardiomyozyten näher zu untersuchen. Wir setzten hierzu den sogenannten Flexlink FX5000T-FLK-Stretcher ein.

24 h nach Präparation der neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden die Zellen zunächst vorsichtig mit warmem PBS zweimal gewaschen und anschließend mit serumfreiem Medium

beschichtet. Es folgte eine erneute Inkubation der Platten bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 h. Im Anschluss wurde das Medium erneut durch frisches ersetzt und der „Stretch“ konnte gestartet werden. Dazu wurden die Platten in den Flexlink FX5000T-FLK-Stretcher bei 37 °C und 5 % CO₂ auf Silikonmembranen gesetzt. Diese ermöglichten es, dass ein Vakuum erzeugt und die Zellen pulsatil gedehnt werden konnten. „Gestretcht“ wurde für 24 oder 48 h mit einer Elongation von 16 % bei einer Frequenz von 1 Hz. Die jeweiligen Kontrollplatten wurden ebenfalls im „Stretcher“ auf einer Plexiglasplatte untergebracht, sodass sie zwar unter gleichen Versuchsbedingungen inkubiert, aber keinen biomechanischen Belastungen ausgesetzt wurden.

2.2.3.15 Stimulation der Zellen mit Phenylephrin

Phenylephrin ist ein direktes Sympathomimetikum, welches seine Wirkung vorwiegend am α_1 -Adrenorezeptor entfaltet und auf diese Weise NRVCMS stimuliert.

Die NRVCMS wurden 24 h nach Aussaat für weitere 48 h mit 5 μ M PE in serumfreiem und antibiotikahaltigem Medium inkubiert. Die Effekte des Adrenorezeptor-Agonisten auf die Zellen wurden anschließend zum einen auf RNA- und Proteinebene und zum anderen mittels Immunzytologie analysiert.

2.2.3.16 RNA-Isolierung aus NRVCMS

Nach Ernte der NRVCMS ermöglicht die RNA-Isolierung, die darauffolgende DNase-Verdauung und die anschließende cDNA-Synthese die Analyse der Zelltätigkeit zum Zeitpunkt der Ernte beispielsweise mittels „Real-Time“ PCR.

Im Anschluss an das Ernten mit Trizol und einer Inkubation von 5 min bei RT wurden den lysierten Zellen 200 μ L Chlorophorm pro mL Trizol zugefügt. Nach „Vortexen“ der Proben führte eine 15 min andauernde Zentrifugation (11.200 rpm, 4 °C) zu drei deutlich sichtbar unterscheidbaren Phasen: Die untere Phenol-Chloroform-Phase, die proteinreiche Interphase und die obere farblose Phase, in welcher sich die gesamte RNA sammelte. Diese obere Phase wurde nun abgenommen und in frische „Tubes“ überführt.

Der nächste Schritt umfasste die Fällung der RNA mit 500 μ L Isopropanol je Probe. Anschließend wurden die Proben kurz „gevortext“, für 40 min bei -20 °C inkubiert und

schließlich 40 min zentrifugiert. Der Überstand konnte abgenommen werden, sodass ausschließlich das sichtbare „Pellet“ im jeweiligen „Tube“ verblieb, welches im weiteren Verlauf mit 1 mL 75 % Ethanol (in DEPC-H₂O) gewaschen, für 10 min getrocknet und in 30 µL H₂O aufgenommen wurde.

2.2.3.17 DNase-Verdauung

Dieser Versuchsschritt dient der Beseitigung eventuell noch vorliegender DNA-Reste.

Die Proben wurden jeweils mit 5 µL DNase I und 5 µL Reaktionspuffer (10-fach) versetzt und für 15 min bei RT inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Ansatz mit ddH₂O auf 100 µL aufgefüllt und nach Hinzugabe von 100 µL Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol bei 4 °C für 10 min zentrifugiert (14.000 rpm). Der abgenommene Überstand konnte schließlich mit 300 µL 100 % Ethanol und 10 µL einer Natriumacetatlösung (3 M) gemischt werden. Im Anschluss an einen weiteren Zentrifugationsschritt (14.000 rpm, 4 °C, 40 min) wurden die „Pellets“ mit 500 µL 75 % Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das „Pellet“ getrocknet und in einer adäquaten Menge ddH₂O (8-10 µL) aufgenommen. Nun standen die Proben zur photometrischen Konzentrationsbestimmung mithilfe des NanoDrop 2000 bereit.

2.2.3.18 cDNA-Synthese

Die isolierte und aufgereinigte mRNA kann nun in komplementäre DNA umgeschrieben werden. Dies erfolgt durch den Einsatz einer reversen Transkriptase.

Mittels des SuperScript III First-Strand Synthesis System von Invitrogen wurde jeweils 1 µg DNase-freier RNA in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Hierzu waren zwei Reaktionsschritte erforderlich. Im ersten Schritt wurde 1 µg RNA mit 250 ng Hexanukleotid Random-Primer-Mix und 0,5 µL dNTPs versetzt und der Ansatz mit ddH₂O zu einem Gesamtvolumen von 13,5 µL aufgefüllt. Im „Thermocycler“ folgte die Denaturierung bei 65 °C für 5 min. Im Anschluss wurden die Proben für mindestens 1 min auf Eis gesetzt und danach zentrifugiert. Der zweite Reaktionsschritt beinhaltete die Synthese der cDNA. Dazu wurde ein „Mastermix“ aus First Strand RT-Puffer (4 µL, 5-fach), 1 µL RNaseOUT (40 U/µL), 1 µL DTT (0,1 M) und 0,5 µL der Polymerase SuperScript™ III RT (200 units/µL)

dem ersten Ansatz beigefügt und vorsichtig vermischt. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben im „Thermocycler“ für 10 min bei 25 °C, 60 min bei 50 °C und 15 min bei 70 °C in der genannten Reihenfolge inkubiert und schließlich auf Eis gelagert. Anschließend konnte die cDNA mittels ddH₂O auf eine Konzentration von 2 ng/μL verdünnt werden und weiterführenden Analysen zur Verfügung stehen.

2.2.3.19 „Real-Time“ PCR

Die „Real-Time“ PCR dient der quantitativen Bestimmung von Genexpressionen. Während der Amplifikation der eingesetzten cDNA wird ein Fluoreszenzfarbstoff mit in die neu synthetisierte doppelsträngige DNA eingebaut, der durch seine Emissionen während des PCR-Zyklus in Echtzeit gemessen werden kann. Die Stärke der Fluoreszenzsignale verhält sich dabei proportional zur Menge des PCR-Produktes.

Einer der in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe ist SYBER GreenER qPCR Supermix. Insgesamt wurden je Probe 18 μL eines Reaktionsansatzes eingesetzt. Dieser setzte sich aus 10 μL SYBER GreenER qPCR Supermix, 0,4 μL „Forward“- und „Reverse-Primer“ und 7,6 μL ddH₂O zusammen. Zu diesen 18 μL „Mastermix“ wurden jeweils 2 μL cDNA (4 ng) gegeben. Des Weiteren wurde zur Erfassung der Expression von *Nppa*, *Nppb* und *Rcan1-4* eine „Multiplex-Real-Time“ PCR durchgeführt. Auch hierfür wurde zunächst ein „Mastermix“ (siehe Tabelle 18) hergestellt.

Tabelle 18: Zusammensetzung des „Mastermixes“ für die „Multiplex-Real-Time“ PCR

Reagenz	eingesetzte Menge [μL]
iQ™ Multiplex Powermix	10
<i>Rpl32</i> Mix Tex Red	0,5
<i>Nppa</i> Mix FAM	0,5
<i>Nppb</i> Mix HeX	0,5
<i>Rcan1-4</i> CY5.5 Mix	0,5
ddH ₂ O	6

2.2.3.20 Proteinextraktion aus Gewebe

Zur Extraktion von Protein aus ganzen Maus- bzw. Rattenherzen mussten diese mithilfe des 24 Homogenisator Precellys® zunächst geschreddert werden. Hierzu wurden die Herzen zusammen mit 1 mL Lysepuffer und Kunststoffperlen in 2 mL „Tubes“ überführt. Danach konnten die Herzen im Precellys® zweimal für je 20 sek bei hoher Geschwindigkeit zerkleinert werden. Anschließend wurde die Gewebssuspension bei 11.200 rpm und RT für 20 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues „Tube“ pipettiert. Nun konnte die Proteinkonzentration je nach verwendetem Lysepuffer mit dem Bradford- oder DC-„Assay“ gemessen werden.

2.2.3.21 Proteinextraktion aus ausgesäten Zellen

Zunächst wurde das den Zellrasen beschichtende Medium abgenommen und es folgte dreimaliges Waschen mit kaltem PBS. Anschließend wurde ein mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren versetzter Lysepuffer auf die Zellen gegeben. Mithilfe von Zellschabern konnten die Zellen von ihrem Untergrund abgekratzt und in frische „Tubes“ überführt werden. Nachdem wir die Zellen zuerst in Flüssigstickstoff (-80 °C) für 30 min einfrieren ließen, wurden sie darauffolgend bei 30 °C für 15 min im „Thermocycler“ wieder aufgetaut. Dieses Einfrieren und Auftauen wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Die Proben konnten dann bei 11.200 rpm und für 15 min zentrifugiert und die Überstände in frische „Tubes“ überführt werden. Die „Pellets“ wurden verworfen.

2.2.3.22 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Bradford-„Assay“ zur Konzentrationsbestimmung von Proteinproben durchgeführt. Die Grundlage bildet der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250, welcher in der Lage ist, mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe zu bilden. Erst die Komplexbildung mit Proteinen führt zu einer Farbveränderung und zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums. Man misst nun photometrisch die Zunahme der Absorption bei Komplexbildung gegen die ungebundene Form des Farbstoffes und erhält ein repräsentatives Maß für die Proteinkonzentration.

Das geerntete Protein wurde zunächst auf eine 96 „Well“ Platte aufgetragen. Dies erfolgte je Probe in Triplets. Da die letztendlich erfolgende Farbreaktion vom Protein abhängig war, musste dementsprechend eine Kalibrierung durchgeführt werden. Wir nutzten hierzu vorwiegend BSA, von welchem vorab eine Verdünnungsreihe hergestellt wurde. Des Weiteren wurde ddH₂O zum Nullabgleich auf die Platte pipettiert. Aufgefüllt wurden die Proben und BSA-Verdünnungen mit jeweils 200 µL einer 1:5 mit ddH₂O verdünnten Bradford-Reagenz. Die photometrische Messung erfolgte im Infinite M200 PRO Microplate Reader mittels der Magellan-Software.

Neben der Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Reagenz wurde auch das DC™ Protein Assay Kit genutzt. Es handelt sich hierbei ebenfalls um eine kolorimetrische Konzentrationsbestimmung. Auch bei diesem Verfahren musste eine Standardkurve generiert werden. Dies geschah durch das Ansetzen einer Verdünnungsreihe von einer Stammlösung (4 mg/mL BSA) mit dem jeweiligen Lysepuffer. Insgesamt wurden sechs unterschiedliche Verdünnungen hergestellt. Auch bei dem DC-„Assay“ wurden die Proben und die Verdünnungslösungen in Triplets auf eine 96 „Well“ Platte aufgetragen. Analog zum Hersteller-Protokoll wurden die Proben in die „Wells“ pipettiert und die Lösungen A´ und B hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT konnten die Proteinkonzentrationen photometrisch im Infinite M200 PRO Microplate Reader analog zum Bradford-„Assay“ gemessen werden.

2.2.3.23 Klonieren von SRF-RE Reporter-Luciferasen

Unter Reporter genen versteht man kodierende Sequenzen, die als Indikatoren für die Expression anderer Gene dienen. Ihre Anwesenheit lässt sich nach Einbringen in die Zelle leicht nachweisen. In dieser Arbeit wurden sogenannte Luciferasen eingesetzt. Es handelt sich hierbei um Oxygenasen, die bei katalytischer Aktivität zu Biolumineszenz führen.

Um die SRF-RE Reporter „Firefly“- und Renilla-Luciferasen zu klonieren, wurden Plasmidvorlagen von Promega genutzt (pGL4.34[*luc2P*/SRF-RE/Hygro] und pGL4.74[*hRluc*/TK]). Im Anschluss an die Klonierung in den pDONR221-Vektor folgte analog dem Gateway® Protokoll die Generierung von Adenoviren wie unter 2.2.3.9. beschrieben.

2.2.3.24 Reportergen-„Assay“

Durch Einführen der Luciferase-Gene hinter die Promotorregion eines kodierenden DNA-Abschnittes lässt sich über die Stärke der entstehenden Biolumineszenz auf die Genaktivität rückschließen.

Zu Beginn wurden Kardiomyozyten auf 12 „Well“ Platten ausgesät (350.000 Zellen pro „Well“) und 24 h später wurden die Zellen transfiziert. Nach einer weiteren Inkubation für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die NRVCs mit warmem PBS gewaschen und mit serumfreiem und antibiotikahaltigem Medium beschichtet. 96 h nach Aussaat der Zellen haben wir diese erneut mit warmem PBS gewaschen und anschließend mit 150 µL passivem Lyse-Puffer (PLB, engl.: passive lysis buffer) pro „Well“ benetzt. Es folgte eine Inkubation bei -80 °C für 15 min. Nun konnten die Platten auf einem Schüttler platziert und bei maximaler Geschwindigkeit (9,5) für 20 min bei RT geschüttelt werden. Im nächsten Versuchsschritt wurden pro „Well“ 20 µL auf eine 96 „Well“ Platte pipettiert. Diese mit Proben bestückte Platte wurde anschließend in den Infinite M200 PRO Microplate Reader gesetzt und die Messung mithilfe des Programmes Magellan gestartet.

2.2.3.25 Co-Immunopräzipitation

Die Co-Immunopräzipitation (Co-IP) ist ein Verfahren zur Identifizierung potenzieller physiologischer Protein-Protein-Interaktionen. Dies erfolgt durch den Einsatz spezifischer Antikörper, welche bestimmte Proteine samt ihrer Interaktionspartner binden und anschließend im „Western Blot“ nachgewiesen werden können.

Für die Co-IP wurden Maus- bzw. Rattenherzen in nativem Lyse-Puffer (NLB, engl.: native lysis buffer), wie in 2.2.3.20 beschrieben, homogenisiert. Anschließend konnte die Proteinkonzentration mittels des DC™-„Assays“ gemessen und 1 mg Protein in einem Gesamtvolumen von 1 mL in ein frisches „Tube“ überführt werden. Nun wurden vier Ansätze vorbereitet. Für jeden Ansatz füllten wir 1 mg Protein auf 1 mL NLB auf und gaben entsprechende Antikörper-Volumina hinzu (siehe Tabelle 19). Zusätzlich zu diesen Ansätzen wurde 1 mg Protein ohne weitere Zugabe von NLB in ein neues „Tube“ überführt und bei -20 °C zunächst weggefroren. Die vier Reaktionsansätze wurden dagegen ü. N. bei 4 °C auf einem rotierenden Rad bei einer Geschwindigkeit von 12 gedreht. Am Folgetag konnten jedem Protein-Antikörper-Gemisch 50 µL „Dynabeads“ hinzugefügt und die „Tubes“ erneut

für 12 h auf dem rotierenden Rad bei 4 °C gedreht werden. Vor der Hinzugabe der „Beads“ wurden diese durch das Zufügen von 1 mL NLB äquilibriert. Die Lösung wurde für 5 min bei 4 °C auf dem Rad gedreht und darauffolgend auf einem magnetischen „Rack“ platziert. Der Puffer konnte abgenommen und frischer hinzugefügt werden. Dieses Prozedere wurde dreimal wiederholt. Danach konnten die „Dynabeads“ eingesetzt werden. Nach kurzem Zentrifugieren der Reaktionsgefäße wurden diese erneut auf dem magnetischen „Rack“ platziert, der Überstand verworfen und frischer NLB hinzugegeben. Nun konnten die Proben für 5 min an dem rotierenden Rad befestigt werden. Analog hierzu folgten fünf weitere Waschschriffe, bevor die ausgefällten Proteine mit 50 µL Laemmli-Puffer (2-fach) bei 95 °C im „Thermocycler“ inkubiert wurden. Wir setzten die Proben in eine Tischzentrifuge und anschließend in das magnetische „Rack“, um die eluierten Proben in frische „Tubes“ zu überführen. Pro Ansatz konnten 10 µL beim anknüpfenden „Western Blot“ eingesetzt werden.

Tabelle 19: Eingesetzte Antikörper-Menge für die Co-Immunopräzipitation

Antikörper	Eingesetzte Menge [µL]
Anti-Myzap	40
Anti-RND1	7
Anti-His	3
Anti-HA	7

2.2.3.26 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Mittels der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese lassen sich Proteine ihrem Molekulargewicht nach auftrennen. Zunächst führt die Bindung des SDS zur Maskierung der Protein-Eigenladungen und die anschließende Denaturierung führt zum Aufbrechen der Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteinproben. Die Auftragung auf das Gel und das Anlegen einer elektrischen Spannung ermöglichen schließlich die Auftrennung der Proteinproben nach ihrer Größe.

Abhängig von der erwarteten Molekulargröße des eingesetzten Proteins wurde ein entsprechendes Gel gegossen. Die in dieser Arbeit verwendeten SDS-Gele wurden nach Tabelle 20 angesetzt. Das Gießen der Gele erfolgte zwischen zwei zusammengelegte, 1,5 mm dicke Glasplatten, die in entsprechender Halterung befestigt und nach unten mittels eines Schaumstoffgummis abgedichtet wurden. Nachdem zunächst das Trenngel hergestellt und der Spalt zwischen den Glasplatten zu etwa $\frac{3}{4}$ damit befüllt worden waren, ermöglichte ein Isopropanol-Film einen nahezu glatten und sauberen Übergang zu dem später folgenden

Sammelgel. Nach 20-minütigem Auspolymerisieren bei RT wurde das Isopropanol ausgegossen und die Sammelgel-Lösung eingefüllt. Unmittelbar danach konnte ein geeigneter Gelkamm als Abschluss nach oben zwischen die Glasplatten in die noch flüssige Sammelgel-Lösung geschoben werden. Es folgte eine weitere Aushärtung für ungefähr 30 min bei RT. Anschließend konnte das Gel in eine Gelkammer eingespannt, der Kamm gezogen und die entstandenen Taschen mit ddH₂O gespült werden. Die Gelkammer wurde nun mit Laufpuffer gefüllt. Noch bevor die Proben auf das Gel aufgetragen werden konnten, musste die einzusetzende Menge Protein (30-40 µg) festgelegt und für jede einzelne Probe die entsprechende Volumenmenge berechnet werden. Anschließend wurden diese Volumina mit auf 95 °C vorgewärmten Laemmli-Puffer versetzt und ebenfalls für 5 min bei 95 °C im „Thermocycler“ inkubiert. Nach kurzem Zentrifugieren konnte das Gel beladen werden. Als Marker diente der PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, der mit 5 µL eingesetzt wurde. Dieser ermöglichte es, später das ungefähre Molekulargewicht der Proteine abschätzen zu können. Im Folgenden konnte nun eine Spannung von 100 V angelegt und die Proben für 2-3 h aufgetrennt werden.

Tabelle 20: Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen

Trenngel 10%	H ₂ O	3,9 mL
	30 % Acrylamid	3,3 mL
	Trenngel-Puffer	2,6 mL
	TEMED	30 µL
	APS-Puffer	60 µL
Sammelgel	H ₂ O	2,9 mL
	30 % Acrylamid	0,8 mL
	Sammelgel-Puffer	1,4 mL
	TEMED	15 µL
	APS-Puffer	30 µL

2.2.3.27 „Western Blot“

Das Verfahren des „Western Blots“ eignet sich zur Übertragung von zuvor mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteinen auf eine Trägermembran.

Zunächst wurde eine PVDF-Membran in der Größe des Gels zugeschnitten und ungefähr 1 min in 100 % Methanol inkubiert. Derweil wurde Transferpuffer in eine Wanne gefüllt und anschließend die ebenfalls zugeschnittenen acht Lagen Whatman-Filterpapier und zwei

Schaumstoff-„Pads“ mit Transferpuffer gut durchtränkt, bevor mit dem Zusammenbau der „Blotting“-Kammer begonnen werden konnte. Auf die farblose Seite des „Blotting“-Rahmens wurden nacheinander ein Schaumstoff-„Pad“, vier Lagen Whatman-Filterpapier, die PVDF-Membran, das Gel, weitere vier Lagen Whatman-Filterpapier und ein zweites Schaumstoff-„Pad“ übereinander gelegt, der „Blotting“-Rahmen zugeklappt und in die „Blotting“-Kammer geschoben. Diese Kammer wurde nun zusammen mit einem Kühlakku in die bereits gefüllte Wanne überführt. Geblottet wurde bei 300 mA für 1,5 h.

2.2.3.28 Immunhistochemischer Proteinnachweis

Nun sind die Proteine zwar auf die Membran übertragen worden, können aber nicht mit bloßem Auge erkannt werden. Der Nachweis ist erst mithilfe der Immundetektion über spezifische Antikörper möglich.

Im Anschluss an den eigentlichen „Blotting“-Vorgang folgte das sogenannte Blockieren mithilfe einer „Blocking“-Lösung aus TBST und Milch (5 %) für etwa 2 h auf einem rhythmisch schwankenden Plattformschüttler. Auf diese Weise konnten alle freien Bindungsstellen der Membran gesättigt werden, um die Bindung eines spezifischen Antikörpers an das zu detektierende Protein zu ermöglichen. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 7 (2.1.7) wiederzufinden. Als Ladekontrollen setzten wir Antikörper gegen Tubulin oder GAPDH ein, die ein unterschiedliches Molekulargewicht gegenüber dem interessierenden Protein aufwiesen. Damit wurde sichergestellt, dass zwischen den Banden unterschieden werden konnte. Es handelt sich um konstitutiv exprimierte Gene, auch bekannt als „Housekeeping“-Gene, die Proteine kodieren, welche für die Aufrechterhaltung verschiedener Zellfunktionen unerlässlich sind. Durch den Einsatz dieser endogenen Kontrollen konnten relative Quantifizierungen von Zielproteinen durchgeführt werden.

Die Primärantikörper wurden nach Herstellerangaben verdünnt und ü. N. bei 4 °C in einem 50 mL Röhrchen auf einem „Tube“-Roller inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran mit TBST gewaschen (dreimal je 10 min) und anschließend mit einem geeigneten Sekundärantikörper für 2 h bei RT inkubiert. Es folgte erneut das bereits beschriebene Waschprozedere mit TBST (dreimal je 10 min). Nun wurde ECL (engl. enhanced chemilumescence) auf die Membran gegeben und die Membran vor Licht geschützt. Nachdem die ECL-Lösung nach 5 min wiederum abgenommen wurde, konnte diese in dem Gel-Detektionssystem FluorChem Q ausgerichtet werden und die erzeugte Chemilumineszenz nachgewiesen werden. Die Aufnahmen wurden gespeichert und mittels

der Densitometrie ausgewertet. Die Membran konnte bei RT getrocknet und lichtgeschützt gelagert werden.

2.2.3.29 Subzelluläre Fraktionierung

Die subzelluläre Kompartimentierung ermöglicht es, neben der Immunzytologie auch die Lokalisation gezielter Proteine im „Western Blot“ zu überprüfen. Parallel dazu kann auf diese Weise ihr Vorkommen objektiv quantifiziert werden.

Für die subzelluläre Fraktionierung wurden drei 10 cm Schalen mit je 10×10^6 NRVCMS eingesetzt. Zunächst wurden die Kardiomyozyten zweimal mit eisgekühltem PBS gewaschen und anschließend mit 500 μ L PBS beschichtet. Mittels geeigneter Zellschaber wurden die Zellen von ihrem Untergrund abgekratzt und die Zellsuspension in 1,5 mL „Tubes“ überführt. Nach kurzer Zentrifugation (10 sek) mit einer einfachen Tischzentrifuge wurden die Überstände verworfen. Das „Zellpellet“ konnte durch fünfmaliges Auf- und Abpipettieren mit eisgekühltem 0,1 % NP40-PBS gelöst werden. 500 μ L des gesamten Lysats (engl.: whole cell lysat) wurden in ein frisches „Tube“ überführt und auf Eis gestellt. Die übrige Suspension wurde für weitere 12 sek zentrifugiert und der sich abzeichnende Überstand konnte in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und ebenfalls auf Eis gelagert werden. Hierbei handelte es sich nun um die zytoplasmatische Fraktion. Das „Zellpellet“ wurde im Folgenden mit 0,1 % NP40-PBS resuspendiert (1 mL pro 10 cm Schale). Nach erneutem 15-sekündigem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen. Das „Pellet“ konnte 1:1 mit Laemmli-Puffer (1-fach) gelöst und unmittelbar der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zugeführt werden. Das gesamte Lysat und die zytoplasmatische Fraktion mussten dagegen zuvor 4:1 mit 4-fachem Laemmli-Puffer gemischt werden.

2.2.3.30 Immunfluoreszenz-Versuche

Die Immunfluoreszenz ermöglicht es, bestimmte Zellstrukturen sichtbar zu machen. Dies erfolgt über an spezifische Antikörper befestigte Fluoreszenzfarbstoffe, die anschließend einzelne Zellbestandteile selektiv und mit starkem Kontrast zu anderen Strukturen darstellen können.

Für die Immunfluoreszenz wurden NRVCMS auf kollagenbeschichtete Glas-„Coverslips“ (12 „Well“ Platte) ausgesät und mit serum- und antibiotikahaltigem Medium beschichtet. Je

nach Experiment wurden die Zellen am Folgetag transfiziert oder stimuliert und auf serumfreies Medium umgesetzt. Weitere 24 h später erfolgte ein erneuter Mediumwechsel. 72 h nach Aussaat der Zellen wurden diese mit kaltem PBS dreimal gewaschen, bevor sie mit 1 mL 4 % Paraformaldehyd für 10 min bei RT fixiert wurden. Nach wiederholtem Waschprozedere wurde mit 2,5 % BSA und 0,1 % Triton X-100 in PBS für 1 h bei RT geblockt. Im Anschluss daran haben wir die „Coverslips“ erneut mit PBS gewaschen und schließlich mit ausgewählten Primärantikörpern für 90 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Bevor und nachdem die Sekundärantikörper für 1 h auf die „Coverslips“ gegeben wurden, mussten diese für dreimal 10 min mit PBS gewaschen werden. Zusammen mit den an Alexa Fluor®-Farbstoffe gekoppelten Sekundärantikörpern wurde 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) zur Färbung der Zellkerne auf die „Coverslips“ gegeben. Abschließend fixierten wir die „Coverslips“ jeweils durch einen Tropfen (14 µL) „Mounting Medium“ auf geeigneten Objektträgern. Die zellbeschichtete Seite war dabei dem Objektträger zugewandt. Wir behandelten die Silikonmembranen mit den daran haftenden „gestretchten“ bzw. nicht „gestetchten“ Zellen analog zu den „Coverslips“ und schnitten an dieser Stelle unter Zuhilfenahme eines Skalpells ca. 2 cm² große Areale aus der Membran.

Die Fluoreszenzbilder wurden durch den Einsatz eines Keyence BZ-9000E HS All-in-one Fluoreszenzmikroskopes mit einem 20 x CFI Plan Apo λ-Objektiv mit einer NA von 0,75 bei RT aufgenommen. Die Aufnahmen wurden abschließend mit BZ-II Viewer (Version 2.1, Keyence) aufbereitet und analysiert.

2.2.3.31 Bestimmung der Zellgröße

Zur Zellgrößenbestimmung werden mithilfe des Keyence BZ-9000E HS All-in-one Fluoreszenzmikroskopes 5 x 5 Bilder mit einer Überlappung von 20 % bei einer 20 x Vergrößerung aufgenommen. Um eine relativ hohe Schärfentiefe zu erzeugen, erfolgte für jedes Bild eine Serienaufnahme. Bei dieser Bildfolge wurde stets die Fokussierung verändert, sodass sich der Unterschied zwischen den Aufnahmen in der Schärfe widerspiegelte. Mittels der BZ-II Viewer Software (Version 2.1, Keyence) konnten die Bilder fusioniert werden und man erhielt ein einzelnes zweidimensionales Bild. Die Zellgrößen der dargestellten Zellen konnten nun mit der Keyence BZ-II Viewer Software (Version 2.1) ausgerechnet werden. Hierfür nutze man den sogenannten Single Extraction Mode des Programmes, bei dem zunächst Referenzen bezüglich Fluoreszenzintensitäten festgelegt wurden. Die Zelleiber wurden mit α-Actinin, die Kerne mit DAPI gefärbt. Die Zellgröße wurde ausschließlich von solchen Zellen bestimmt, die nur einen Kern und keinen Kontakt zu anderen Zelleibern aufgewiesen haben.

2.2.3.32 Bestimmung der Zellproliferation

Um die Proliferation von Zellen beurteilen zu können, bedarf es ausgewählter Antikörper, die geeignete Mitosemarker binden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden zum einen Ki67- und zum anderen Phosphohiston H3-positive Zellen angefärbt. Pro „Coverslip“ wurden dabei die angefärbten und damit proliferationsaktiven NRVCMs aus insgesamt zehn Bildern (20 x Vergrößerung) gezählt. Auch hier konnten die Bilder mit dem Keyence BZ-9000E HS All-in-one Fluoreszenzmikroskop aufgenommen werden.

2.2.3.33 „Yeast two-Hybrid Screen“

Der „Yeast two-Hybrid Screen“ basiert auf der Restitution eines funktionellen Transkriptionsfaktors. Dies erfolgt in genetisch modifizierten Hefestämmen. Interagiert ein Protein, welches mit einer DNA-bindenden Domäne fusioniert ist und ein weiteres, welches mit der Aktivierungsdomäne verknüpft ist, so resultiert ein funktioneller Transkriptionsfaktor. Dieser führt schließlich zur Transkription eines Reportergens und es zeigt sich ein spezifischer Phänotyp.

Um mögliche Bindungspartner von RND1 zu identifizieren, wurde in Kooperation mit Hybrigenics aus Frankreich ein „Yeast two-Hybrid Sreen“ geplant und durchgeführt. Für diesen „Screen“ war es zunächst notwendig, den ORF von humanem RND1 aus einer humanen cDNA-Probe in den pDONR221-Vektor zu klonieren. Das „full-length“ klonierte RND1 konnte schließlich als Köderprotein in einer Hefekultur an die DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors LexA gebunden werden. Potenzielle Interaktionspartner von RND1 wurden aus einer Datenbank aus ventrikulären und fötalen Herzen ausgewählt. Im Folgenden wurden diese Proteine jeweils mit der Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors fusioniert. Bei einer direkten Interaktion von RND1 und Aktivierungsdomäne-gekoppeltem Beuteprotein und damit gewisser räumlicher Nähe von DNA-Bindungs- und Aktivierungsdomäne wurde der Transkriptionsfaktor LexA aktiviert. Dieser konnte nun an den Promotor des HIS3-Gens binden und dessen Transkription initiieren. Somit war es der Hefezelle möglich, auf einem histidinfreien Selektionsmedium zu wachsen. Diese direkte Interaktion konnte anschließend in der entsprechenden Kolonie bewiesen werden. In einem finalen Schritt wurde das Plasmid der positiv getesteten Kolonie

sequenziert, die Konfidenz einer nachgewiesenen Interaktion von Köder- und Beuteprotein durch den sogenannten prognostizierten biologischen „Score“ (PBS*, engl.: predicted biological score) klassifiziert und für jeden positiven Klon angegeben.

2.2.3.34 MTT-Test

Der MTT-Test dient der Messung der Zellviabilität. Dies erfolgt durch die Reduktion von MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid), einem Tetrazoliumsalz, welches in reduziertem Zustand als lilafarbene Formazankristalle vorliegt. Für diese Reduktion sind zelluläre Dehydrogenasen verantwortlich, die nur in lebenden Zellen Aktivität zeigen. Somit kann die MTT-Umwandlung als Maß für die Zellaktivität angesehen werden.

24 h nach Aussaat der NRVCs auf 24 „Well“ Platten wurden diese mit entsprechenden Adenoviren infiziert und für 72 h inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Mit DMEM-Medium verdünnte MTT-Reagenz (10 %) wurde in jedes „Well“ gegeben (je 10 µL) und die Platte für vier weitere Stunden inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Nach diesem Inkubationsschritt wurde die MTT-Reduktion durch Hinzugabe der MTT-Solubilisierungslösung beendet und die 24 „Well“ Platte ü. N. unter bekannten Konditionen inkubiert. Nach vollständiger Solubilisierung konnte im Infinite M200 PRO Microplate Reader die spektrophotometrische Absorption gemessen werden. Der prozentuale Anteil lebensfähiger Zellen wurde in Relation zur Kontrolle gesetzt. Zur Apoptoseinduktion wurde bei einem Teil der Zellen das Zytostatikum Cisplatin (25 µM) eingesetzt und zusammen mit dem Medium auf die „Wells“ gegeben.

2.2.3.35 Propidiumiodid-„Assay“

Das Propidiumiodid (PI) ist eine rot fluoreszierende nukleäre Färbung. Da die Membran lebender Zellen nicht durchdrungen werden kann, wird PI zur Detektion von avitalen Zellen verwendet, denn bei bereits abgestorbenen Zellen kann PI ins Zellinnere eindringen und doppelsträngige DNA durch Interkalation der Basenpaare binden.

Für die Propidiumiodid-Färbung wurden die Kardiomyozyten mit warmem PBS gewaschen und mit 1:2.000 verdünntem PI (1 mg/mL) bei 37 °C für 10 min inkubiert. Anschließend konnten die Zellen, wie unter 2.2.3.28 beschrieben, gewaschen, geblockt und mit DAPI angefärbt werden.

2.2.3.36 Klonierung, Aufreinigung und Expression von rekombinanter C3-Transferase

C3-Proteine, auch als C3-Transferasen oder C3-Exoenzyme bekannt, sind ADP-Ribosyltransferasen aus unterschiedlichen Bakterienstämmen. Sie ADP-ribosylieren gezielt kleine GTP-bindende Proteine und inhibieren nachgeschaltete Signalwege.

Das dem *Clostridium botulinum* abgeleitete Exoenzym, die C3-Transferase, und dessen mutierte Form C3-E174Q (Glutamat an Position 174 zu Glutamin mutiert) wurden in das pGEX-2T-Plasmid kloniert und als rekombinante GST-Fusionsproteine, wie in Höltje *et al.* 2005 beschrieben, in *E. coli* TG1 exprimiert (Höltje *et al.* 2005).

Es wurde eine Bakterienkultur bei 37 °C in 1 L LB-Medium (inkl. 100 µg/mL Ampicillin) zu einer optischen Dichte von 0,7 bei 595 nm gezüchtet. Die Kultur wurde folgend mit Isopropyl β-D 1-Thiogalactopyranosid (IPTG) auf eine Endkonzentration von 0,2 mM gebracht und für weitere 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension konnte anschließend bei 7.000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert und das „Zellpellet“ mit 20 mL Lyse-Puffer (50 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ und 2 mM DTT inkl. Protease-Inhibitoren) aufgelöst werden. Die Bakteriensuspension wurde durch ein Pressure Cell Press System lysiert und das gewonnene Lysat konnte bei 11.000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert werden. Der Überstand wurde für 4 h bei 4 °C in 4 mL Lyse-Puffer mit einem 50 %-igen Gemisch von Glutathione Sepharose® 4B-Beads inkubiert. Nach der Inkubation wurde diese Suspension auf eine Chromatographiesäule gegeben und fünfmal mit Lysepuffer gewaschen. Die „Beads“ wurden schließlich für 12 h bei 4 °C mit fünf NIH-Einheiten Thrombin inkubiert, um die GST-Taq-Bindung zu spalten. Das gespaltene Protein konnte nun mit 12 mL Lyse-Puffer eluiert und Thrombin durch Präzipitation mit Benzamidin-Sepharose-Beads und Zentrifugation (4.400 rpm, RT, 10 min) entfernt werden. Daraufhin wurde der Überstand abgenommen und gegen 20 mM HEPES enthaltenden Puffer (pH 7,5) ausgetauscht. Nach abschließendem Filtern mithilfe von PD-10 Säulen und dem Einsatz geeigneter Filter (Porengröße: 0,22 µm) konnte das Lysat für anknüpfende Experimente genutzt werden. Die ADP-Ribosyltransferase-Aktivität wurde *in vitro* durch einen ADP-„Ribosylierungsassay“ gemessen (2.2.3.37).

2.2.3.37 ADP-Ribosylierung

Unter der ADP-Ribosylierung versteht man die Übertragung eines oder mehrerer ADP-Ribosereste von Nicotinamidadenindinukleotid auf unterschiedliche Akzeptoraminosäuren. Intrazelluläre GTPasen wie RhoA können durch ADP-Ribosylierung, welche durch bakterielle C3-Proteine katalysiert wird, inaktiviert werden.

2 μ M GST-gekoppeltes RhoA wurde bei 37 °C für 20 min mit verschiedenen Konzentrationen der Wildtyp- bzw. mutierten C3-Transferase in Anwesenheit von 1 μ L $\text{Ci}^{[32\text{P}]}\text{NAD}^+$ in 20 μ L eines Puffers (50 mM HEPES, pH 7,3, 10 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 10 mM Thymidin und 10 mM NAD^+ , 4-fach) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Laemmli-Ladepuffer und eine 10-minütige Inkubation bei 95 °C abgeschlossen. Anschließend wurden die Proben durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und das Acrylamidgel mittels PhosphorImager SI ausgelesen.

2.2.3.38 Stimulation der Zellen mit Hypoxie

Der Verlust von Kardiomyozyten durch programmierten Zelltod, ausgelöst durch Hypoxie, trägt maßgeblich zur Entwicklung von Herzversagen bei. Durch das experimentelle Nachahmen hypoxischer Zustände wurde versucht, beteiligte Vorgänge näher zu verstehen und Einfluss auf den induzierten Zelluntergang zu nehmen.

Bevor die NRVCMS bei 37 °C für 3 h in einem Inkubator mit einer Luftzusammensetzung von 5 % CO_2 , 1 % Raumluft und 94 % N_2 untergebracht werden konnten, wurden sie mit 137 mmol/L NaCl, 12 mmol/L KCl, 0,5 mmol/L MgCl_2 , 0,9 mmol/L CaCl_2 , 4 mmol/L HEPES, 10 mmol/L 2-Deoxyglucose und 20 mmol/L Natrium-Lactat (pH 6,2) enthaltendem Puffer beschichtet. Die Kontrollzellen wurden stattdessen bei 37 °C in einem üblichen Zellkulturinkubator bei 5 % CO_2 und 95 % Raumluft inkubiert. Auch sie wurden pro „Well“ mit 1 mL Puffer (137 mmol/L NaCl, 3,8 mmol/L KCl, 0,5 mmol/L MgCl_2 , 0,9 mmol/L CaCl_2 , 4 mmol/L HEPES, 10 mmol/L Glucose und 20 mmol/L Pyruvat (pH 7,4)) kultiviert. Anschließend konnten die Zellen für nachfolgende Versuche geerntet werden.

2.2.4 Statistische Auswertung

Sämtliche in dieser Arbeit gewonnenen Daten wurden mit der „Software“ SigmaPlot (Version 11) auf ihre Signifikanz überprüft. Dabei wurden die einzelnen Signifikanzniveaus über einen students t-Test, two-way-ANOVA-Test oder nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Test ausgerechnet.

Dargestellt wurden die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte. Eine Ausnahme bilden hier die Boxplot-Darstellungen, in denen der Median angezeigt wird.

P-Werte von $<0,05$ werden als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse basieren auf der Untersuchung von zwei „Stretch“-abhängig regulierten Genen *Rnd1* und *Mif1*. Diese wurden in einer „Microarray“-Untersuchung von RNA aus „gestreckten“ NRVCMs identifiziert und bereits durch erste Versuche zur Analyse ihres Einflusses auf die kardiale Hypertrophie beschrieben (Pott 2017, Rangrez *et al.* 2017).

3.1 RND1

Es ist bereits bekannt, dass RND1 in dynamisch „gestreckten“ Kardiomyozyten sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene hochreguliert wird (Pott 2017, Rangrez *et al.* 2017). Des Weiteren ist in dem dieser Arbeit vorausgehenden Projekt die vermehrte RND1-Expression sowohl nach pharmakologischer Stimulation von NRVCMs durch Phenylephrin als auch in einem *in vivo* Mausmodell nach transverser aortaler Konstriktion nachgewiesen worden (Pott 2017, Rangrez *et al.* 2017).

Diese Untersuchungen zu den Eigenschaften von RND1 bilden den Ausgangspunkt dieser Arbeit mit der Zielsetzung um weitere, bisher unbekannte Funktionen und Einflüsse auf die kardiale Physiologie bzw. Pathophysiologie.

3.1.1 RND1 ist in Kardiomyozyten exprimiert und zeigt eine ausgeprägte Lokalisation in den Zellkernen

Zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von RND1 wurden immunzytologische Analysen an NRVCMs durchgeführt.

α -Actinin, welches nur an der Z-Scheibe lokalisiert ist, bildete ein striäres Muster innerhalb des Zytoplasmas der Kardiomyozyten aus (Abb. 8A). RND1 hingegen war prädominant in den Zellkernen lokalisiert und wies außerdem eine perinukleäre Färbung in der Region des endoplasmatischen Retikulums auf. Analog hierzu zeigte der „Western Blot“ der subzellulären Auftrennung der NRVCMs in Kern- und Zytoplasma-Fraktion ebenfalls eine schwach ausgeprägte Expression von RND1 im Zytoplasma sowie eine 6,88-fach stärkere Expression von RND1 im Zellkern ($n = 3$, $p < 0,05$) (Abb. 8B, 8C).

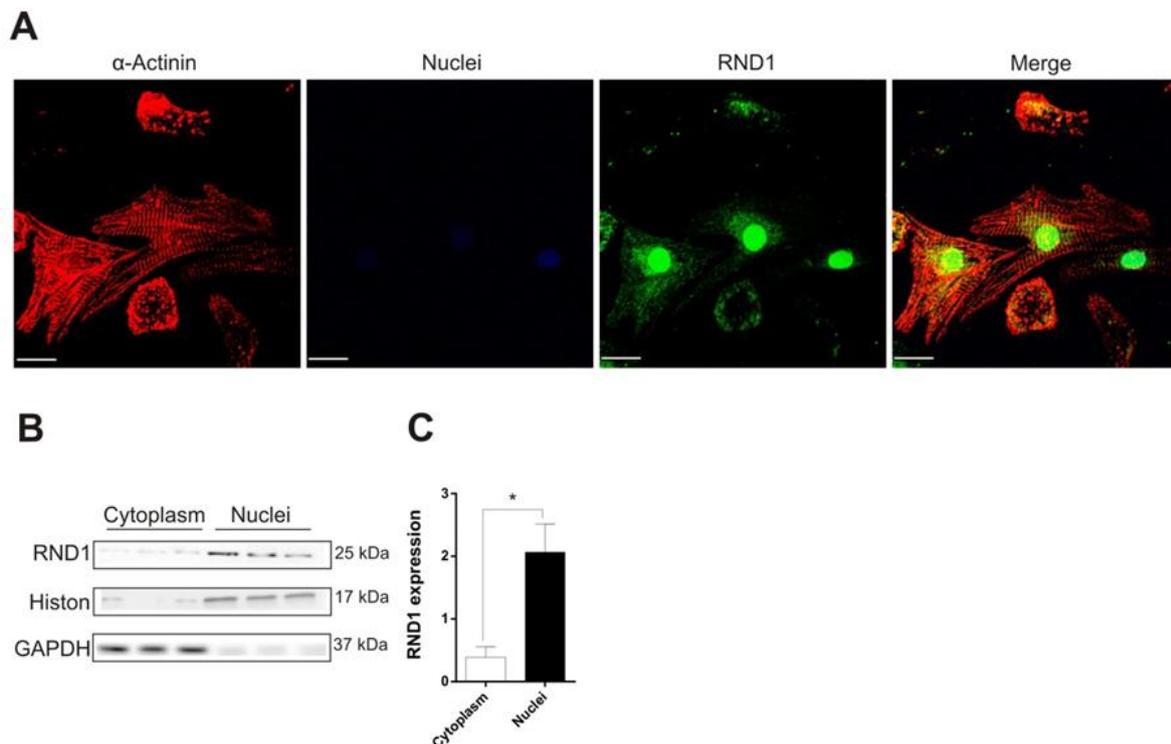


Abbildung 8: Lokalisation von RND1 in NRVCMs

A, repräsentative immunzytologische Analyse von fixierten, nativen NRVCMs nach 48 h Kultivierung. Rot: sarkomeres α -Actinin; blau: Zellkerne; grün: RND1; Maßstabsbalken = 20 μ m. B, C, „Western Blot“-Analyse einer subzellulären Fraktionierung von NRVCMs; Histone-H3 (nukleäres Protein) und GAPDH (zytoplasmatisches Protein) dienen zur Kontrolle der Integrität der Fraktionierung sowie zur Ladekontrolle und Berechnung der relativen Densitometrie; n = 3, * = p < 0,05.

3.1.2 Dosisfindung der generierten Adenoviren

Um zu überprüfen, ob die generierten Adenoviren fähig sind, NRVCMs zu infizieren und RND1 in gewünschtem Maße zu exprimieren, wurden Kardiomyozyten mit ansteigenden Dosen des Virus infiziert.

Die „Western Blot“-Analyse zeigte eine ansteigende Expression von RND1 mit einem Anstieg der Expression im Vergleich zur LacZ-Kontrolle um das 1,7-, 2,1- und 2,9-Fache bei 5, 25 und 50 ifu (Abb. 9A, 9B). Die miRNA gegen RND1 zeigte analog hierzu eine stärkere Herunterregulation der RND1-Expression bei steigender Viruslast um 54 %, 73 % und 89 % bei 5, 25 und 50 ifu (Abb. 9C, 9D). Die generierten Adenoviren sind demzufolge in der Lage eine Überexpression und einen „Knockdown“ von RND1 zu induzieren. Anhand dieser Analyse wurde für alle folgenden Experimente eine Infektionslast von 50 ifu für die NRVCN-Versuche festgelegt.

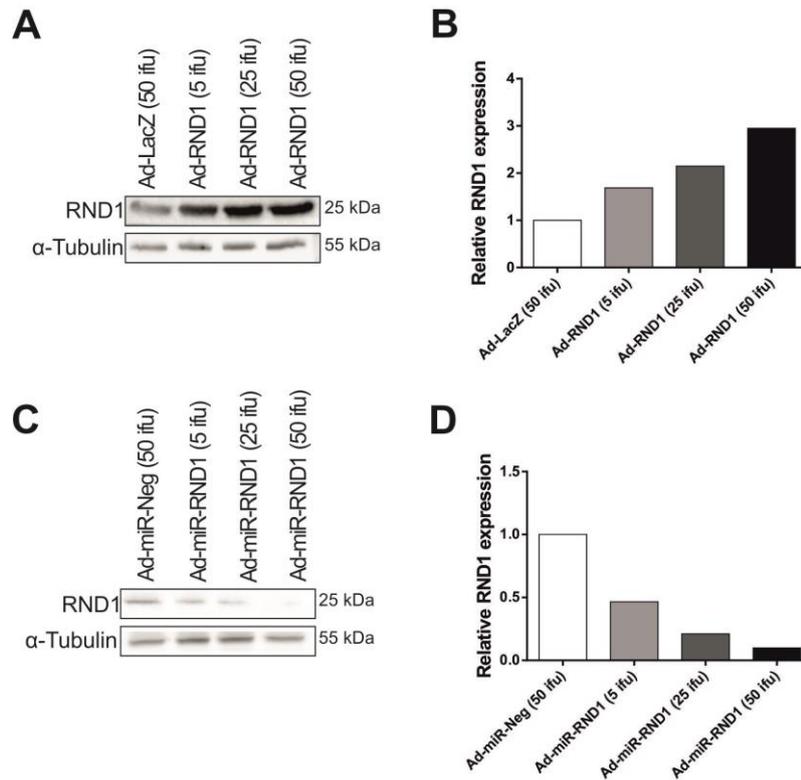


Abbildung 9: Dosiskurven der generierten RND1-Viren

A, „Western Blot“-Analyse von mit verschiedenen Dosen Ad-LacZ und Ad-RND1 infizierten NRVCMS; α -Tubulin dient als Ladekontrolle und zur Berechnung der relativen Densitometrie (B); Anzahl eingesetzter Proben je Bedingung: 1, n = 3. C, „Western Blot“-Analyse verschiedener Dosen Ad-miR-Neg und Ad-miR-RND1; α -Tubulin dient als Ladekontrolle und zur Berechnung der relativen Densitometrie (D); Anzahl eingesetzter Proben je Bedingung: 1, n = 3.

3.1.3 RND1-Überexpression in NRVCMS führt zu einer Zellgrößenzunahme

Zur Überprüfung der Induzierbarkeit einer Hypertrophie durch die Überexpression von RND1 erfolgte eine Zellgrößenbestimmung durch Anfärben von NRVCMS mit einem α -Actinin-Antikörper.

Bereits mit RND1-Adenovirus infizierte Kardiomyozyten zeigten im Vergleich zu den Kontrollzellen, bei welchen eine Zellgröße von $445,4 \mu\text{m}^2$ gemessen wurde, eine signifikant erhöhte Zellgröße von $465,9 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,01$) (Abb. 10A). Weiterhin wurde der Effekt von zwei Hypertrophie-erzeugenden Modellen auf NRVCMS näher untersucht. Bei diesen prohypertrophen Reizen handelte es sich zum einen um den pharmakologischen Einsatz von Phenylephrin und zum anderen um mechanischen „Stretch“. Phenylephrin und 24- bzw. 48-stündiger „Stretch“ führten sowohl bei mit LacZ- als auch bei mit RND1-Adenovirus infizierten Zellen zu signifikant vergrößerten Zellkörpern. Während die PE-Behandlung LacZ-infizierter

Zellen zu einer Größe von $500,3 \mu\text{m}^2$ führte, konnte bei RND1-infizierten Zelleibern eine Zellgröße von $525,3 \mu\text{m}^2$ detektiert werden ($p < 0,01$) (Abb. 10A, 10D). Nach 24-stündigem „Stretch“ zeigten die LacZ-behandelten Zellen mit $272,9 \mu\text{m}^2$ deutlich kleinere Zellkörper im Vergleich zu den RND1-behandelten Zellen mit einer Zellgröße von $322,6 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,001$) (Abb. 10B, 10E). Ähnliche Ergebnisse konnten nach 48 h-„Stretch“ verifiziert werden (LacZ: $262,8 \mu\text{m}^2$; RND1: $327,6 \mu\text{m}^2$; $p < 0,001$) (Abb. 10C, 10E).

RND1 führt in allen untersuchten Hypertrophie-Modellen zu einer Zunahme der Zelloberfläche und ist außerdem ein hinreichender Faktor zur Induktion einer Hypertrophie *in vitro*.

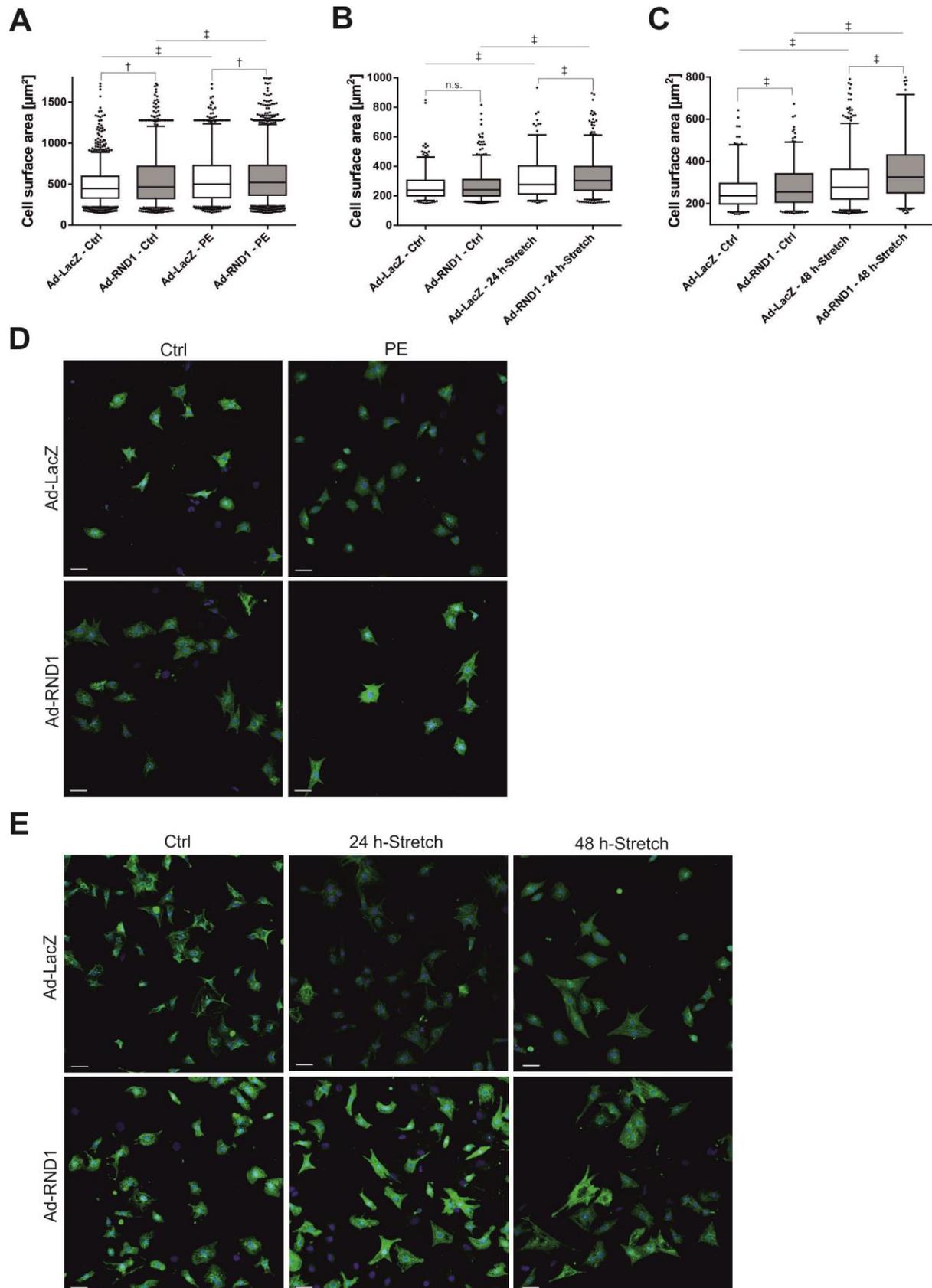


Abbildung 10: RND1-Überexpression in NRVCs führt zu einer Zellgrößenzunahme

Zellgrößenbestimmung von Phenylephrin-stimulierten (A, 5 μM), 24 h- (B) oder 48 h „gestreckten“ (C) NRVCs. Gezeigt ist der Median von drei biologischen Replikaten mit jeweiligem Einsatz von mehr

als 1.500 Zellen pro Bedingung. D, repräsentative Immunfluoreszenz-Analyse von Kontrollzellen (LacZ) oder RND1-überexprimierenden Zellen, mit oder ohne Phenylephrin-Stimulation. E, repräsentative Immunfluoreszenz-Analyse von Kontrollzellen (LacZ) oder RND1-überexprimierenden Zellen, welche 24 h oder 48 h „gestretcht“ wurden. Blau: DAPI, grün: sarkomeres α -Actinin; Maßstabsbalken: 50 μm (D); 70 μm (E). n.s. = nicht signifikant, * = $p < 0,05$, † = $p < 0,01$, ‡ = $p < 0,001$.

3.1.4 RND1 induziert Hypertrophie-assoziierte fötale Gene und *Rcan1-4*

Zur Einordnung der Effekte von RND1 auf die Induktion fötaler Gene und die Aktivierung von Calcineurin A wurden Expressionsprofile nach verschiedenen hypertrophen Stimuli *in vitro* analysiert.

Während überexprimiertes RND1 bereits allein zu einer signifikanten Hochregulation der Transkripte *Nppa* und *Nppb* (*Nppa*: 2,05-fach, $n = 3$, $p < 0,05$; *Nppb*: 1,91-fach, $n = 3$, $p < 0,05$) führte, bedingte die Kombination von hypertrophem Stimulus und viraler Überexpression eine weitere Induktion des fötalen Genprogrammes (Abb. 11A, 11B). Die Stimulation mit PE führte in den mit LacZ-Adenovirus infizierten Zellen zu einer Verzehnfachung ($n = 3$, $p < 0,001$) und in RND1-überexprimierenden Zellen zu einer 16,12-fach gesteigerten *Nppa*-Expression ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 11A). *Nppb* wurde ebenfalls nach PE-Behandlung von LacZ-infizierten Zellen 9,78-fach ($n = 3$, $p < 0,001$) und von RND1-überexprimierenden NRVCMs 15,8-fach stärker exprimiert ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 11B).

Rcan1-4, als ein hoch spezifischer Indikator der Aktivierung von Calcineurin, war nach RND1-Überexpression ebenfalls vermehrt exprimiert (2,91-fach, $n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 11C). Auch hier löste die Behandlung der Kardiomyozyten mit PE einen 3,3-fachen Anstieg der *Rcan1-4*-Expression bei den mit LacZ-Adenovirus infizierten Zellen ($n = 3$, $p < 0,001$) und einen 6,11-fachen Anstieg bei den RND1-überexprimierenden Zellen aus ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 11C).

Während die zusätzliche Behandlung der NRVCMs mit PE bei allen untersuchten Genen zu einem deutlichen Anstieg ihrer Expression führte, zeigte sich im Vergleich zu den ebenfalls „gestretchten“ Kontrollzellen nach 24 h-„Stretch“ meist nur eine tendenzielle Zunahme der Genexpression bei gleichzeitiger RND1-Überexpression. Nach 48 h-„Stretch“ konnte schließlich ein deutlicher Anstieg ihrer Expressionen gemessen werden. So wurde nach RND1-Überexpression eine im Vergleich zu den „gestretchten“ und Ad-LacZ-infizierten Zellen um 20,04 % gesteigerte *Nppa*-Expression ($n = 3$, $p < 0,05$), eine um 28,95 %

gesteigerte *Nppb*-Expression ($n = 3$, $p < 0,01$) und ein um 112,5 % erhöhter *Rcan1-4*-Spiegel gemessen ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 11D, 11E, 11F).

Überexprimiertes RND1 führt sowohl mit als auch ohne die zusätzliche Behandlung von NRVCMs mit Phenylephrin bzw. mechanischem „Stretch“ zu einem Anstieg der „Expressionslevel“ der Hypertrophie-assoziierten fötalen Gene *Nppa*, *Nppb* und *Rcan1-4*.

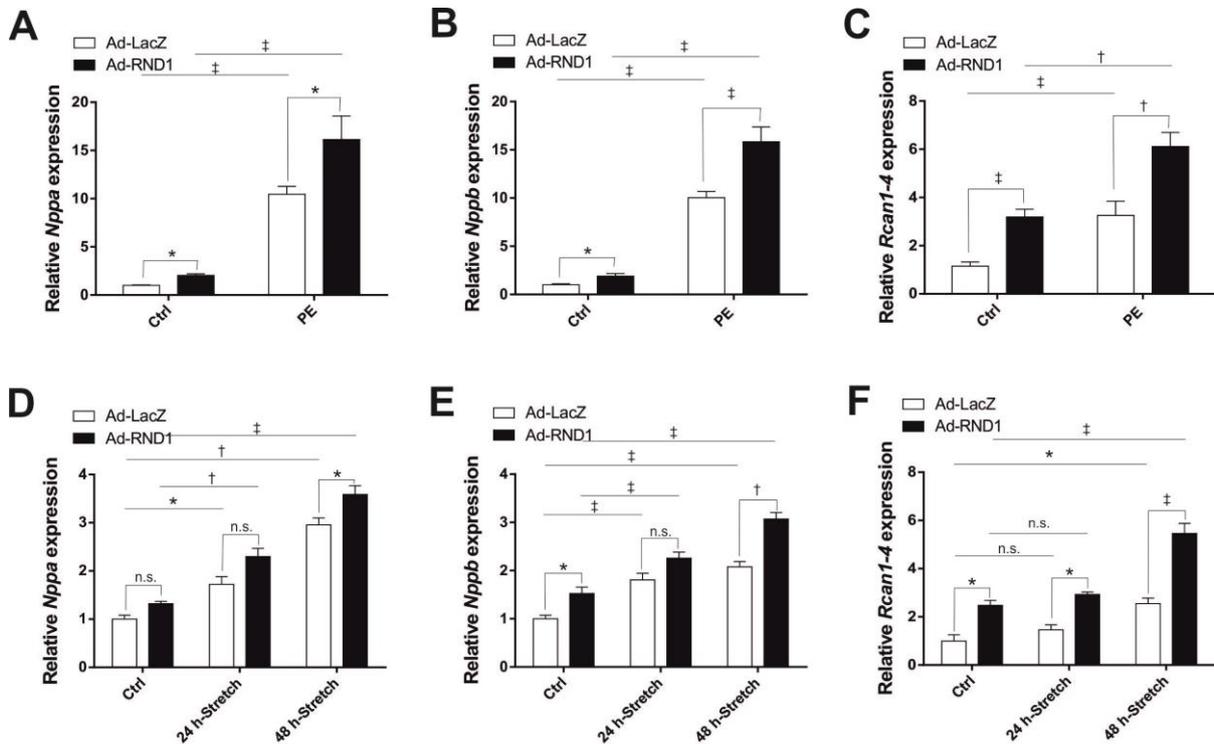


Abbildung 11: RND1 induziert Hypertrophie-assoziierte fötale Gene und *Rcan1-4*

qRT-PCR-Expressionsanalyse der fötalen Gene *Nppa* (A, D), *Nppb* (B, E) und des Calcineurin-Regulators *Rcan1-4* (C, F) nach Infektion der NRVCMs mit LacZ- bzw. RND1-exprimierendem Adenovirus und Behandlung der Zellen mit PE oder 24 h- bzw. 48 h-„Stretch“. $n = 3$. n.s. = nicht signifikant, * = $p < 0,05$, † = $p < 0,01$, ‡ = $p < 0,001$.

3.1.5 RND1-„Knockdown“ führt zur Reduktion der Zellgröße

Um potenzielle Auswirkungen des RND1-„Knockdowns“ auf die Zellgröße von NRVCMs zu verifizieren, wurden analog zu den unter 3.1.3 dargestellten Aufnahmen immunzytologische Analysen durchgeführt.

Bereits die alleinige Herunterregulation von RND1 durch den Einsatz des miR-RND1-Adenovirus führte zu einer Zellgröße von $256,5 \mu\text{m}^2$ (Abb. 12A). Damit bedingte der RND1-„Knockdown“ im Vergleich zu den Kontrollzellen, bei denen eine Größe von $367,6 \mu\text{m}^2$

gemessen wurde, eine nachweislich kleinere Zelloberfläche ($p < 0,001$) (Abb. 12A). Die zusätzliche Behandlung mit Phenylephrin induzierte einen Anstieg der Zellgröße der Kardiomyozyten (Abb. 12A, 12D). Im Gegensatz zu $414,9 \mu\text{m}^2$ -messenden Ad-miR-Neg-behandelten Zellen konnte bei gleichzeitig vorliegendem RND1-„Knockdown“ eine Zelloberfläche von $341,7 \mu\text{m}^2$ festgestellt werden ($p < 0,001$) (Abb. 12A, 12D). Ähnliche Ergebnisse wurden nach der Behandlung der NRVCs mit dynamischem „Stretch“ beobachtet (Abb. 12B, 12C, 12E). Obwohl sowohl 24- als auch 48-stündiger „Stretch“ zu einer Vergrößerung der Zelloberfläche führte, zeigten mit miR-RND1-Adenovirus infizierte Zellen kleinere Zelleiber (24 h-„Stretch“: $251,1 \mu\text{m}^2$; 48 h-„Stretch“: $269,3 \mu\text{m}^2$) im Vergleich zu den mit miR-Neg-Adenovirus infizierten Zellen (24 h-„Stretch“: $272,9 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$; 48 h-„Stretch“: $282,7 \mu\text{m}^2$, $p = 0,062$).

Entgegen der Überexpression führt die alleinige Herunterregulation von RND1 zu antihypertrophen Effekten. Beide den Zellen zugefügten Stimuli werden in ihrer Wirkung durch den RND1-„Knockdown“ abgeschwächt.

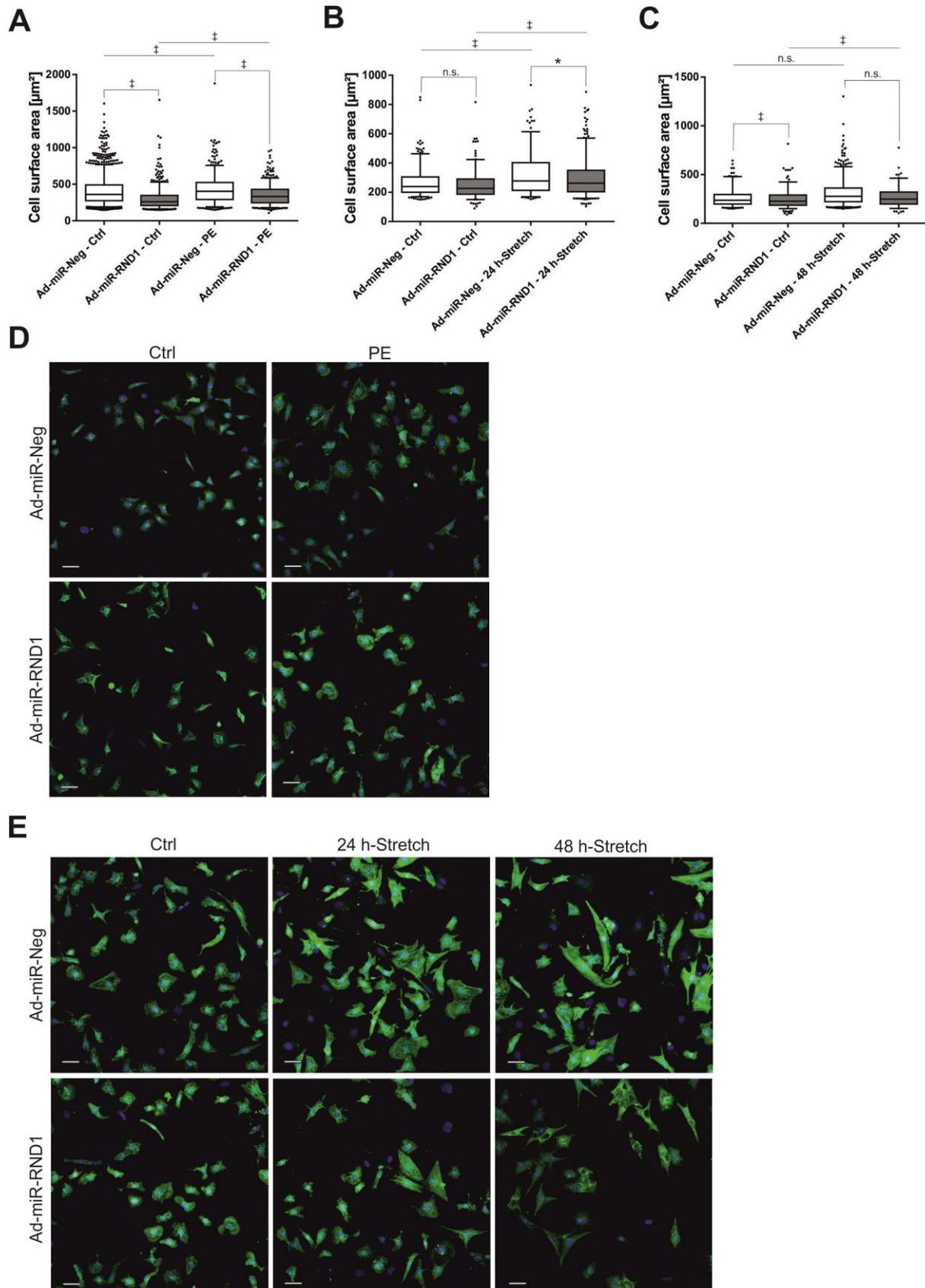


Abbildung 12: RND1-„Knockdown“ führt zur Reduktion der Zellgröße

Analyse der Zellgröße von Phenylephrin-behandelten (A, 5 μM), 24 h- (B) oder 48 h „gestreckten“ (C) NRVCs. Zu sehen ist der Median von drei biologischen Replikaten mit jeweiligem Einsatz von

mehr als > 1.500 Zellen pro Bedingung. D, repräsentative Immunfluoreszenz-Analyse von LacZ- oder RND1-überexprimierenden Zellen, mit bzw. ohne Stimulation durch Phenylephrin. E, repräsentative Immunfluoreszenz-Analyse von Kontrollzellen (Ad-miR-Neg) oder Ad-miR-RND1-exprimierenden Zellen, welche 24 h bzw. 48 h „gestretcht“ wurden. Blau: DAPI, grün: sarkomeres α -Actinin; Maßstabsbalken: 50 μ m (D); 70 μ m (E). n.s. = nicht signifikant, * = $p < 0,05$, ‡ = $p < 0,001$.

3.1.6 RND1-„Knockdown“ reduziert die Auswirkung von Hypertrophie-assoziierten fötalen Genen und *Rcan1-4*

Um die Effekte von herunterreguliertem RND1 auf die Expression der Hypertrophie-Marker *Nppa*, *Nppb* und *Rcan1-4* zu überprüfen, wurden qRT-PCR-Analysen nach Infektion der NRVCs mit RND1-herunterregulierendem Adenovirus durchgeführt.

Bereits der alleinige RND1-„Knockdown“ führte zu einer signifikanten Abnahme der untersuchten Genexpressionen (*Nppa*: Abnahme um 54 %, $n = 3$, $p < 0,05$; *Nppb*: Abnahme um 25 %, $n = 3$, $p < 0,05$; *Rcan1-4*: Abnahme um 41 %, $n = 3$, $p < 0,05$) (Abb. 13A, 13B, 13C). Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit Phenylephrin bewirkte eine deutliche Expressionssteigerung der gemessenen Transkripte, die allerdings nach RND1-„Knockdown“ ein signifikant vermindertes Ausmaß annahm. So führte die PE-Stimulation in den mit miR-Neg-Adenovirus infizierten Zellen zu einer 10,92-fach ($n = 3$, $p < 0,001$) und in RND1-herunterregulierenden Zellen zu einer 5,6-fach gesteigerten *Nppa*-Expression ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 13A). Auch *Nppb* wurde nach PE-Behandlung von Ad-miR-Neg-infizierten Zellen 8,21-fach ($n = 3$, $p < 0,001$) und von miR-RND1-infizierten NRVCs 4,57-fach stärker exprimiert ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 13B). Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch die Analyse des *Rcan1-4*-Expressionsniveaus. PE löste einen 3,53-fachen Anstieg ($n = 3$, $p < 0,001$) der *Rcan1-4*-Expression bei den mit miR-Neg-Adenovirus infizierten Zellen und einen 2,21-fachen Anstieg bei den RND1-herunterregulierenden Zellen aus ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 13C).

Neben dem hypertrophen Effekt durch Phenylephrin bewirkte auch das „Stretchen“ sowohl für die mit Kontrollvirus (Ad-miR-Neg) als auch für die mit miR-RND1-Virus behandelten Zellen eine signifikante Hochregulation der Transkripte *Nppa*, *Nppb* und *Rcan1-4*. Dennoch führte die Herunterregulation von RND1 zu einem eingeschränkten Anstieg dieser Genexpressionen. So konnte nach RND1-„Knockdown“ und 24-stündigem „Stretch“ eine im Vergleich zu den „gestretchten“ und miR-Neg-infizierten Zellen um 33,33 % verminderte *Nppa*-Expression ($n = 3$, $p < 0,05$), eine um 50 % verminderte *Nppb*-Expression ($n = 3$, $p < 0,001$) und ein um 26,97 % gesenkter *Rcan1-4*-Spiegel ($n = 3$, $p < 0,05$) gemessen werden (Abb. 13D, 13E, 13F). Auch nach 48 h-„Stretch“ wurden signifikante

Expressionsunterschiede der untersuchten Gene festgestellt. Während bei mit Kontrollvirus (Ad-miR-Neg) behandelten Zellen ein 2,82-facher Anstieg der *Nppa*-Expression ausgelöst werden konnte ($n = 3$, $p < 0,001$), wurde bei RND1-herunterregulierenden Zellen ein 1,58-facher Anstieg gegenüber den „ungestreckten“ und mit Ad-miR-Neg behandelten Zellen gemessen ($n = 3$, $p < 0,05$) (Abb. 13D). Die ebenfalls durchgeführte Expressionsanalyse von *Nppb* führte nach 48 h-„Stretch“ von Ad-miR-Neg-infizierten Zellen zu einer 2,29-fach ($n = 3$, $p < 0,001$) und von Ad-miR-RND1-infizierten NRVCs zu einer 1,95-fach stärkeren Genexpression ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 13E). Auch für *Rcan1-4* konnte eine ähnliche Expressionssteigerung beobachtet werden (Ad-miR-Neg: 2,14-fach, $n = 3$, $p < 0,001$; Ad-miR-RND1: 1,63-fach, $n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 13F).

Herunterreguliertes RND1 führt in allen untersuchten Hypertrophie-Modellen zu einer abgeschwächten Zunahme der Hypertrophie-assoziierten fötalen Gene *Nppa*, *Nppb* und *Rcan1-4* und stellt einen hinreichenden Faktor zur Einschränkung einer Hypertrophie *in vitro* dar.

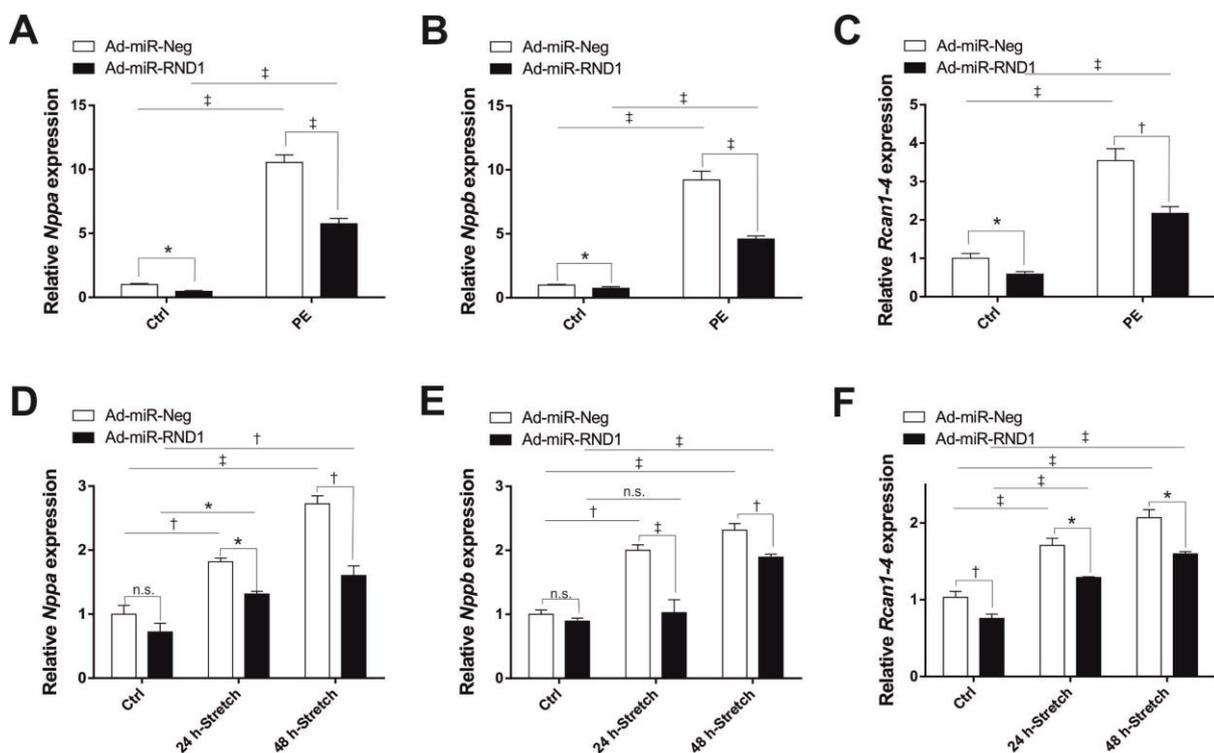


Abbildung 13: RND1-„Knockdown“ reduziert die Auswirkung von Hypertrophie-assoziierten Genen und *Rcan1-4*

qRT-PCR-Expressionsanalyse der fötalen Gene *Nppa* (A, D), *Nppb* (B, E) und des Calcineurin-Regulators *Rcan1-4* (C, F) nach Infektion der NRVCs mit miR-Neg- bzw. miR-RND1-exprimierendem Adenovirus und Behandlung der Zellen mit PE oder 24 h- bzw. 48 h-„Stretch“. $n = 3$. n.s. = nicht signifikant, * = $p < 0,05$, † = $p < 0,01$, ‡ = $p < 0,001$.

3.1.7 RND1 induziert die Proliferationsmarker Ki67 und PHH3

Neben der hypertrophen Wirkung von RND1 wurde auch ein möglicher Einfluss auf die Zellproliferation immunzytologisch untersucht. Hierzu wurden neben dem Anfärben von sarkomerem α -Actinin auch die Antigene Ki67 und PHH3 mit spezifischen Antikörpern gefärbt.

Die adenovirale Überexpression von RND1 führte zu einem signifikanten Anstieg der Expression beider Proliferationsmarker. Während die Kontrollzellen (LacZ) der beiden Färbungen eine mittlere prozentuale Proliferation von 1,15 % lieferten, wurden bei RND1-überexprimierenden Zellen im Rahmen der Ki67-Färbung 8,2 % und bei Färbung PHH3-positiver Kardiomyozyten 5,28 % proliferationsaktive Zellen gezählt (B, D: n = 5, p < 0,001). Ki67 und PHH3 unterscheiden sich bezüglich ihres Expressionsverhaltens in sich teilenden Zellen, abhängig vom jeweiligen Zellzyklus-Stadium. So ist Ki67 (Abb. 14A, 14B) in sämtlichen Phasen des Zellzyklus (ausgenommen der G0-Phase) nachweisbar, während PHH3 (Abb. 14C, 14D) spezifisch und nahezu ausschließlich in der Mitose-Phase zu detektieren ist. Dies erklärt die relativ erhöhte Nachweisbarkeit des aktiven Ki67 im Vergleich zu den mit PHH3-Antikörper gefärbten NRVCMS.

Folglich ist RND1 als ein potenter Induktor des Zellzyklus festzuhalten.

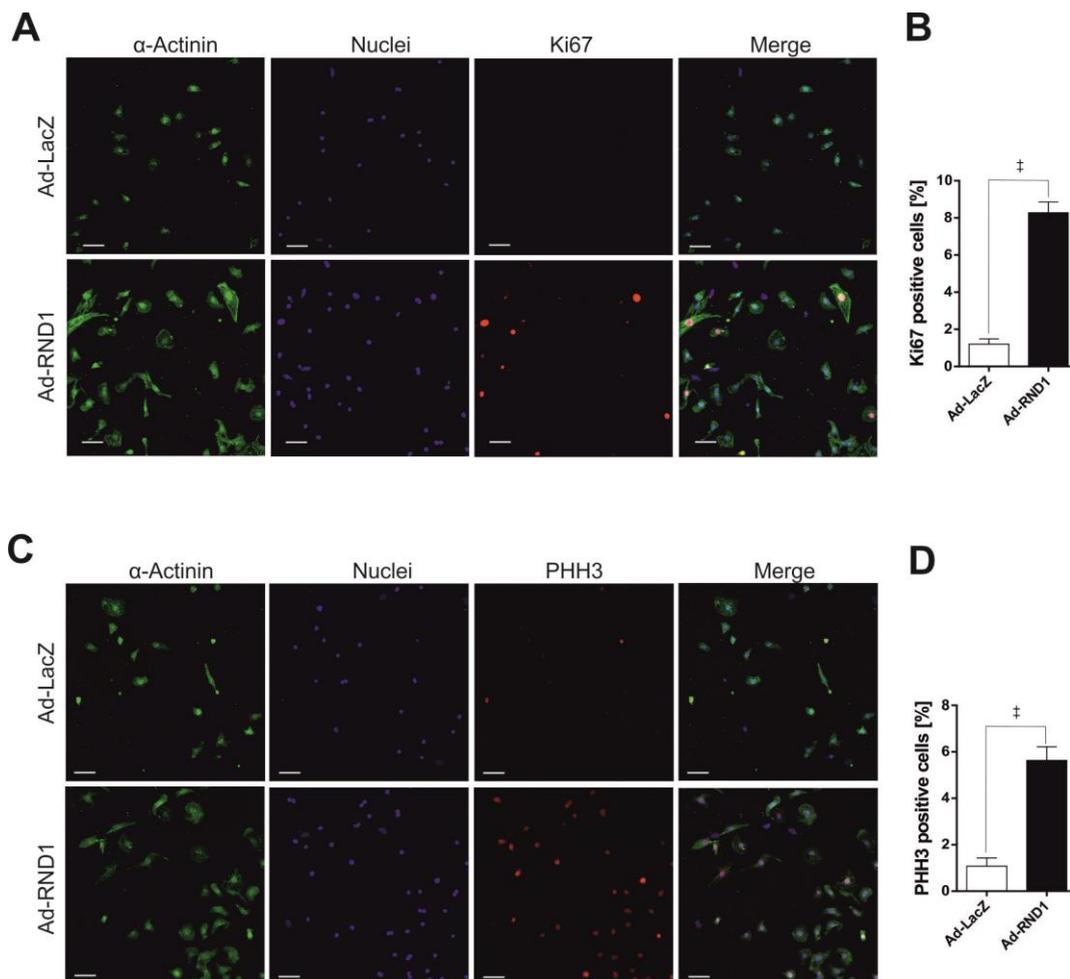


Abbildung 14: RND1 induziert die Proliferationsmarker Ki67 und PHH3

A, repräsentative immunzytologische Analyse Ki67-positiver NRVCMs nach Infektion mit LacZ- oder RND1-überexprimierendem Adenovirus. B, Auswertung der unter A dargestellten immunzytologischen Aufnahmen. C, repräsentative immunzytologische Analyse PHH3-positiver Kardiomyozyten nach Infektion mit LacZ- oder RND1-überexprimierendem Adenovirus. D, Auswertung der unter C dargestellten immunzytologischen Aufnahmen. $n = 5$. Grün: sarkomeres α -Actinin, blau: DAPI, rot: Ki67 (A), PHH3 (C); Maßstabsbalken: 50 μ M. ‡ = $p < 0,001$.

Um potenzielle Effekte des RND1-„Knockdowns“ auf die Zellzyklus-Aktivität zu ermitteln, wurden immunzytologische Analysen nach adenoviraler Infektion mit miR-Neg- bzw. miR-RND1-Adenovirus durchgeführt. Auch hier wurden neben sarkomerem α -Actinin auch Ki67 und PHH3 angefärbt. Sowohl im Rahmen der Ki67-Färbung (Abb. 15A) als auch nach Anfärben PHH3-positiver Zellen (Abb. 15B) konnte durch die RND1-Herunterregulation eine signifikante Reduktion der Zellproliferation detektiert werden (Ki67-positve Zellen: Abnahme um 0,67 %, $n = 3$, $p < 0,01$; PHH3-positve Zellen: Abnahme um 0,65 %, $n = 3$, $p < 0,05$).

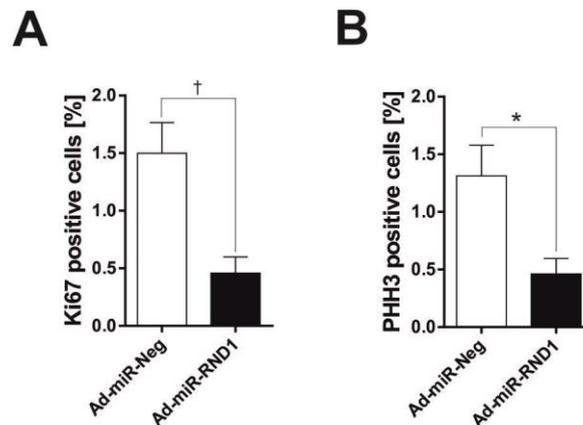


Abbildung 15: RND1-„Knockdown“ reduziert die Zellproliferation

A, repräsentative Analyse Ki67-positiver NRVCs nach Behandlung der Zellen mit Kontrollvirus (Ad-miR-Neg) oder RND1-herunterregulierendem Adenovirus. B, repräsentative Analyse PHH3-positiver Kardiomyozyten nach Infektion mit Kontrollvirus (Ad-miR-Neg) oder RND1-herunterregulierendem Adenovirus. n = 3. * = p < 0,05, † = p < 0,01.

3.1.8 RND1 zeigt keinen Effekt auf die Zellviabilität

Zur Überprüfung einer möglichen Beeinflussung der Zellviabilität durch RND1 wurde der MTT-„Assay“ durchgeführt. Hierzu wurden unterschiedliche Dosen der Adenoviren zur Überexpression und zum „Knockdown“ von RND1 eingesetzt.

50 und 100 ifu des RND1-überexprimierenden Adenovirus führten im Vergleich zu mit Kontrollvirus (Ad-LacZ) infizierten Zellen zu keinen signifikanten Unterschieden in der Zellviabilität (Abb. 16A). Erst 200 ifu konnten eine signifikante Zunahme lebender Kardiomyozyten bewirken (Ad-LacZ: 74,06 %; Ad-RND1: 93,06 %; n = 3, p < 0,05) (Abb. 16A).

Analog dazu wurde durch Adenovirus-vermittelten RND1-„Knockdown“ ebenfalls erst bei einem Einsatz von 200 ifu eine signifikante Abnahme der Zellviabilität beobachtet (Ad-miR-neg: 92,06 %; Ad-miR-RND1: 66,57 %; n = 3, p < 0,05) (Abb. 16B).

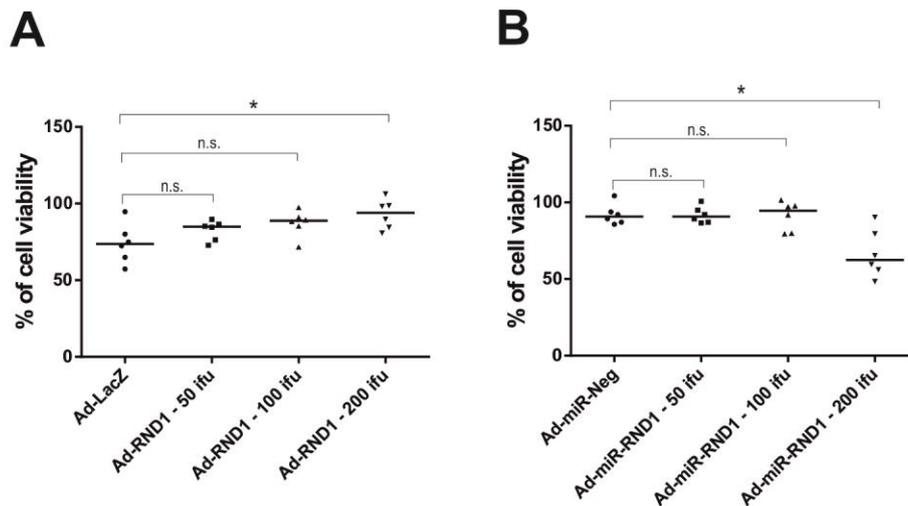


Abbildung 16: RND1 zeigt keinen Effekt auf die Zellviabilität

Prüfung der Zellviabilität mittels MTT-„Assay“ von zuvor mit Adenovirus-behandelten Kardiomyozyten (A: RND1-Überexpression; B: RND1-„Knockdown“). n = 3. n.s. = nicht signifikant, * = $p < 0,05$.

3.1.9 Ergebnisse des „Yeast two-Hybrid Screens“

Um bislang unbekannte Interaktionspartner von RND1 zu identifizieren, wurde in Kooperation mit Hybrigenics (Frankreich) ein „Yeast two-Hybrid Screen“ durchgeführt. Ziel war das Aufdecken von potenziellen Bindungspartnern, sodass anschließend das Ausmaß und die Richtung des Einflusses der Proteine aufeinander erforscht und mögliche nachgeschaltete Signalwege näher untersucht werden konnten.

Aus der verwendeten kardialen cDNA-Bank aus humanem Herzen konnten für RND1 zahlreiche Bindungspartner identifiziert werden. Es wurden letztendlich 173 Millionen Interaktionen überprüft und schließlich 273 positive Klone näher untersucht. Myozap wurde als ein hoch wahrscheinlicher Interaktionspartner von humanem RND1 identifiziert.

Tabelle 21: Auflistung einiger im „Yeast two-Hybrid Screen“ detektierten Bindungspartner von RND1

PBS* = „Predicted Biological Score“

A: sehr hohe Wahrscheinlichkeit der Interaktion

B: hohe Wahrscheinlichkeit der Interaktion

C: gute Wahrscheinlichkeit der Interaktion

D: moderate Wahrscheinlichkeit der Interaktion

E: Proteine mit einer Beute-interagierenden Domäne, die ein bekanntes Protein-Interaktionsmotiv darstellt

Name	ID (NCBI)	Anzahl positiv getesteter Klone	PBS*
Homo sapiens – CCNI	10.983	3	B
Homo sapiens – CCNI	10.983	2	B
Homo sapiens - COPS2	9.318	2	B
Homo sapiens - COPS2	9.318	2	B
Homo sapiens - COPS2	9.318	1	B
Homo sapiens – CREBZF	58.487	6	E
Homo sapiens - CYB5A	1.528	3	D
Homo sapiens - EEF1A1	1.915	2	B
Homo sapiens - EEF1A1	1.915	1	B
Homo sapiens - ELP3	55.140	1	D
Homo sapiens - HEY2	23.493	1	E
Homo sapiens - MCM3AP	8.888	1	C
Homo sapiens - MCM3AP	8.888	13	C
Homo sapiens - MYH7	4.625	1	B
Homo sapiens - MYH7	4.625	1	B
Homo sapiens – MYOZAP	100.820.829	1	A
Homo sapiens – MYOZAP	100.820.829	1	A
Homo sapiens – MYOZAP	100.820.829	2	A
Homo sapiens – MYOZAP	100.820.829	3	A
Homo sapiens – MYOZAP	100.820.829	2	A
Homo sapiens – MYOZAP	100.820.829	1	A
Homo sapiens – MYOZAP	100.820.829	5	A

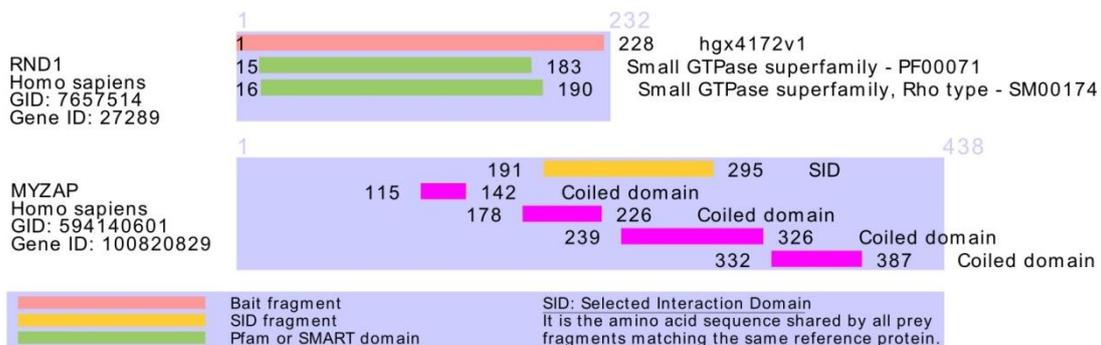


Abbildung 17: Darstellung interagierender RND1- und Myozap-Domänen

Hier ist die detaillierte Interaktion zwischen RND1 und Myozap dargestellt. Von besonderer Bedeutung ist die sogenannte SID, die selektiv interagierende Domäne des Myozap. Dabei handelt es sich um den von allen positiv getesteten Myozap-Fragmenten gemeinsamen Aminosäuren-Abschnitt, welcher mit RND1 in Verbindung tritt.

3.1.10 Myozap, ein Interaktionspartner von RND1

Die Identifikation von Myozap im „Yeast two-Hybrid Screen“ ist kardiologisch interessant, da Myozap im Rahmen der Aktivierung des RhoA-abhängigen SRF-Signalweges eine bedeutende Rolle zugesprochen wird.

Die Interaktion zwischen RND1 und Myozap wurde durch Co-Immunopräzipitationen im Maus- und auch im Rattenherzen bestätigt (A, B: n = 3) (Mausgewebe: Abb. 18A; Rattengewebe: Abb. 18B). Weiterhin wurde die Colokalisation beider Proteine mithilfe eines konfokalen Mikroskopes näher untersucht (n = 3) (Abb. 18C). Myozap zeigte sich vorwiegend im Zytoplasma und entlang der Zellmembran lokalisiert, während RND1 fast ausschließlich nukleär angefärbt wurde. Dennoch konnten perinukleär gemeinsame Lokalisationen ausgemacht werden.

Beide Proteine waren nach biomechanischem Reiz (48 h-„Stretch“) in Kardiomyozyten signifikant hochreguliert (RND1: 3,97-fach, n = 3, p < 0,05; Myozap: 5,03-fach, n = 3, p < 0,01). Der durchgeführte „Stretch“ führte somit zu einer Expressionssteigerung beider Proteine (Abb. 18D-18G).

Die Expressionsspiegel von RND1 und Myozap werden durch mechanische Dehnung in gleichsame Richtung reguliert.

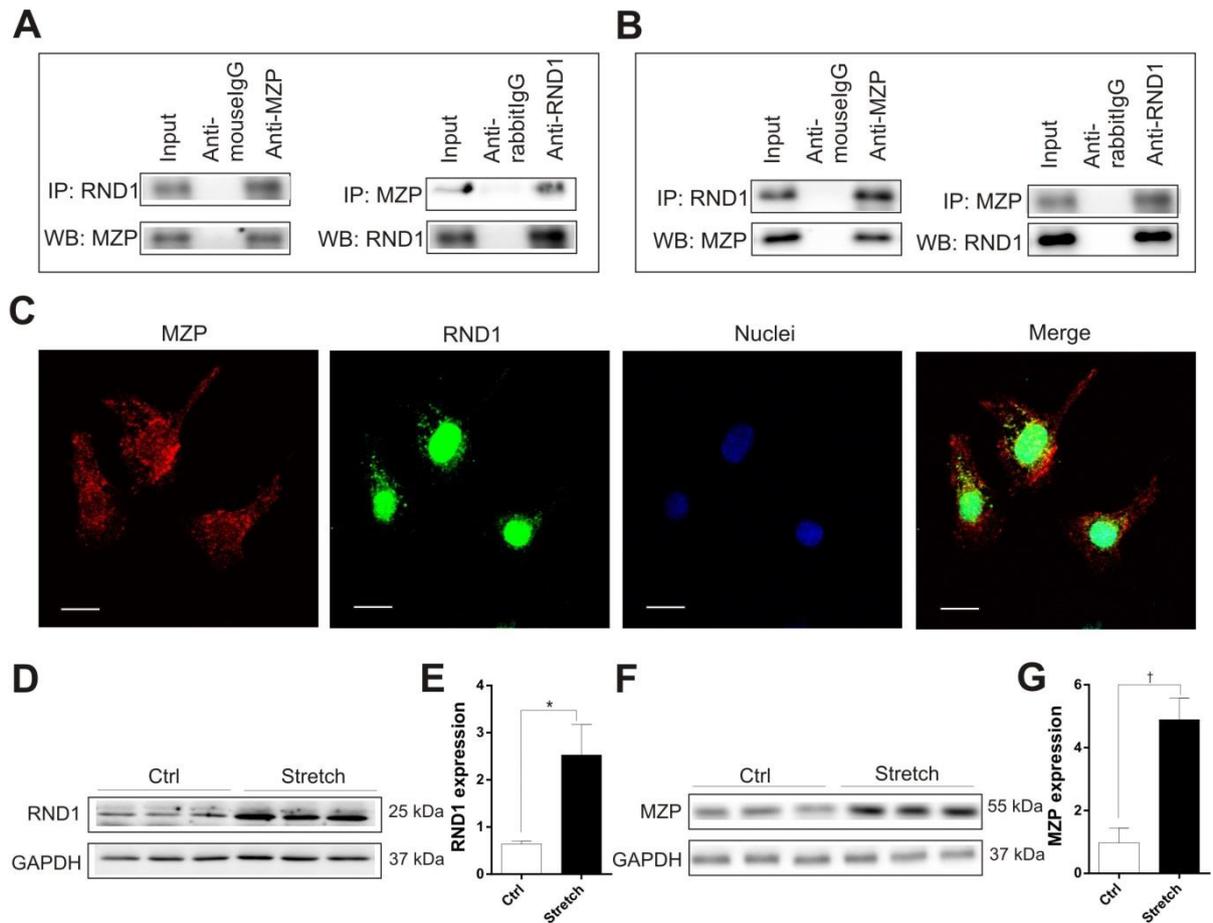


Abbildung 18: Myozap, ein Interaktionspartner von RND1

A, B, Co-Immunopräzipitationen zur Bestätigung der Interaktion zwischen RND1 und Myozap (Mausherzgewebe: A; Rattenherzgewebe: B). C, immunzytologische Darstellung der Colokalisation beider Proteine. Die Immunfluoreszenz-Aufnahme wurde mit einem Konfokal-Mikroskop aufgenommen (LSM 510). Rot: Myozap, grün: RND1, blau: DAPI; Maßstabsbalken: 30 μ m. D-G, „Western Blot“-Analyse von 48 h-„gestreckten“ Kardiomyozyten. n = 3. * = p < 0,05, † = p < 0,01.

3.1.11 RND1 aktiviert den SRF-Signalweg

Um das Verständnis bezüglich der Rollen von RND1 und Myozap nach Überexpression bzw. „Knockdown“ auf den SRF-Signalweg zu erweitern, wurden Luciferase-„Assays“ durchgeführt.

Ad-RND1-infizierte Zellen zeigten eine 5,75-fach stärkere Hochregulation der SRF-Luciferaseaktivität im Vergleich zu den Ad-LacZ-infizierten Kardiomyozyten (n = 3, p < 0,001) und eine 1,81-fach stärkere Hochregulation verglichen mit den Ad-Myozap-infizierten Zellen (n = 3, p < 0,01) (Abb. 19A). Wurden beide Proteine überexprimiert, konnte eine weitere

Steigerung der SRF-Luciferaseaktivität erreicht werden (8,13-fach, $n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 19A).

Nach 48 h-„Stretch“ von RND1-überexprimierenden NRVCMs wurde im Vergleich zu den „ungestreckten“ Kontrollzellen (LacZ) eine 3,67-fach so starke SRF-Aktivität ($n = 3$, $p < 0,01$) und verglichen mit den „gestreckten“ und LacZ-überexprimierenden Zellen ein 1,93-facher Anstieg der SRF-Luciferaseaktivität ermittelt ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 19B). Ähnliche Ergebnisse lieferte die SRF-Analyse nach Überexpression von Myozap. 48-stündiger „Stretch“ führte bei Myozap-überexprimierenden Kardiomyozyten gegenüber den „ungestreckten“ Kontrollzellen (LacZ) zu einer 2,24-fachen ($n = 3$, $p < 0,001$) und gegenüber den „gestreckten“ und Ad-LacZ-infizierten Zellen zu einer 1,34-fachen SRF-Aktivität ($n = 3$, $p < 0,01$) (Abb. 19C).

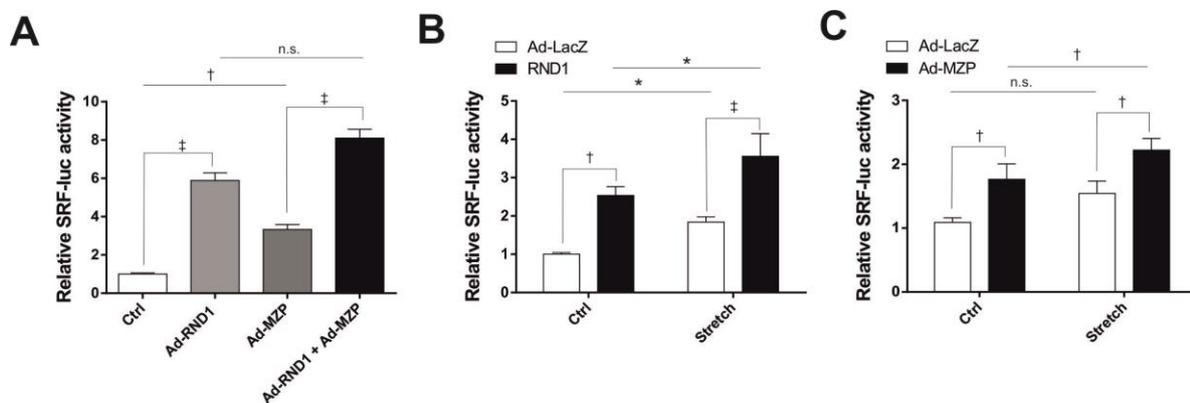


Abbildung 19: RND1 und Myozap induzieren das SRF-„Signaling“

A, Analyse der SRF-Luciferaseaktivität nach adenoviraler Überexpression von RND1 bzw. Myozap und kombinierter Überexpression. B, Analyse der SRF-Luciferaseaktivität von RND1-überexprimierenden NRVCMs und Stimulation mit 48 h-„Stretch“. C, Analyse der SRF-Luciferaseaktivität von Myozap-überexprimierenden Kardiomyozyten und Stimulation mit 48 h-„Stretch“. $n = 3$. n.s. = nicht signifikant, * = $p < 0,05$, † = $p < 0,01$, ‡ = $p < 0,001$.

Da bekannt ist, dass Myozap über RhoA den SRF-Signalweg aktiviert, wurde im Folgenden die Wirkung der Rho-inhibitorischen C3-Transferase (WT) und die seiner mutierten Form (E174Q) auf die Luciferaseaktivität nach RND1-Überexpression näher untersucht. Sowohl die C3-WT als auch C3-E174Q sind von Frau Dr. Astrid Rohrbeck (Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover) bezogen worden.

Nach Inhibition von RhoA war die SRF-Luciferaseaktivität in Ad-RND1-infizierten NRVCMs im Vergleich zu mit E174Q-behandelten Kardiomyozyten um den Faktor 0,46 vermindert ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 20B). So konnte auch nach RhoA-Inhibition eine verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant erhöhte SRF-Aktivität gemessen werden.

Die RND1-vermittelte Induktion des SRF-Signalweges erfolgt nicht ausschließlich über den RhoA-Pathway.

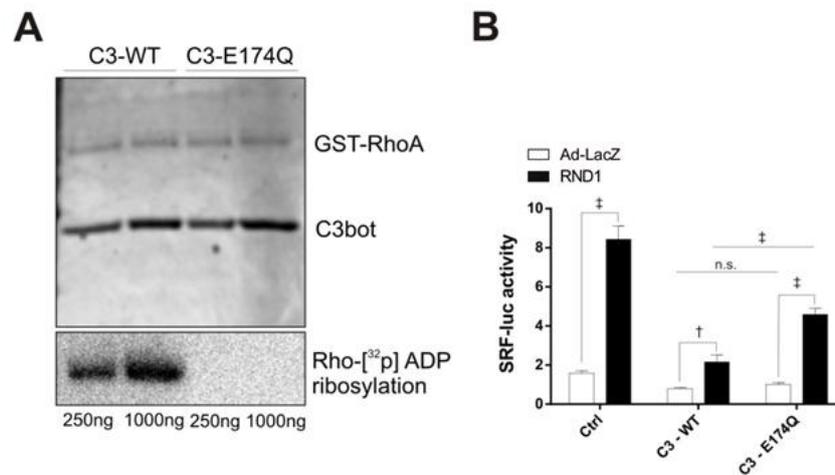


Abbildung 20: RND1 zeigt keine RhoA-Abhängigkeit

A, „Western Blot“-Analyse der mit verschiedenen Konzentrationen der Wildtyp-C3-Transferase (C3-WT) bzw. ihrer Mutanten (C3-E174Q) inkubierten GST-RhoA. Die unterste Zeile bestätigt die fehlende RhoA-hemmende Aktivität der C3-Transferase-Mutanten. B, Analyse der SRF-Luciferaseaktivität von RND1-überexprimierenden NRVCMs bei zusätzlicher Behandlung mit C3-WT bzw. C3-E174Q. $n = 3$. n.s. = nicht signifikant, * = $p < 0,05$, † = $p < 0,01$, ‡ = $p < 0,001$.

Um mögliche Auswirkungen auf den SRF-Signalweg nach Herunterregulation durch RND1 bzw. Myozap zu detektieren, wurden weitere Luciferase-„Assays“ durchgeführt.

Nach Infektion mit RND1- bzw. Myozap-microRNA enthaltendem Adenovirus konnte eine signifikant reduzierte SRF-Luciferaseaktivität detektiert werden. Die Herunterregulation von RND1 führte verglichen zu den Kontrollzellen (miR-Neg) zu einer um 53 % ($n = 3$, $p < 0,001$), die des Myozap zu einer um 49 % verminderten Aktivierung des SRF-Signalweges ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 21A). Die größte Abnahme mit 72 % wurde durch die Herunterregulation beider Proteine erreicht ($n = 3$, $p < 0,001$).

„Stretch“-behandelte Kardiomyozyten zeigten eine 2,82-fache Zunahme der SRF-Aktivität ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 21B). Wurde RND1 herunterreguliert, so war die Aktivität „ungestretchter“ Zellen um 47 % ($n = 3$, $p < 0,001$) und nach dynamischer Dehnung um 56 % gegenüber der Luciferaseaktivität der mit Ad-miR-Neg-behandelten Zellen reduziert ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 21B). Eine ähnliche Wirkung konnte durch den „Knockdown“ von Myozap beobachtet werden. Nach der Herunterregulation von Myozap ergab sich im Vergleich mit den Ad-miR-Neg-infizierten Kardiomyozyten für die „ungestretchten“ Zellen eine um 28 % ($n = 3$, $p < 0,01$) und nach 48 h-„Stretch“ eine um 39 % reduzierte SRF-Aktivität ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 21B).

Zur Überprüfung, ob RND1 im Hypertrophie-Modell von Myozap abhängig ist und umgekehrt, wurde die SRF-Aktivität nach Überexpression von RND1 und „Knockdown“ von Myozap einerseits und nach Myozap-Überexpression und RND1-Herunterregulation andererseits bestimmt. Im erstgenannten Fall war die Aktivität signifikant um das 2,23-Fache erhöht ($n = 3$, $p < 0,001$), im zweitgenannten konnte lediglich eine tendenzielle Zunahme beobachtet werden (Abb. 21C).

Die Beeinflussung der SRF-Expression durch RND1 auf Proteinebene ist in Abb. 21D-21G gezeigt. Nach Infektion von NRVCMs mit RND1-überexprimierendem Adenovirus wurde SRF signifikant vermehrt exprimiert (5,13-fach, $n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 21E). Umgekehrt zeigte die SRF-Expression nach Infektion von NRVCMs mit RND1-microRNA exprimierendem Adenovirus eine tendenzielle Herunterregulation ($n = 3$, $p = 0,533$) (Abb. 21G).

Sowohl RND1 als auch Myozap sind nach adenoviraler Herunterregulation in der Lage, den „Stretch“-induzierbaren SRF-Signalweg stark einzuschränken. Während RND1 die SRF-Aktivität auch unabhängig von Myozap modulieren kann, konnte für Myozap eine Abhängigkeit von RND1 detektiert werden.

Die in den Luciferase-„Assays“ aufgedeckte Interaktion von RND1 und dem Serum response factor konnte auf Proteinebene bestätigt werden.

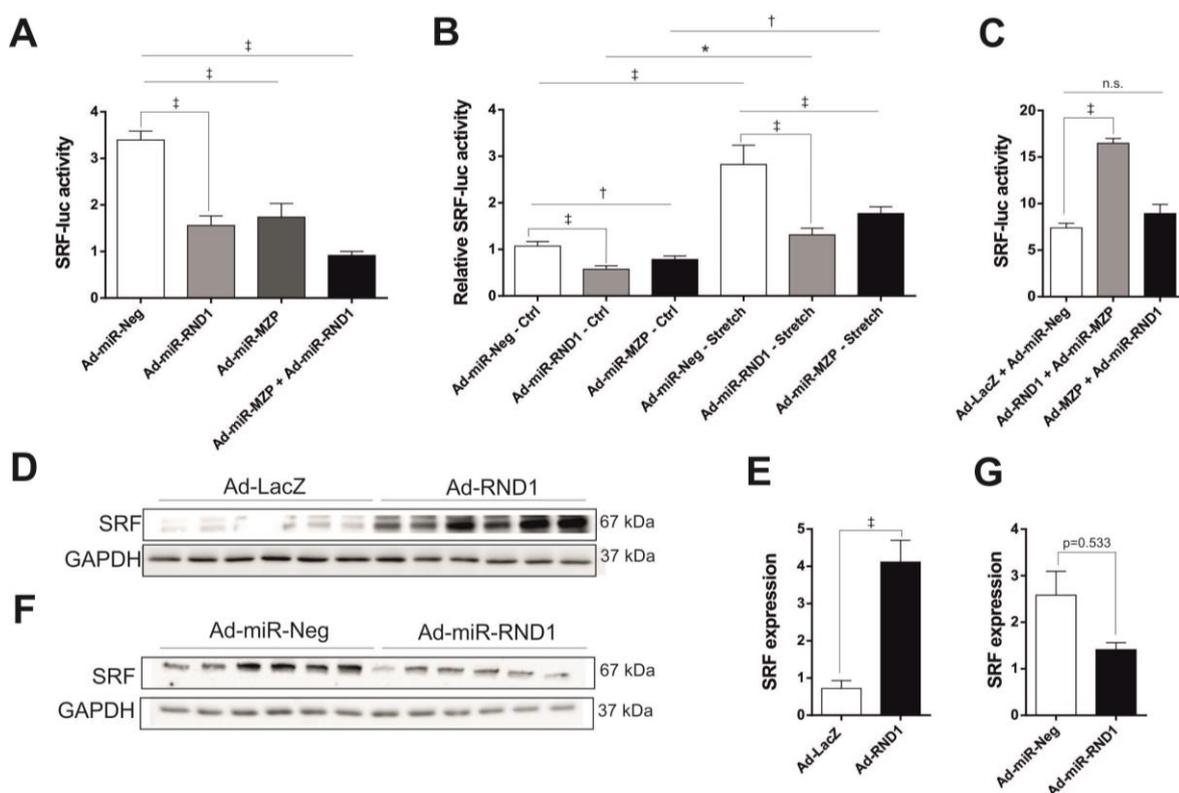


Abbildung 21: RND1 aktiviert den SRF-Signalweg

A, Analyse der SRF-Luciferaseaktivität nach adenoviralem „Knockdown“ von RND1 bzw. Myozap und ihrer kombinierten Herunterregulation. B, Analyse der SRF-Luciferaseaktivität nach 48-stündigem „Stretch“ und Herunterregulation von RND1 bzw. Myozap. C, Ergebnis des Luciferase-„Assays“ zur Prüfung des Abhängigkeitsverhältnisses zwischen RND1 und Myozap. D-G zeigen die SRF-Expression nach adenoviraler RND1-Überexpression bzw. -„Knockdown“ auf Proteinebene. $n = 3$. n.s. = nicht signifikant, * = $p < 0,05$, † = $p < 0,01$, ‡ = $p < 0,001$.

RND1 konnte damit als ein starker Induktor des SRF-Signalweges charakterisiert werden. Bei gleichzeitiger Überexpression von Myozap wird diese Aktivierung noch weiter verstärkt und selbst bei gleichzeitigem Myozap-„Knockdown“ kommt es zu einer deutlichen SRF-Aktivitätszunahme. Darüber hinaus interagiert RND1 mit RhoA und kann somit ähnlich wie Myozap über einen gemeinsamen Interaktionspartner nachgeschaltete Signalwege aktivieren. Jedoch ist RND1 nicht von RhoA abhängig und kann auch selbst oder über die Wechselwirkung mit bislang noch unbekanntem, aber am SRF-„Signaling“ beteiligten Proteinen nachgeschaltete Signalwege regulieren.

3.1.12 RND1-Regulation in transgenen Myozap-Mäusen und Myozap-„Knockout“-Mäusen

Nachdem Myozap als Interaktionspartner von RND1 identifiziert werden konnte, wurde die Expression der *Rho-family GTPase 1* auf mRNA-Ebene in transgenen Myozap-Tieren und Myozap-„Knockout“-Mäusen untersucht. Zusätzlich war es uns möglich, die *Rnd1*-Expression in diesen Tieren auch nach transverser aortaler Konstriktion zu detektieren.

Zunächst wurde die *Rnd1*-Genexpression in Wildtyp-Tieren geprüft und diese mit der Expression in transgenen Myozap-Tieren bzw. „Knockout“-Modellen verglichen (Abb. 22A). Während *Rnd1* in den transgenen Mäusen hoch signifikant auf das Dreifache heraufreguliert wurde ($n = 3$, $p < 0,001$), konnte auch in den „Knockout“-Tieren ein deutlicher Anstieg ihrer Expression auf das 1,77-Fache gemessen werden ($n = 3$, $p < 0,01$) (Abb. 22A).

Weiter erbrachte die qRT-PCR-Analyse in Wildtyp-Tieren eine TAC-bedingte signifikante Verdopplung der *Rnd1*-Expression ($n = 3$, $p < 0,01$) (Abb. 22B). Auch in SHAM-behandelten transgenen Mäusen konnten im Vergleich zu den Kontrolltieren (WT - SHAM) ein 2,8-fach erhöhtes *Rnd1*-„Level“ gemessen werden ($n = 3$, $p < 0,001$), welches in TAC-operierten Tieren einen weiteren Anstieg bedingte (TG - TAC: 4,26-fach, $n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 22B). In der Kontrollgruppe (WT - SHAM) der „Knockout“-Mäuse wurde ebenfalls eine Verdopplung des *Rnd1*-Expressionsniveaus durch die transverse aortale Konstriktion ausgelöst ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 22C). SHAM-behandelte Myozap-„Knockout“-Mäuse zeigten, verglichen mit

den scheinoperierten Wildtyp-Tieren, gleichermaßen einen signifikanten Unterschied in der *Rnd1*-Expression (KO - SHAM: 1,75-fach, $n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 22C). Ähnlich zu der Expressionssteigerung in den transgenen TAC-Tieren wurde *Rnd1* auch in den TAC-operierten „Knockout“-Mäusen 3,76-fach ($n = 3$, $p < 0,001$) hochreguliert (Abb. 22C).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass *Rnd1* im Rahmen Hypertrophie-erzeugender Stimuli (hier TAC) vermehrt exprimiert wird. Sowohl in transgenen Myozap-Tieren als auch in den „Knockout“-Mäusen wurde eine hohe *Rnd1*-Expressivität gemessen.

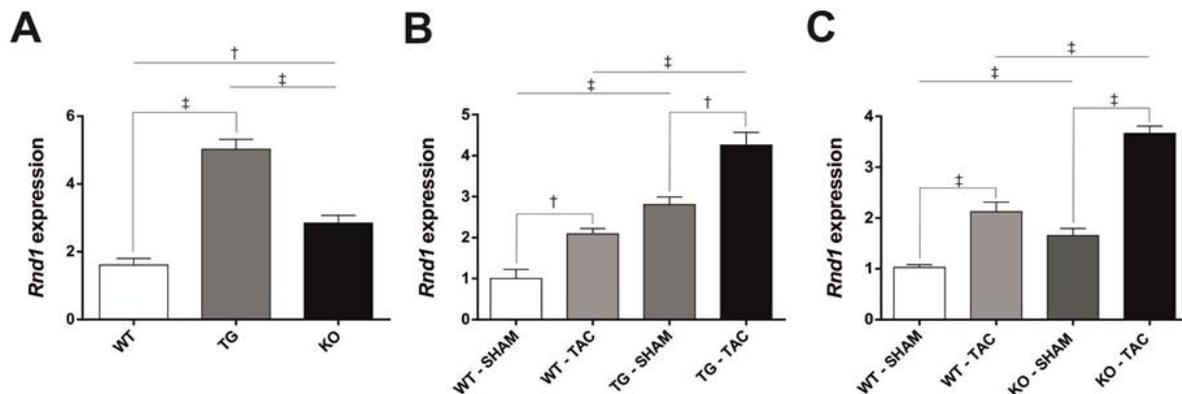


Abbildung 22: RND1-Regulation in transgenen Myozap-Mäusen und Myozap-„Knockout“-Mäusen

A, qRT-PCR-Expressionsanalyse von *Rnd1* in transgenen Myozap-Mäusen und Myozap-„Knockout“-Mäusen. B, C, *Rnd1*-Expressionsanalyse mittels qRT-PCR in SHAM- bzw. TAC-operierten Wildtyp-Tieren, transgenen Myozap-Tieren und „Knockout“-Mäusen. B zeigt die *Rnd1*-Expression in transgenen Mäusen, C die in den „Knockout“-Tieren. $n = 3$. † = $p < 0,01$, ‡ = $p < 0,001$.

3.2 MLF1

Es wurde bereits gezeigt, dass MLF1 in verschiedenen Zelltypen Apoptose induzieren kann und dass das Fehlen von MLF1 im Mausmodell zu einer abgeschwächten Apoptoseprogression führt (Sun *et al.* 2015, Banerjee *et al.* 2017). Weiterhin konnte in Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die adenovirale Überexpression von MLF1 die Proliferationsrate in NRVCs signifikant gesenkt hat (Pott 2017, Rangrez *et al.* 2017). Im Folgenden wurden nun weitere mögliche Einflussgrößen näher untersucht, um die Effekte durch überexprimiertes bzw. herunterreguliertes MLF1 auf Zellebene ausführlich zu charakterisieren.

3.2.1 Dosisfindung der generierten Adenoviren

Analog zur Überprüfung der Funktion von RND1- und miR-RND1-exprimierenden Adenoviren wurden auch die Viren zur Überexpression und zum „Knockdown“ von MLF1 untersucht.

Die „Western Blot“-Analyse zeigte eine ansteigende Expression von MLF1 im Vergleich zur LacZ-Kontrolle um das 1,97-, 2,1- und 2,82-Fache bei 5, 25 und 50 ifu (Abb. 23A, 23B). Die miRNA gegen MLF1 zeigte demgegenüber eine stärkere Herunterregulation der MLF1-Expression bei steigender Viruslast um 50,2 %, 62,4 % und 83,4 % bei 5, 25 und 50 ifu (Abb. 23C, 23D). Die generierten Adenoviren sind in der Lage eine Überexpression und einen „Knockdown“ von MLF1 herbeizuführen. Anhand dieser Analyse wurde für alle folgenden Experimente eine Infektionslast von 50 ifu festgelegt.

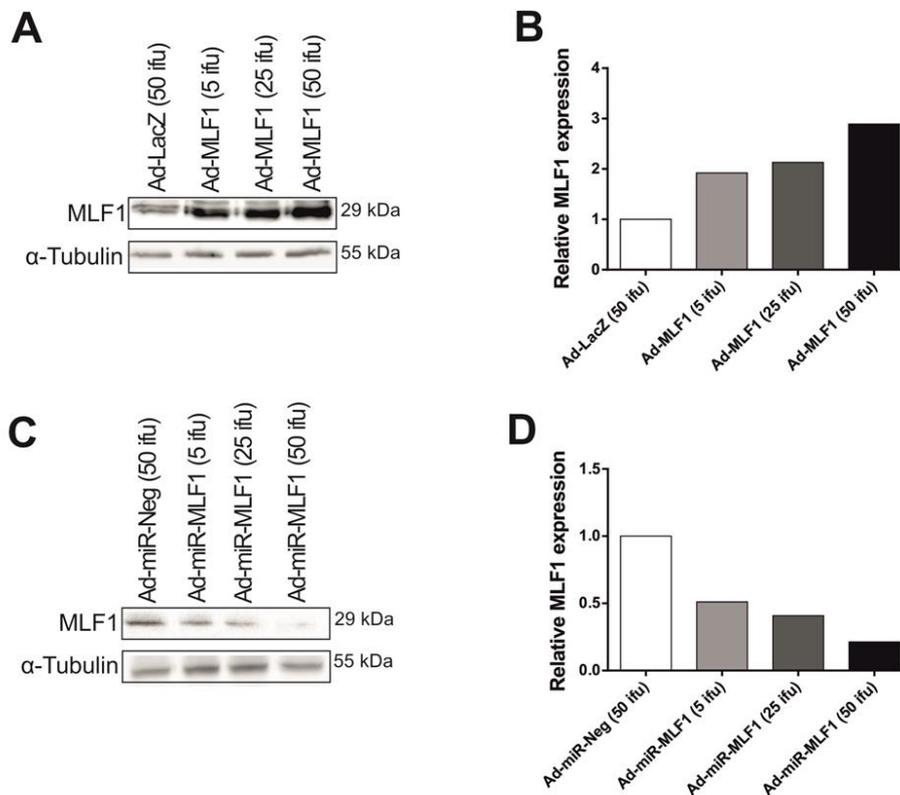


Abbildung 23: Dosiskurven der generierten MLF1-Viren

A, „Western Blot“-Analyse von mit verschiedenen Dosen Ad-LacZ- und Ad-MLF1- infizierten NRVCMS; α-Tubulin dient als Ladekontrolle und zur Berechnung der relativen Densitometrie (B); Anzahl eingesetzter Proben je Bedingung: 1, n = 3. C, „Western Blot“-Analyse steigender Dosen Ad-miR-Neg und Ad-miR-MLF1; α-Tubulin dient als Ladekontrolle und zur Berechnung der relativen Densitometrie (D); Anzahl eingesetzter Proben je Bedingung: 1, n = 3.

3.2.2 MLF1-„Knockdown“ führt zu einer Zellgrößenzunahme

Zur Überprüfung der möglichen Auslösung einer Hypertrophie durch die Herunterregulation von MLF1, erfolgte eine Zellgrößenuntersuchung durch das immunzytologische Anfärben von NRVCMs.

Der Adenovirus-vermittelte „Knockdown“ von MLF1 führte zu einem signifikanten Anstieg der Zellgröße auf $356,5 \mu\text{m}^2$, verglichen mit den Kontrollzellen (miR-Neg), die eine Zellgröße von $310,2 \mu\text{m}^2$ aufwiesen ($p < 0,001$) (Abb. 24A). Durch die zusätzliche Behandlung der NRVCMs mit dem α_1 -adrenergen Agonisten Phenylephrin wurde eine weitere Zunahme der Zelloberfläche provoziert. Während die mit Kontrollvirus (Ad-miR-Neg) behandelten Zellen eine Zellgröße von $361,3 \mu\text{m}^2$ zeigten, führte die Herunterregulation von MLF1 zu einer Größe von $409,6 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,001$) (Abb. 24A, 24D). Analog zu pharmakologisch erzeugtem Stress führte auch der parallel durchgeführte „Stretch“ der Kardiomyozyten zu einer erhöhten Zellgröße. Während 24-stündiger „Stretch“ Ad-miR-Neg-infizierter Zellen eine Größe von $277,8 \mu\text{m}^2$ auslöste, konnte bei Ad-miR-MLF1-infizierten Zelleibern eine Zellgröße von $320,5 \mu\text{m}^2$ detektiert werden ($p < 0,05$) (Abb. 24B, 24E). Nach 48 h-„Stretch“ zeigten die Ad-miR-Neg-behandelten NRVCMs im Vergleich zu den Ad-miR-MLF1-behandelten Zellen keine signifikanten Unterschiede in der Zellgröße (Abb. 24C, 24E).

Herunterreguliertes MLF1 führt in den untersuchten Hypertrophie-Modellen zu einer Zunahme der Zelloberfläche und stellt außerdem einen Induktor der Hypertrophie *in vitro* dar.

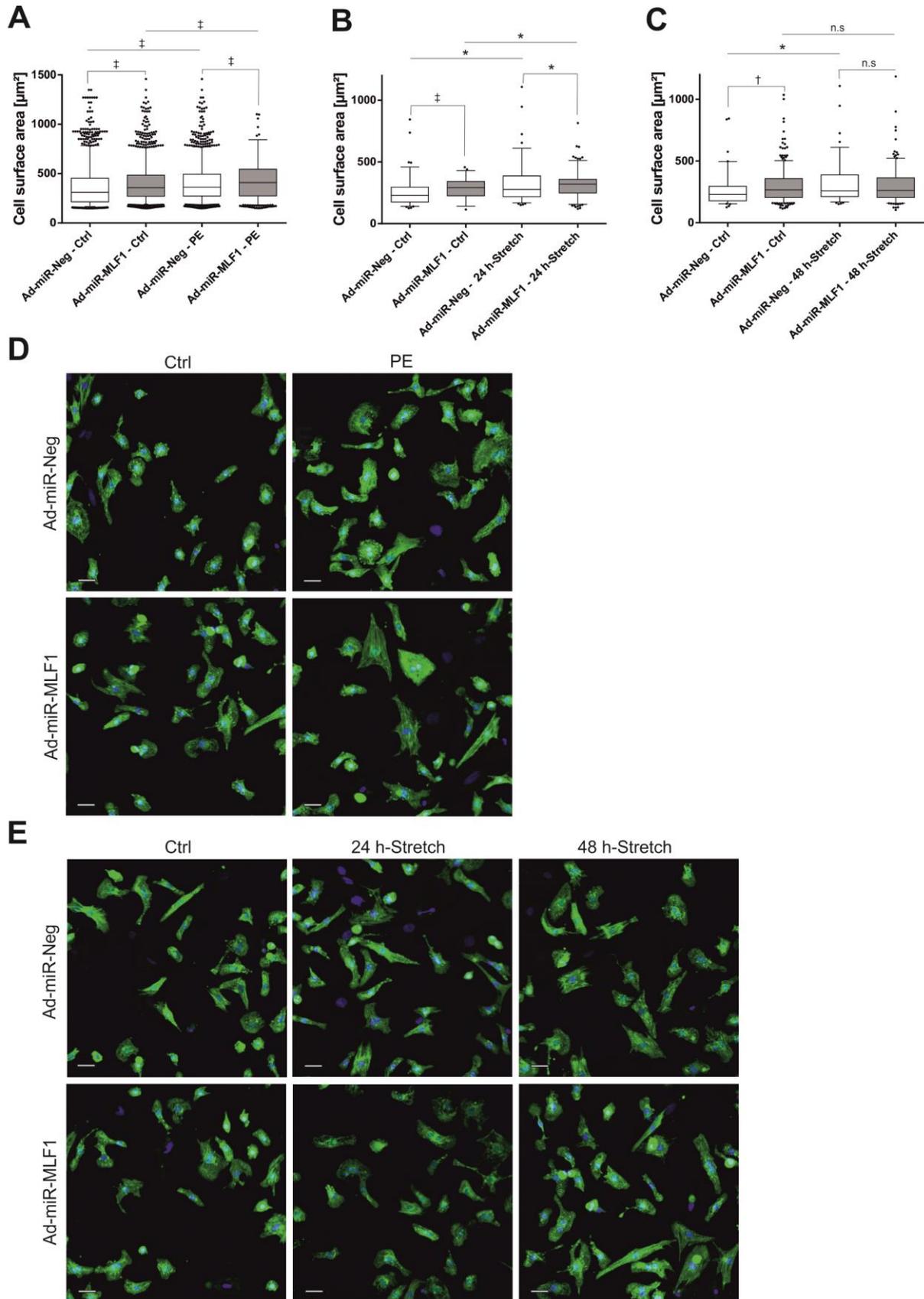


Abbildung 24: MLF1-„Knockdown“ führt zu einer Zellgrößenzunahme

Zellgrößenbestimmung von Phenylephrin-stimulierten (A, 5 µM), 24 h- (B) oder 48 h „gestreckten“ (C) NRVCMs. Gezeigt ist der Median von drei biologischen Replikaten mit jeweiligem Einsatz von mehr

als > 1.500 Zellen pro Bedingung. D, repräsentative Immunfluoreszenz-Analyse von Kontrollzellen (miR-Neg) oder MLF1-herunterregulierenden Zellen, mit oder ohne Phenylephrin-Stimulation. E, repräsentative Immunfluoreszenz-Analyse von Kontrollzellen (miR-Neg) oder MLF1-herunterregulierenden Zellen, welche 24 oder 48 h „gestretcht“ wurden. Blau: DAPI, grün: sarkomeres α -Actinin; Maßstabsbalken: 30 μm (D); 50 μm (E). n.s. = nicht signifikant, * = $p < 0,05$, † = $p < 0,01$, ‡ = $p < 0,001$.

3.2.3 MLF1-„Knockdown“ induziert Hypertrophie-assoziierte fötale Gene und *Rcan1–4*

Um die Effekte herunterregulierten MLF1 auf die Hypertrophie-assoziierten fötalen Gene *Nppa* und *Nppb* und auf den Calcineurin-Regulator *Rcan1-4* zu untersuchen, wurden ihre Expressionsprofile nach Stimulation der NRVCs mit unterschiedlichen hypertrophen Reizen analysiert.

Die Herunterregulation von MLF1 führte zu einer signifikanten Expressionszunahme aller drei Transkripte. *Nppa* wurde 4,75- ($n = 3$, $p < 0,001$), *Nppb* 5,4- ($n = 3$, $p < 0,001$) und *Rcan1-4* 3,72-fach stärker im Vergleich zu den Ad-miR-Neg-behandelten Zellen exprimiert ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 25A, 25B, 25C). Die Stimulation der Kardiomyozyten mit Phenylephrin bewirkte in den mit Kontrollvirus (Ad-miR-Neg) infizierten Zellen eine 7,24- ($n = 3$, $p < 0,001$) und in MLF1-herunterregulierenden Zellen eine gegenüber den nicht stimulierten Ad-miR-Neg-behandelten Zellen 10,61-fach gesteigerte *Nppa*-Expression ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 25A). *Nppb* wurde ebenfalls nach PE-Behandlung von Ad-miR-Neg-infizierten Zellen 7,4- ($n = 3$, $p < 0,001$) und von MLF1-herunterregulierenden NRVCs 10,23-fach stärker exprimiert ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 25B). Auch die *Rcan1-4*-Expression zeigte nach PE-Stimulation und MLF1-„Knockdown“ eine vermehrte Hochregulation im Vergleich zu den mit Kontrollvirus-behandelten Zellen (Ad-miR-Neg: 2,09-fach, $n = 3$, $p < 0,01$); Ad-miR-MLF1: 5,78-fach, $n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 25C).

Neben dem hypertrophen Effekt durch Phenylephrin konnte auch das mechanische „Stretchen“ sowohl für die mit Kontrollvirus (Ad-miR-Neg) als auch für die mit miR-MLF1-Virus behandelten Zellen eine signifikante Hochregulation der Transkripte *Nppa*, *Nppb* und *Rcan1-4* ausgelöst werden. Dennoch führte die Herunterregulation von MLF1 zu einem verstärkten Anstieg dieser Genexpressionen. So konnte nach MLF1-„Knockdown“ und 24-stündigem „Stretch“ eine im Vergleich zu den „gestretchten“ und Ad-miR-Neg-infizierten Zellen um 167,32 % gesteigerte *Nppa*-Expression ($n = 3$, $p < 0,001$), eine um 36,21 % gesteigerte *Nppb*-Expression ($n = 3$, $p < 0,05$) und ein um 67,66 % erhöhter *Rcan1-4*-Spiegel gemessen werden ($n = 3$, $p < 0,05$) (Abb. 25D, 25E, 25F). Auch nach 48 h-„Stretch“ wurden

signifikante Expressionsunterschiede der untersuchten Gene festgestellt. Während bei den mit Kontrollvirus (Ad-miR-Neg) behandelten Zellen ein 2,21-facher Anstieg der *Nppa*-Expression ausgelöst werden konnte ($n = 3$, $p < 0,01$), wurde bei MLF1-herunterregulierenden Zellen ein 4,61-facher Anstieg gegenüber den nicht stimulierten Ad-miR-Neg-behandelten Zellen gemessen ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 25D). Die ebenfalls durchgeführte Expressionsanalyse von *Nppb* führte nach 48 h-„Stretch“ von Ad-miR-Neg-infizierten Zellen zu einer 2,19- ($n = 3$, $p < 0,001$) und von Ad-miR-MLF1-infizierten NRVCs zu einer 4,2-fach stärkeren Genexpression gegenüber den „ungestreckten“ Kontrollzellen ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 25E). Auch für *Rcan1-4* konnte eine ähnliche Expressionssteigerung beobachtet werden (Ad-miR-Neg: 2,07-fach, $n = 3$, $p < 0,01$; Ad-miR-MLF1: 4,61-fach, $n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 25F).

Die Herunterregulation von MLF1 führt sowohl mit als auch ohne die zusätzliche Behandlung von NRVCs mit Phenylephrin bzw. mechanischem „Stretch“ zu einer Hochregulation der Transkripte *Nppa*, *Nppb* und *Rcan1-4*.

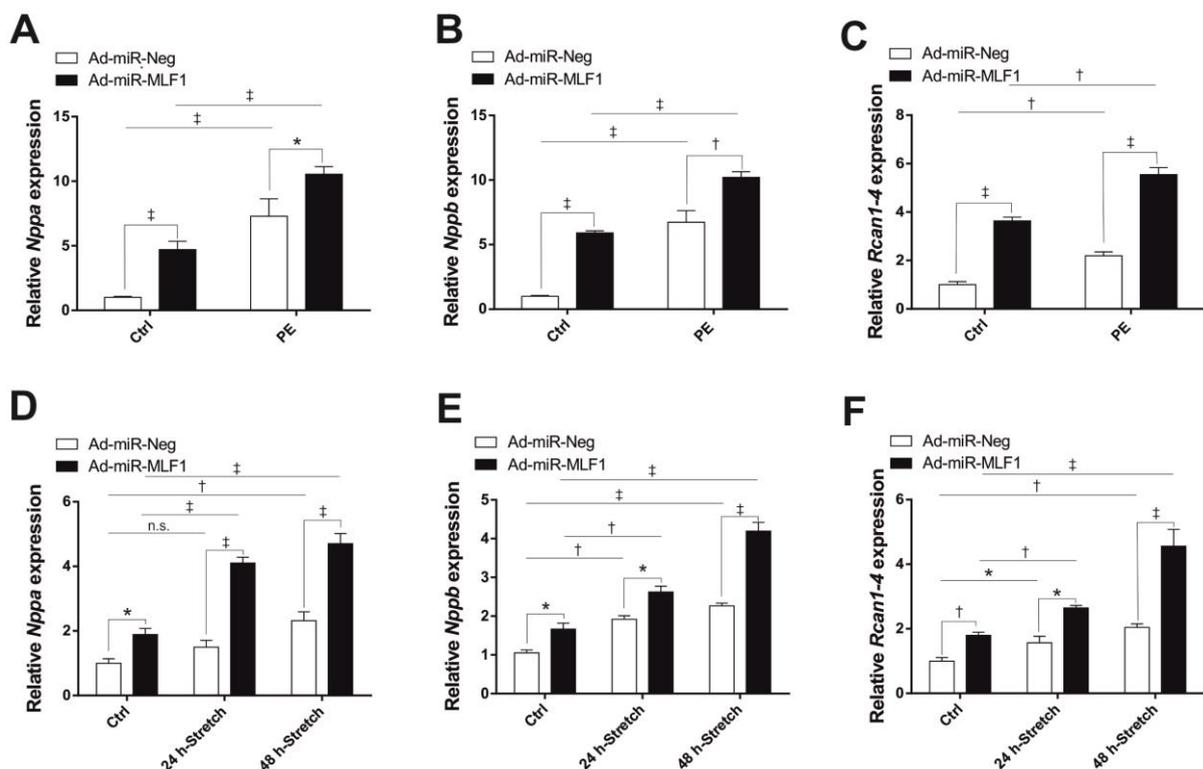


Abbildung 25: MLF1-„Knockdown“ induziert Hypertrophie-assoziierte fötale Gene und *Rcan1-4*
 qRT-PCR-Expressionsanalyse der fötalen Gene *Nppa* (A, D), *Nppb* (B, E) und des Calcineurin-Regulators *Rcan1-4* (C, F) nach Infektion der NRVCs mit miR-Neg- bzw. miR-MLF1-exprimierendem Adenovirus und Behandlung der Zellen mit PE oder 24 h- bzw. 48 h-„Stretch“. $n = 3$. n.s. = nicht signifikant, * = $p < 0,05$, † = $p < 0,01$, ‡ = $p < 0,001$.

3.2.4 MLF1 beeinflusst Apoptose- & Proliferationsvorgänge in Kardiomyozyten

Nachdem in dieser Arbeit der prohypertrophe Effekt durch den MLF1-„Knockdown“ dargestellt werden konnte, folgten Analysen der potenziellen Induzierbarkeit von Apoptose- und Proliferationsvorgängen in NRVCs nach Infektion mit hoch- bzw. herunterreguliertem MLF1 *via* adenoviraler Konstrukte zur Überexpression bzw. synthetischer microRNA-Konstrukte zum „Knockdown“.

Die Zellebensfähigkeit wurde zum einen mittels Propidiumiodid-Färbung und zum anderen durch den Einsatz von MTT-„Assays“ genauer untersucht. Die Überexpression von MLF1 führte zu einer deutlichen Induktion der Apoptose, was sich in einer erhöhten Anzahl von PI-positiven Zellen widerspiegelte. Ad-LacZ-infizierte Zellen führten zu 11,9 %, Ad-MLF1-behandelte NRVCs zu 20,1 % PI-positiven Zellen ($n = 3$, $p < 0,05$) (Abb. 26A, 26B). Umgekehrt bewirkte der MLF1-„Knockdown“ eine verminderte Anzahl abgestorbener Zellen. Während Ad-miR-Neg-infizierte Zellen zu 12,3 % PI-positiven Zellen führten, konnten nach Herunterregulation von MLF1 6,3 % positive Zellen ermittelt werden ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 26C, 26D).

Im Gegensatz zum PI-„Assay“ wurde mithilfe des MTT-„Assays“ das Zellüberleben nach Überexpression bzw. „Knockdown“ von MLF1 detektiert. Die adenovirale Überexpression bewirkte eine signifikante Abnahme lebender Zellen bei steigender Viruslast auf 84,8 % ($n = 3$, $p < 0,001$) und 75,3 % ($n = 3$, $p < 0,001$) bei 50 und 200 ifu (Abb. 26E). Der MLF1-„Knockdown“ lieferte gegenteilige Ergebnisse. Durch die Herunterregulation wurde eine Zunahme lebender Zellen bei steigender Viruslast von 106,9 % ($n = 3$, n.s.) und 121,1 % ($n = 3$, $p < 0,01$) bei 50 und 200 ifu gemessen (Abb. 26F).

In einem nächsten Versuchsschritt sollte der Einfluss von MLF1 auf die Anzahl binukleärer Zellen ermittelt werden. Die Menge der zweikernigen, terminal differenzierten Zellen war umgekehrt proportional zur MLF1-Expression. Verglichen mit LacZ-überexprimierenden Zellen, die 11,7 % binukleäre Zellen aufwiesen, konnten nach MLF1-Überexpression 14,5 % zweikernige Zelleiber detektiert werden ($n = 3$, $p < 0,05$) (Abb. 26G). Umgekehrt führte der MLF1-„Knockdown“ mit 13,7 % binukleären Zellen zu weniger terminal differenzierten Zellkörpern im Vergleich zu den mit Kontrollvirus (Ad-miR-Neg) behandelten Zellen, die 16,9 % zweikernige Zelleiber aufwiesen ($n = 3$, $p < 0,05$) (Abb. 26H).

Überexprimiertes MLF1 führt zu einem verstärkten Zellsterben und umgekehrt zu einem reduzierten Zellüberleben. Diese antiproliferative Wirkung zeigt sich ebenfalls in einer verstärkten Induktion von zweikernigen, terminal differenzierten Zellen. Auf der anderen Seite schwächt der MLF1-„Knockdown“ das Zellsterben, führt zu einer Zunahme lebender Zellen und zu einer verminderten Anzahl binukleärer Zellkörper.

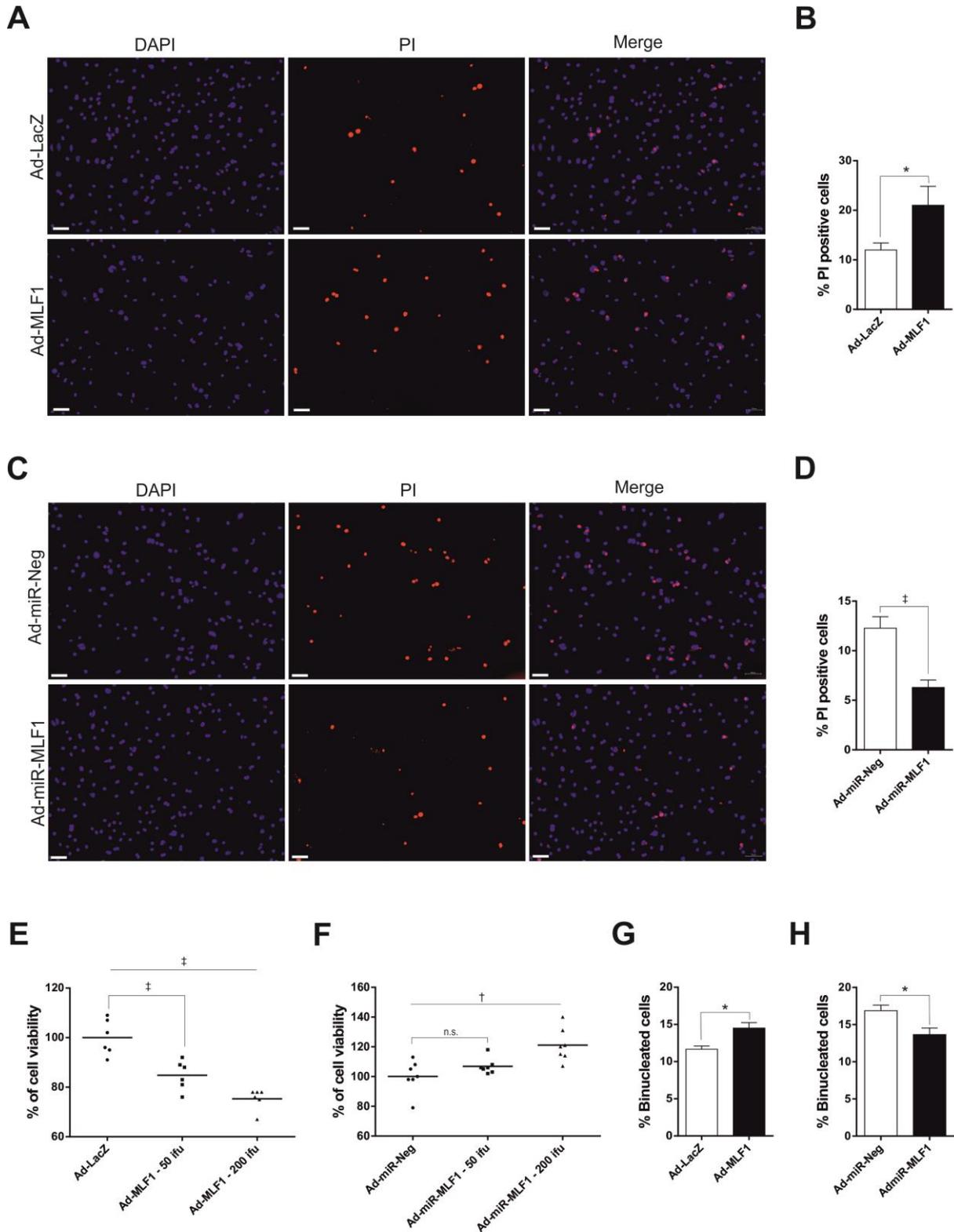


Abbildung 26: MLF1 moduliert Apoptose und Differenzierung von Kardiomyozyten

A, B, repräsentative Immunfluoreszenz-Analyse von PI-positiven Zellen nach Behandlung der NRVCMs mit Kontrollvirus (Ad-LacZ) oder MLF1-überexprimierendem Adenovirus. C, D, repräsentative Immunfluoreszenz-Analyse von PI-positiven Zellen nach Behandlung der NRVCMs mit Kontrollvirus (Ad-miR-Neg) oder MLF1-herunterregulierendem Adenovirus. Blau: DAPI, rot: PI; Maßstabsbalken: 50 µm. E, Analyse der Zellviabilität mittels MTT-„Assay“ von mit Ad-LacZ bzw. Ad-

MLF1 infizierten NRVCMS. F, Analyse der Zellviabilität mittels MTT-„Assay“ von mit Ad-miR-Neg bzw. Ad-miR-MLF1 behandelten Zellen. G, Ermittlung der Anzahl zweikerniger Kardiomyozyten nach MLF1-Überexpression. H, Ermittlung der Anzahl zweikerniger Kardiomyozyten nach MLF1-„Knockdown“. n = 3. n.s. = nicht signifikant, * = $p < 0,05$, † = $p < 0,01$, ‡ = $p < 0,001$.

Die Überexpression von MLF1 führte mit 70,8 % Zellviabilität zu einer deutlichen Induktion der Apoptose gegenüber den mit Kontrollvirus (Ad-LacZ) behandelten Zellen, deren ermittelter Lebendzellanteil auf 100 % festgelegt wurde ($n = 3$, $p < 0,001$), und bedingte eine Verstärkung der proapoptotischen Effekte durch den Apoptoseinduktor Cisplatin (Abb. 27A). So zeigten die mit Kontrollvirus und Cisplatin behandelten Zellen ein Zellüberleben von 61,94 %, während bei den MLF1-überexprimierenden Zellen bei zusätzlicher Cisplatin-Stimulation eine Viabilität von 51,82 % ermittelt werden konnte ($n = 3$, $p < 0,01$) (Abb. 27A). Der „Knockdown“ von MLF1 dagegen resultierte in einer signifikanten Steigerung der Zellviabilität. Die ermittelte Zellviabilität der mit Ad-miR-Neg infizierten Zellen wurde auf 100 % festgelegt und die mit Ad-miR-MLF1 infizierten NRVCMS zeigten demgegenüber eine Viabilität von 118,1 % ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 27B). Auch bei zusätzlicher Behandlung der Zellen mit Cisplatin konnte mit 79,49 % eine höhere Zellaktivität gegenüber der Kontrollzellen (miR-Neg), bei denen eine Zellviabilität von 54,9 % ermittelt wurde, detektiert und die Apoptose-induzierende Wirkung des Cisplatin damit abgeschwächt werden ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 27B).

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde die Zellzahl von MLF1-überexprimierenden bzw. -herunterregulierenden Kardiomyozyten beobachtet. Die mit Kontrollvirus (Ad-LacZ) infizierten Zellen zeigten eine signifikante Reduktion der Zellzahl in Gegenwart von Cisplatin und bestätigten damit dessen proapoptotischen Effekt ($n = 3$, $p < 0,05$) (Abb. 27C). Während die mit MLF1-Adenovirus behandelten NRVCMS nun diese Zellreduktion weiter verstärkten, resultierte der MLF1-„Knockdown“ in einem nicht signifikanten, aber deutlich erkennbaren Trend zu einer erhöhten Zellzahl (Abb. 27C, 27D). Allerdings wurde der Effekt in Anwesenheit von Cisplatin nicht weiter verdeutlicht und die Wirkung von Cisplatin schien aufgehoben (Abb. 27D).

Während hohe MLF1-Expressivität antiproliferativ und proapoptotisch wirkt, erweisen sich geringe MLF1-Niveaus in kultivierten Kardiomyozyten als protektiv gegenüber dem programmierten Zelltod.

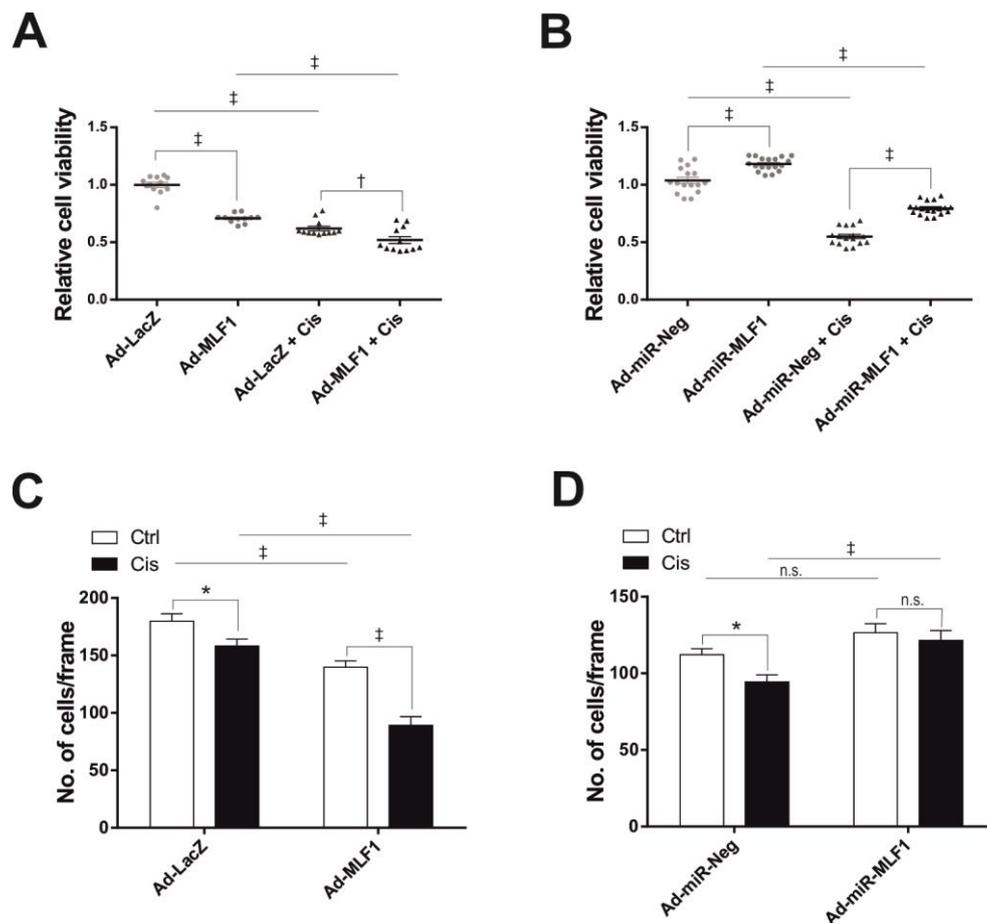


Abbildung 27: MLF1 induziert Apoptose in Kardiomyozyten

A, Analyse der Zellviabilität mittels MTT-„Assay“ von mit Ad-LacZ bzw. Ad-MLF1 infizierten NRVCMs, mit und ohne die zusätzliche Behandlung mit Cisplatin. B, Analyse der Zellviabilität mittels MTT-„Assay“ von mit Ad-miR-Neg bzw. Ad-miR-MLF1 infizierten NRVCMs, mit und ohne die zusätzliche Behandlung mit Cisplatin. C, Zellzahl-Bestimmung nach Infektion mit Kontrollvirus (Ad-LacZ) bzw. Ad-MLF1, mit und ohne Cisplatin-Stimulation. D, Ermittlung der Zellzahl von mit miR-Neg-exprimierendem Adenovirus oder nach Infektion mit miR-MLF1-exprimierendem Virus, mit und ohne Cisplatin-Stimulation. n = 3. n.s. = nicht signifikant, * = $p < 0,05$, † = $p < 0,01$, ‡ = $p < 0,001$.

3.2.5 MLF1 induziert Apoptose in NRVCMs durch Induktion von Caspase 3, Caspase 7 und PARP

Um die der durch MLF1 ausgelösten Apoptoseinduktion zugrunde liegenden Ursachen zu ergründen, wurden anschließend die Expressionen von Caspase 3, Caspase 7 und PARP untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expressionen von „cleaved“ Caspase 3, „cleaved“ Caspase 7 und „cleaved“ PARP signifikant ansteigen, wenn MLF1 adenoviral überexprimiert

wird. So stieg die Expression der „cleaved“ Caspase 3 im Vergleich zu den Ad-LacZ-infizierten Zellen auf das 2,2-Fache ($n = 3$, $p < 0,05$), die „cleaved“ Caspase 7 wurde nach MLF1-Überexpression 2-fach stärker exprimiert ($n = 3$, $p < 0,05$) und das Expressionsniveau der „cleaved“ PARP stieg um das 2,75-Fache ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 28C, 28F, 28I). Bei Anwesenheit von Phenylephrin erfolgte eine zusätzliche Hochregulation der beiden Caspasen und der Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1. Verglichen mit den LacZ-überexprimierenden NRVCMs wurde nach MLF1-Überexpression und gleichzeitiger PE-Stimulation die „cleaved“ Caspase 3 6,23- ($n = 3$, $p < 0,001$), „cleaved“ Caspase 7 3,76- ($n = 3$, $p < 0,001$) und die „cleaved“ PARP 3,77-fach stärker exprimiert ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 28C, 28F, 28I).

Überexprimiertes MLF1 führt zur Induktion von am Apoptosegeschehen beteiligten Faktoren. Zusätzlich lässt sich diese Hochregulation durch Phenylephrin weiter verstärken.

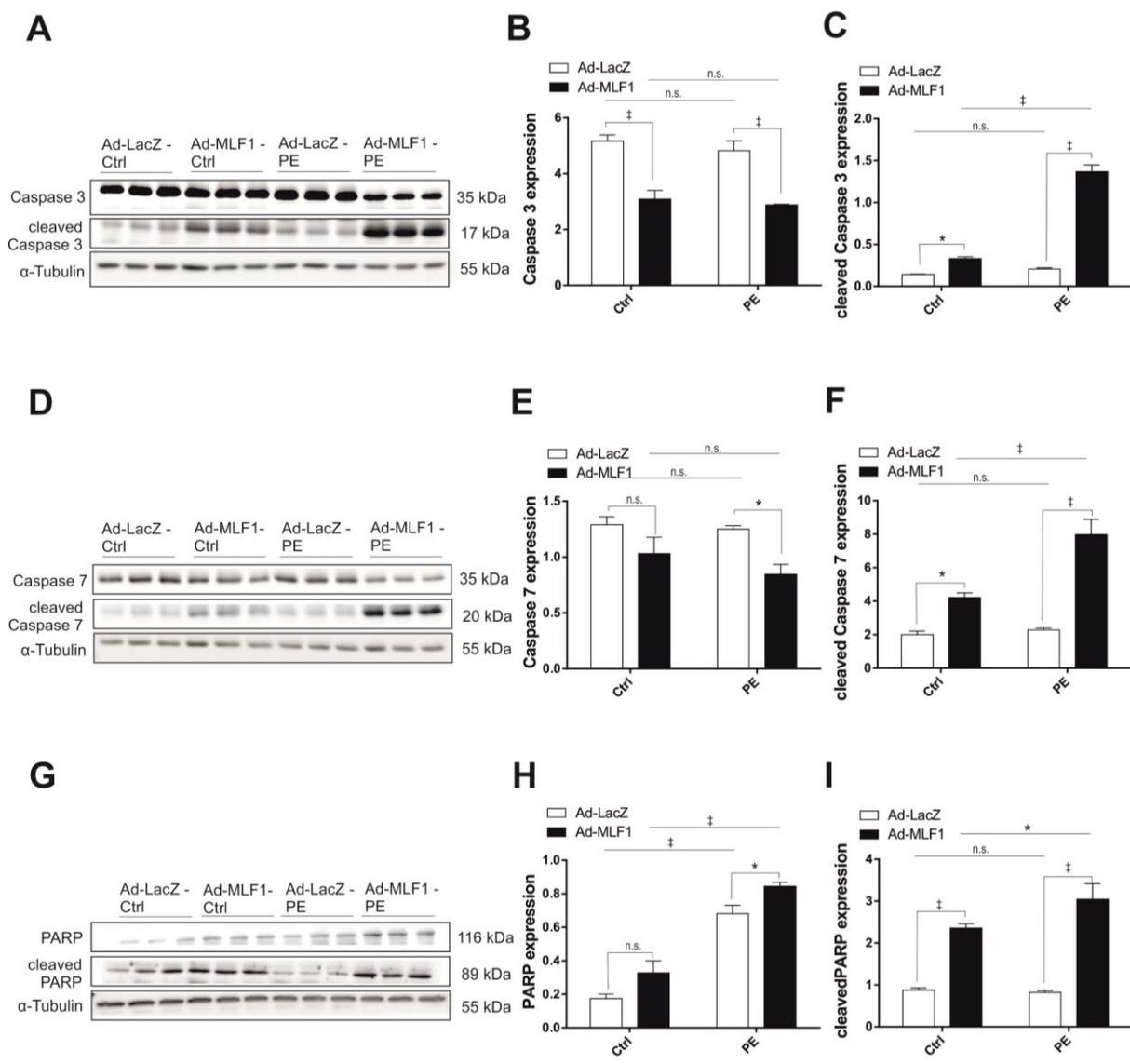


Abbildung 28: MLF1 induziert Apoptose in NRVCMs durch Induktion von Caspase 3, Caspase 7 und PARP

„Western Blot“-Analysen von mit LacZ- oder MLF1-exprimierendem Adenovirus behandelten NRVCMs, mit oder ohne die zusätzliche Stimulation durch Phenylephrin. Gezeigt sind die Expressionsanalysen von Caspase 3/„cleaved“ Caspase 3 (A-C), von Caspase 7/„cleaved“ Caspase 7 (D-F) und von PARP/„cleaved“ PARP (G-I); α -Tubulin dient als Ladekontrolle und zur Berechnung der relativen Densitometrie. $n = 3$. n.s. = nicht signifikant, * = $p < 0,05$, † = $p < 0,01$, ‡ = $p < 0,001$.

Nachdem die Apoptoseinduktion durch MLF1 verdeutlicht werden konnte, wurde anschließend der Effekt von miR-MLF1-exprimierendem Adenovirus mit und ohne die gleichzeitige Behandlung mit Cisplatin untersucht. Auch hier wurde die Aktivierung von Caspase 3 auf Proteinebene analysiert. Die Expression der „cleaved“ Caspase 3 war in Gegenwart von Cisplatin sowohl bei den Ad-miR-Neg-infizierten Zellen (6,18-fach, $n = 3$, $p < 0,001$) als auch bei den Zellen mit herunterreguliertem MLF1-Niveau im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen signifikant gestiegen (5,72-fach, $n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 29C). Dennoch führte der MLF1-„Knockdown“ zu einer 29,1 %-igen Abschwächung Cisplatin-induzierter proapoptotischer Effekte ($n = 3$, $p < 0,01$) (Abb. 29C).

Geringe MLF1-Spiegel wirken protektiv im Apoptose-induzierenden Modell.

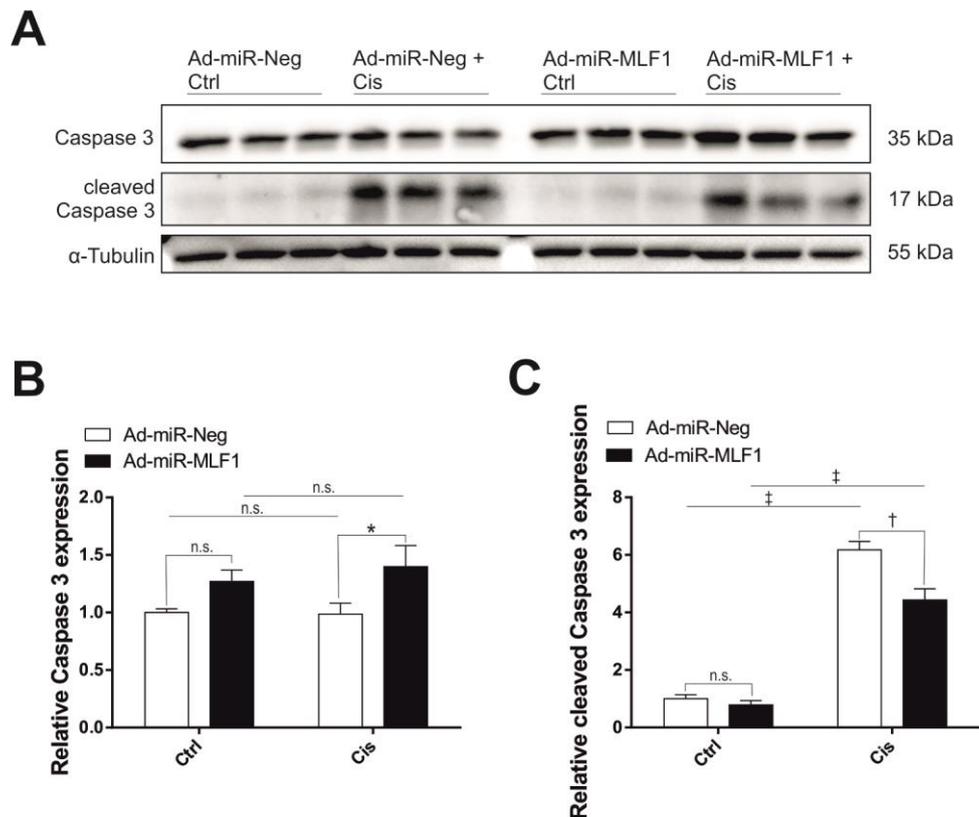


Abbildung 29: Niedrige MLF1-Spiegel wirken protektiv gegenüber Apoptose

A, „Western Blot“-Analyse von mit miR-Neg- und miR-MLF1-exprimierendem Adenovirus infizierten NRVCMs, mit oder ohne die zusätzliche Cisplatin-Stimulation; α -Tubulin dient als Ladekontrolle und zur Berechnung der relativen Densitometrie. B zeigt die Expressionsanalyse der Caspase 3. C zeigt

die Expressionsanalyse der „cleaved“ Caspase 3. n = 3. n.s. = nicht signifikant, * = $p < 0,05$, † = $p < 0,01$, ‡ = $p < 0,001$.

3.2.6 Niedrige MLF1-Proteinexpression induziert Zellproliferation über die Aktivierung von D-Cyclinen und die Modulation von p53

Um zum einen die Induktion der Zellproliferation durch herunterreguliertes MLF1 und zum anderen die durch hohe MLF1-Expressionsniveaus ausgelöste Hemmung der Proliferation zu verstehen, wurde der Einfluss der jeweiligen MLF1-Proteinexpression auf die Aktivität der D-Cycline und des p53 näher untersucht.

Analog zu dem Effekt auf die Zellproliferation waren bei MLF1-Überexpression signifikant niedrigere Spiegel von Cyclin D1 (Abnahme um 31 %, n = 3, $p < 0,05$) und D3 (Abnahme um 25 %, n = 3, $p < 0,001$) nachweisbar, während die Expression von Cyclin D2 lediglich einen Trend zur Herabregulation zeigte (Abb. 30A-D). Umgekehrt kam es durch den MLF1-„Knockdown“ zu einer deutlichen Zunahme der Cyclin D2- und Cyclin D3-Expression. Für Cyclin D2 konnte eine 1,53-fach (n = 3, $p < 0,01$) und für Cyclin D3 eine 1,61-fach stärkere Expression ermittelt werden (n = 3, $p < 0,001$) (Abb. 30E, 30G, 30H). Das Cyclin D1-„Level“ zeigte dagegen eine zwar nicht signifikante, aber dennoch erkennbare Tendenz der Hochregulation (Abb. 30F).

Zusätzlich ist es gelungen, die durch MLF1 induzierte Regulation der p53-Expression, dessen hemmender Einfluss auf die Cycline und auf die Aktivierung von Caspasen schon seit Längerem bekannt ist, herauszuarbeiten. Die MLF1-Überexpression führte nachweislich zu einer im Vergleich zu den Ad-LacZ-infizierten NRVCMS 1,51-fach gesteigerten Expression von p53 (n = 3, $p < 0,05$) (Abb. 30I, 30J). Umgekehrt konnte nach MLF1-Herunterregulation eine gegenüber den mit Kontrollvirus (Ad-miR-Neg) behandelten Zellen um 21 % verminderte p53-Expression verifiziert werden (n = 3, $p < 0,05$) (Abb. 30K, 30L).

Zusammengenommen moduliert MLF1 die Zellproliferation durch Induktion bzw. Inhibition von p53 und D-Cyclinen.

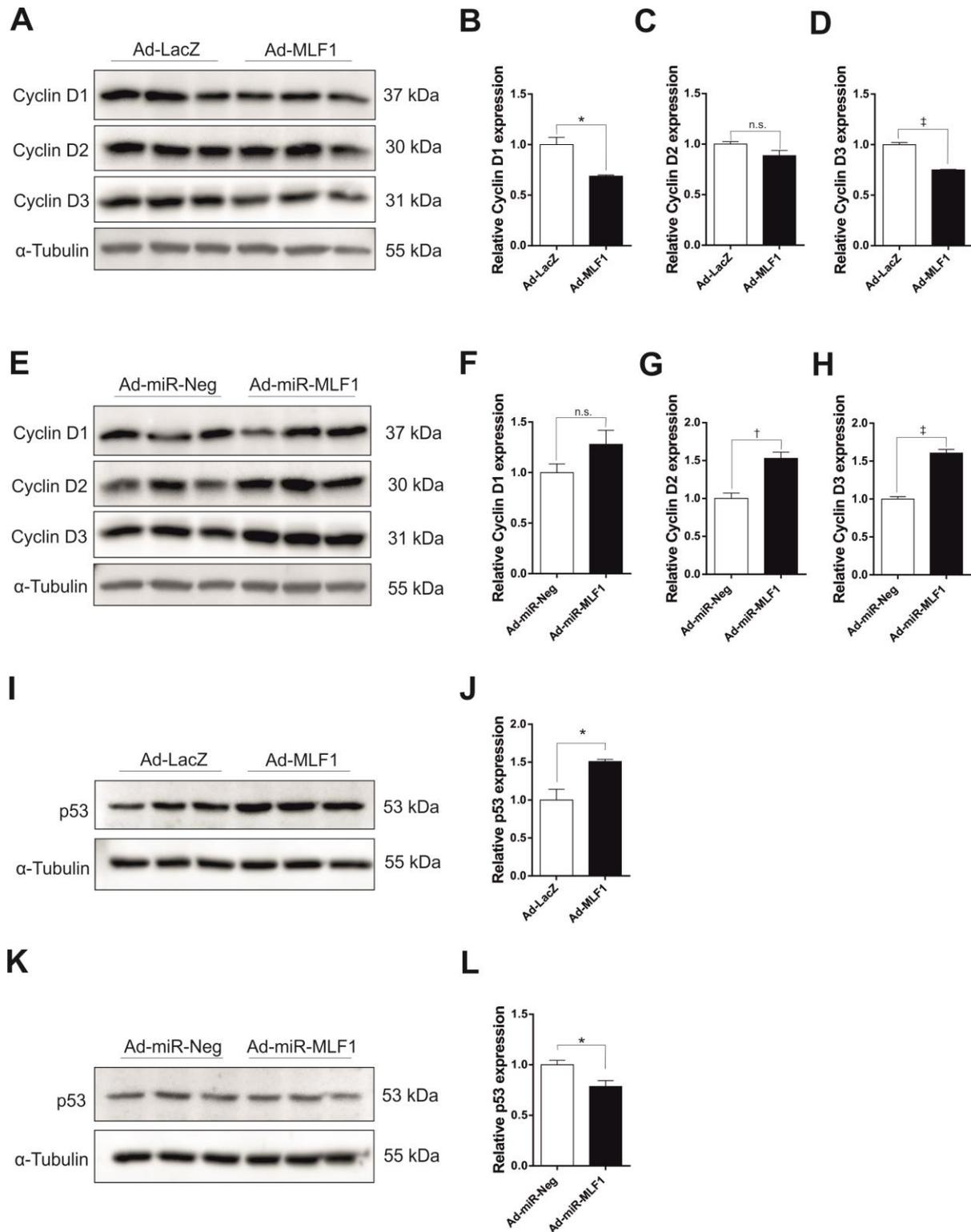


Abbildung 30: MLF1 reguliert die Proliferation von Kardiomyozyten

A, „Western Blot“-Analyse der Expressionen von Cyclin D1 (B), Cyclin D2 (C) und Cyclin D3 (D) nach Infektion der Kardiomyozyten mit LacZ- bzw. MLF1-exprimierendem Adenovirus; α -Tubulin dient als Ladekontrolle und zur Berechnung der relativen Densitometrie. E, „Western Blot“-Analyse der Expressionen von Cyclin D1 (F), Cyclin D2 (G) und Cyclin D3 (H) nach Infektion der Kardiomyozyten mit miR-Neg- bzw. miR-MLF1-exprimierendem Adenovirus; α -Tubulin wurde als Ladekontrolle und zur

Berechnung der relativen Densitometrie eingesetzt. I, J, „Western Blot“-Analyse der p53-Expression von Ad-LacZ- bzw. Ad-MLF1-infizierten NRVCs; α -Tubulin wurde als Ladekontrolle und zur Berechnung der relativen Densitometrie eingesetzt. K, L, „Western Blot“-Analyse der p53-Expression von Ad-miR-Neg- bzw. Ad-miR-MLF1-infizierten NRVCs; Ladekontrolle und Gegenstand der relativen Densitometrie war α -Tubulin. n = 3. n.s. = nicht signifikant, * = p < 0,05, † = p < 0,01, ‡ = p < 0,001.

Um die Beeinflussung der Ad-miR-MLF1-vermittelten Aktivierung von Cyclin D3 durch mechanische Belastung zu untersuchen, wurden „Western Blot“-Analysen nach biomechanischem „Stretch“ durchgeführt.

Der MLF1-„Knockdown“ führte im Vergleich zu den Ad-miR-Neg-behandelten Zellen zu einer Verdopplung der Cyclin D3-Expression (n = 3, p < 0,001) (Abb. 31B). Das Durchführen des 48 h-„Stretch“ resultierte in einer abgeschwächten Expressionszunahme in mit miR-MLF1-Adenovirus behandelten Zellen. Während also ohne „Stretch“ durch den MLF1-„Knockdown“ eine verglichen mit den „ungestreckten“ Kontrollzellen 2,06-fach stärkere Cyclin D3-Expression festgestellt wurde, war diese nach 48-stündigem „Stretch“ nur 1,59-fach stärker (n = 3, p < 0,001) (Abb. 31B).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die biomechanische Dehnung von Kardiomyozyten die Proteinexpression von p53 um die Hälfte senkt, während die MLF1-Überexpression seine Expression nahezu unabhängig vom mechanischem Reiz erhöhte (ohne „Stretch“: 1,76-fach, n = 3, p < 0,01; mit „Stretch“: 1,52-fach, n = 3, p < 0,01) (Abb. 31D). Der MLF1-„Knockdown“ reduzierte entsprechend der in Abb. 30 gezeigten Ergebnisse die Expression von p53, während mechanischer „Stretch“ diesen inhibitorischen Effekt weiter verstärkte. So führte die Herunterregulation von MLF1 verglichen mit der p53-Proteinexpression der nicht „gestreckten“ Kontrollzellen zu einer um 54 % (n = 3, p < 0,01) und der zusätzlich durchgeführte „Stretch“ zu einer um 88 % verminderten p53-Expression gegenüber den nicht „gestreckten“ Kontrollzellen (n = 3, p < 0,001) (Abb. 31E, 31F).

Mechanische Dehnung von NRVCs senkt die p53-Expression und wirkt sich positiv auf die Zellproliferation aus. Bei gleichzeitig vorliegendem MLF1-„Knockdown“ wurde dieser die Proliferation stimulierende Effekt zusätzlich gesteigert.

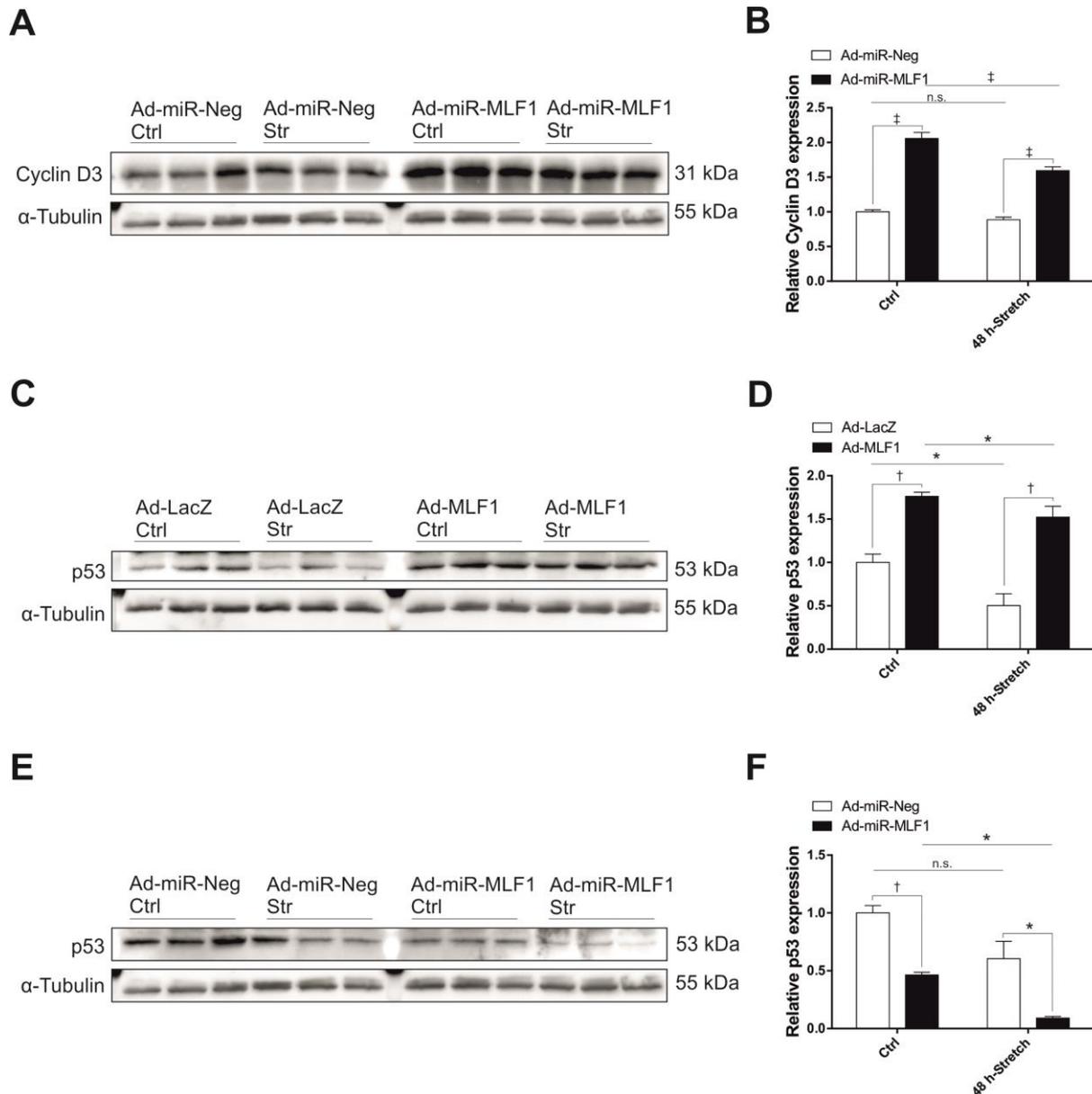


Abbildung 31: Biomechanischer „Stretch“ und geringe MLF1-Spiegel verstärken die Zellzyklus-Aktivität

A, B, „Western Blot“-Analyse der Cyclin D3-Expression von mit Ad-miR-Neg bzw. Ad-miR-MLF1 infizierten NRVCMs, mit und ohne 48 h-„Stretch“; α -Tubulin dient als Ladekontrolle und zur Berechnung der relativen Densitometrie. C, D, „Western Blot“-Analyse der p53-Expression von mit Ad-LacZ bzw. Ad-MLF1 infizierten NRVCMs, mit und ohne 48 h-„Stretch“; α -Tubulin wurde als Ladekontrolle und zur Berechnung der relativen Densitometrie eingesetzt. E, F, „Western Blot“-Analyse der p53-Expression von mit Ad-miR-Neg bzw. Ad-miR-MLF1 infizierten NRVCMs, mit und ohne 48 h-„Stretch“; auch hier dient α -Tubulin als Ladekontrolle und der Berechnung der relativen Densitometrie. n = 3. n.s. = nicht signifikant, * = $p < 0,05$, † = $p < 0,01$, ‡ = $p < 0,001$.

3.2.7 MLF1-„Knockdown“ reduziert Hypoxie-induzierte Apoptose

Da die Herabregulation von MLF1 die Apoptosevorgänge in neonatalen Rattenkardiomyozyten signifikant inhibierte, wurde in anknüpfenden Versuchen die pathophysiologische Relevanz durch Induktion von Hypoxie untersucht.

Die MLF1-Überexpression führte zu einer signifikant verminderten Zellviabilität sowohl unter Normoxie- als auch unter Hypoxiebedingungen (Normoxie: Abnahme um 20,41 %, $n = 3$, $p < 0,001$; Hypoxie: Abnahme um 35,2 %, $n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 32A). Auf der anderen Seite schwächte der MLF1-„Knockdown“ die proapoptotische Wirkung der Hypoxie auf die Zellproliferation ab und führte verglichen mit Ad-miR-Neg-behandelten NRVCMs unter Normoxiebedingungen zu einer 2,17- ($n = 3$, $p < 0,001$) und unter Hypoxie zu 1,3-fach stärkeren Zellviabilität ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 32B). Entsprechend der Ergebnisse aus den MTT-„Assays“ konnte auch eine durch MLF1-Überexpression bedingte signifikante Zunahme der apoptotischen Zellen verifiziert werden, die durch Hypoxie weiter erhöht wurde. Unter normalen Bedingungen wurden unter den mit Kontrollvirus (Ad-LacZ) behandelten Zellen 16,3 % und unter den MLF1-überexprimierenden Zellen 30,41 % PI-positive Zellen ermittelt ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 32C). Das Kultivieren der NRVCMs unter Hypoxie führte bei den Ad-LacZ-behandelten Zellen zu 22,88 % und bei MLF1-Überexpression zu 37,59 % PI-Positivität ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 32C). Umgekehrt reduzierte der MLF1-„Knockdown“ signifikant die Anzahl der PI-positiven Zellen sowohl unter üblichen als auch unter hypoxischen Bedingungen. So wurden unter Normoxie unter den mit Kontrollvirus (Ad-LacZ) behandelten Zellen 21,9 % und unter den MLF1-überexprimierenden Zellen 14,8 % PI-positive Zellen ermittelt ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 32C). Hypoxische Bedingungen induzierten bei den Kontrollzellen (miR-Neg) 32,3 % und bei den MLF1-herunterregulierenden Zellen 19,49 % PI-positive Zellen ($n = 3$, $p < 0,001$) (Abb. 32D).

MLF1 verstärkt den durch die Hypoxie ausgelösten proapoptotischen Effekt. Umgekehrt werden die Auswirkungen dieses Apoptose-induzierenden Modells durch den „Knockdown“ von MLF1 abgeschwächt.

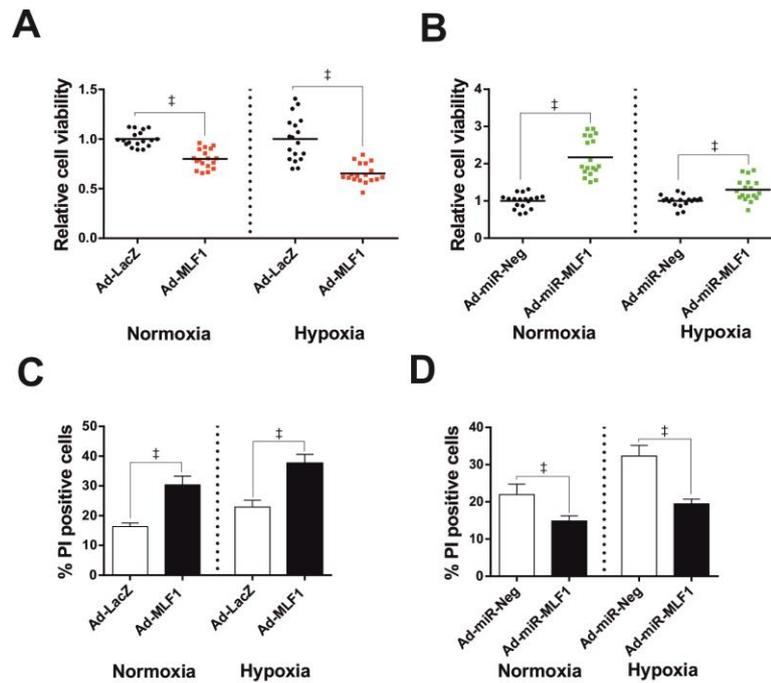


Abbildung 32: MLF1-„Knockdown“ reduziert Hypoxie-induzierte Apoptose

A, Analyse der Zellviabilität mittels MTT-„Assay“ von mit Ad-LacZ bzw. Ad-MLF1 infizierten NRVCs, mit bzw. ohne die Kultivierung bei hypoxischen Bedingungen. B, Analyse der Zellviabilität mittels MTT-„Assay“ von mit Ad-miR-Neg bzw. Ad-miR-MLF1 behandelten NRVCs, unter Normoxie- und Hypoxiebedingungen. C, Analyse von PI-positiven Zellen nach Behandlung der NRVCs mit Kontrollvirus (Ad-LacZ) oder MLF1-überexprimierendem Adenovirus, mit bzw. ohne die Kultivierung bei hypoxischen Bedingungen. D, Analyse von PI-positiven Zellen nach Behandlung der NRVCs mit Kontrollvirus (Ad-miR-Neg) oder MLF1-herunterregulierendem Adenovirus, mit und ohne das Kultivieren unter Hypoxiebedingungen. $n = 3$. ‡ = $p < 0,001$.

Anknüpfend wurde nun der Effekt von MLF1 unter Hypoxiebedingungen auf die Expression der D-Cycline näher betrachtet. Dazu wurden NRVCs mit Adenoviren zur Überexpression bzw. zum „Knockdown“ von MLF1 infiziert und ein Teil der Zellen für 3 h bei hypoxischer Luftzusammensetzung inkubiert.

Nach Inkubation bei üblicher Luftzusammensetzung (5 % CO_2 , 95 % atmosphärische Luft) war bei gleichzeitig vorliegender MLF1-Überexpression eine signifikante Abnahme der Cyclin D2- und D3-Expression zu beobachten. So konnte für Cyclin D2 eine 42 %-ige ($n = 3$, $p < 0,05$) und für Cyclin D3 eine 29 %-ige Expressionsabnahme ermittelt werden ($n = 3$, $p < 0,05$) (Abb. 33H, 33N). Die Cyclin D1-Aktivität zeigte eine zwar nicht signifikante, aber dennoch erkennbare Regression (Abb. 33B). Unter Hypoxiebedingungen war diese verminderte Cyclin-Expression dagegen nicht mehr nachzuweisen (Abb. 33E, 33K, 33Q).

Umgekehrt konnte nach Herunterregulation von MLF1 und unter Normoxiebedingungen eine signifikante Zunahme der Cyclin D2-Expression auf das 1,79-Fache ($n = 3$, $p < 0,05$) und ein Anstieg der Cyclin D3-Expression auf das 1,33-Fache beobachtet werden ($n = 3$, $p < 0,001$)

(Abb. 33I, 33O), während die Cyclin D1-Aktivität keine signifikante Veränderung lieferte (Abb. 33C). Die der Hypoxie ausgesetzten Zellen führten demgegenüber zu entgegengesetzten Ergebnissen. Die Cyclin D1-Expression zeigte eine deutliche Abnahme bei gleichzeitig vorliegendem MLF1-„Knockdown“ (Abnahme um 47 %, $n = 3$, $p < 0,01$) (Abb. 33F). Demgegenüber konnten die Cyclin D2- und D3-Spiegel nicht wesentlich beeinflusst werden (Abb. 33L, 33R).

Eine hohe MLF1-Proteinexpression bewirkt bei Inkubation der Zellen bei üblicher Luftzusammensetzung eine Abnahme der Cyclin D-Expressionen. Unter Hypoxiebedingungen führt überexprimiertes MLF1 dagegen zu keiner signifikanten Veränderung der Cyclin-Aktivität. Umgekehrt induziert der MLF1-„Knockdown“ unter Normoxiebedingungen eine Zunahme der Cyclin D-Expressivität. Das Kultivieren der Zellen unter hypoxischen Bedingungen führt ebenfalls zu keinen einheitlichen Veränderungen der Cycline.

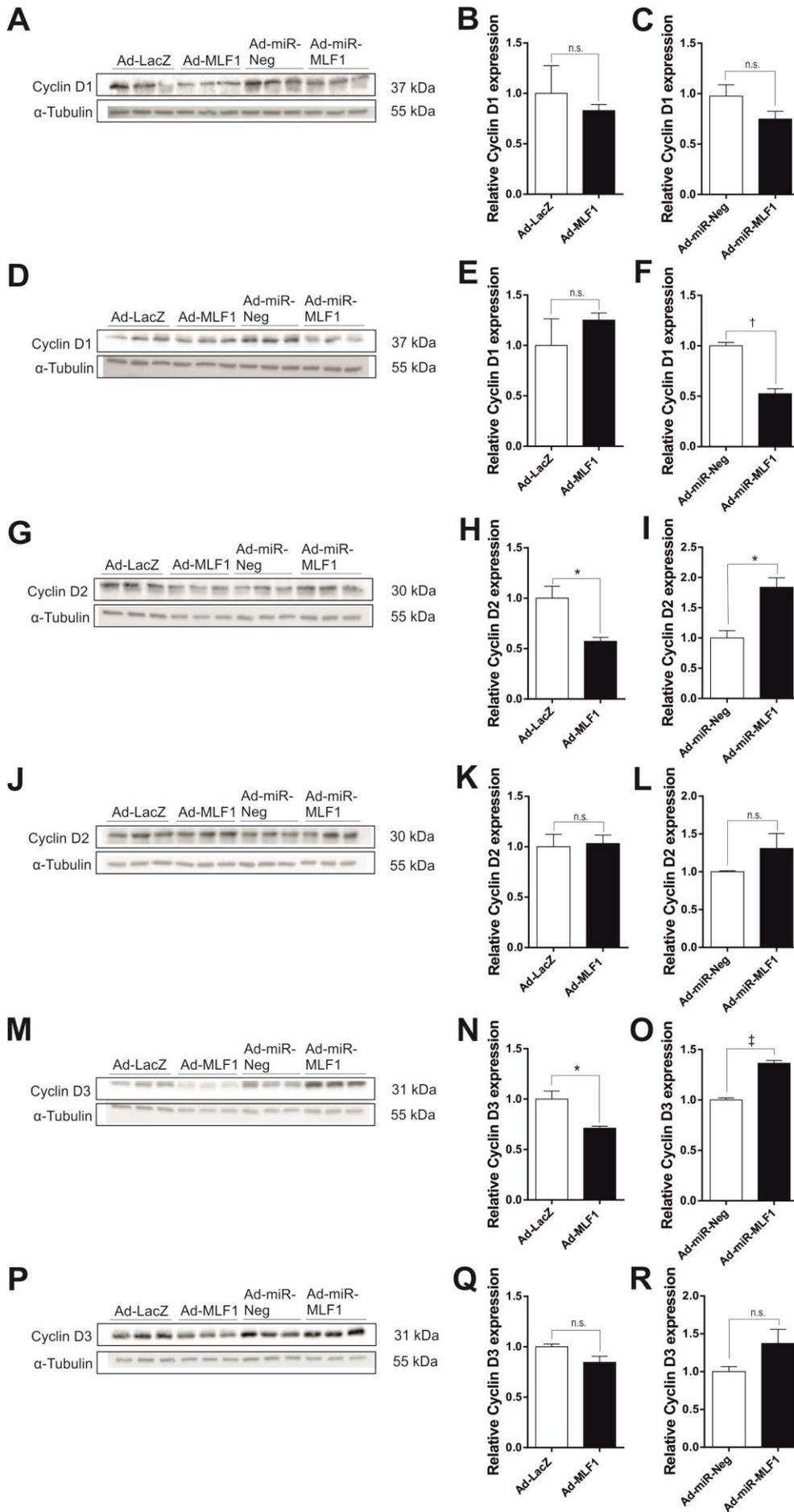


Abbildung 33: MLF1-„Knockdown“ schwächt Hypoxie-induzierte Apoptosevorgänge über die Aktivierung von D-Cyclinen

A-C, „Western Blot“-Analyse der Cyclin D1-Expression von mit Ad-LacZ, Ad-MLF1, Ad-miR-Neg oder Ad-miR-MLF1 infizierten NRVCs bei Inkubation der Zellen mit üblicher Luftzusammensetzung (5 % CO₂, 95 % atmosphärische Luft). D-F, „Western Blot“-Analyse der Cyclin D1-Expression von mit Ad-LacZ, Ad-MLF1, Ad-miR-Neg oder Ad-miR-MLF1 infizierten NRVCs bei Inkubation der Zellen unter Hypoxiebedingungen (5 % CO₂, 94 % N₂, 1 % atmosphärische Luft). G-I, „Western Blot“-Analyse der Cyclin D2-Expression von mit Ad-LacZ, Ad-MLF1, Ad-miR-Neg oder Ad-miR-MLF1 infizierten NRVCs bei Inkubation der Zellen mit üblicher Luftzusammensetzung. J-L, „Western Blot“-Analyse der Cyclin D2-Expression von mit Ad-LacZ, Ad-MLF1, Ad-miR-Neg oder Ad-miR-MLF1 infizierten NRVCs bei Inkubation der Zellen unter Hypoxiebedingungen. M-O, „Western Blot“-Analyse der Cyclin D3-Expression von mit Ad-LacZ, Ad-MLF1, Ad-miR-Neg oder Ad-miR-MLF1 infizierten NRVCs bei Inkubation der Zellen mit üblicher Luftzusammensetzung. P-R, „Western Blot“-Analyse der Cyclin D3-Expression von mit Ad-LacZ, Ad-MLF1, Ad-miR-Neg oder Ad-miR-MLF1 infizierten NRVCs bei Inkubation der Zellen unter Hypoxiebedingungen. α -Tubulin wurde bei allen abgebildeten „Western Blots“ als Ladekontrolle und zur Berechnung der relativen Densitometrie eingesetzt. n = 3. n.s. = nicht signifikant, * = p<0.05, † = p<0.01, ‡ = p<0.001.

4 Diskussion

Myokardhypertrophie und das zugrunde liegende kardiale „Remodeling“ können sich aufgrund einer Vielzahl von Krankheitsbildern entwickeln. Dazu zählen mitunter die arterielle Hypertonie, Herzklappenfehler und der Herzinfarkt. Sie erhöhen das Risiko, an Herzinsuffizienz zu erkranken oder an einem kardiovaskulären Ereignis zu versterben. Die beteiligten Umbauprozesse der Herzmuskulatur stellen damit einen zentralen Risikofaktor für die kardiale Morbidität und Mortalität dar und stehen dadurch im Fokus der internationalen Wissenschaft.

Ziel dieser Arbeit war es, bereits neu identifizierte Bestandteile der Mechanotransduktion in Kardiomyozyten zu untersuchen und deren kardiale Funktionen zu analysieren. Mit RND1 und MLF1 ist dies gelungen. Die erarbeiteten Ergebnisse machen die beiden Proteine zu interessanten Zielstrukturen der laufenden Forschung und können als potenzielle therapeutische Angriffspunkte gesehen werden.

4.1 Auslösung kardialer Hypertrophie

Das „Stretchen“ von Kardiomyozyten *in vitro* wurde in der vorgelegten Arbeit genutzt, um die dynamischen mechanischen Belastungen eines schlagenden Herzens nachzuahmen (Koch *et al.* 2017, Rangrez *et al.* 2017). Auf diese Weise sollte versucht werden, molekulare Signalwege und zugrunde liegende Mechanismen, die für die kardialen Umbauvorgänge verantwortlich sind, aufzudecken.

Im Gegensatz zu den *in vivo*-Konditionen liegen die kultivierten Kardiomyozyten zufällig angeordnet auf der Membran und zeigen wenige Zell-Zellkontakte. Ventrikuläre Kardiomyozyten liegen im Myokard in einer charakteristischen stabförmigen Morphologie vor und bilden zusammen mit der kollagenen Extrazellulär-Matrix eine faserartige Architektur (Gopalan *et al.* 2003). Sowohl die Zellform und ihre Ausrichtung als auch die Zell-Matrix-Adhäsion und die Zell-Zellkontakte stellen wesentliche Determinanten des Zellwachstums und der -differenzierung dar (Gopalan *et al.* 2003). Dieser Umstand erklärt die zunächst beobachtete verminderte Zellgröße der kultivierten Myozyten und ihre, zusätzlich zu der ohnehin schon limitierten Lebensdauer von primären, terminal differenzierten Zellen, reduzierte Überlebensdauer auf den speziellen Silikon-Membranen.

Durch das „Stretchen“ konnte gezeigt werden, dass unter biomechanischem Stress die Protein-Syntheseraten und die Myofibrillogenese angekurbelt, Hypertrophie induziert und

das Gap junction-Protein Connexin 43 vermehrt exprimiert wird (Sadoshima *et al.* 1993a, Simpson 1999, Zhuang *et al.* 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde analog dazu gezeigt, dass die Proteinexpressionen von RND1 und Myozap nach „Stretch“ hochreguliert werden und die Zellgröße der NRVCs durch mechanischen Stress zunimmt. Außerdem ist eine insgesamt vermehrte Genexpression beschrieben worden und bei zu stark ausgeprägtem „Stretch“ kommt es zur Einleitung zellulärer Apoptosevorgänge (Komuro *et al.* 1991, Cheng *et al.* 1995). Auch dies konnten wir mit einer ansteigenden p53-Proteinexpression nach 48 h-„Stretch“ detektieren. Neben der Modulation von „immediate-early“ Genen wie *c-Fos*, *c-Myc* oder *Egr1* (engl. early growth response 1) werden auch am fötalen Genprogramm beteiligte Gene wie *Nppa*, skelettales α -Actinin oder β -Mhc bei biomechanischem „Stretch“ vermehrt exprimiert (Sadoshima *et al.* 1992, Gopalan *et al.* 2003). Diese Induktion von Genen konnten wir anhand der Analyse von *Nppa*, *Nppb* und *Rcan1-4* ebenfalls aufzeigen und damit die genannten Beobachtungen bestätigen. Mechanische Signale werden folglich auf zellulärer Ebene in biomechanische Antworten umgewandelt, die bis hin zu transkriptionellen Veränderungen führen können. Eine zentrale Rolle nehmen hierbei die Z-Scheibe und ihre benachbarten Strukturen ein (Knöll *et al.* 2002, Epstein *et al.* 2003, Frank *et al.* 2011, Knöll 2015). Dazu zählen neben mechanosensitiven Ionenkanälen oder Rezeptor/Tyrosin-Kinasen wie MAPK zum Beispiel die Integrine, die als Transmembranproteine wesentlich zur Vermittlung biomechanischen Stresses beitragen (Knöll *et al.* 2003, Frank *et al.* 2011). Ebenfalls an der Mechanotransduktion beteiligt ist der Angiotensin 1-Rezeptor (At₁R) (Frey *et al.* 2003, Russell *et al.* 2010, Balakumar *et al.* 2014, Knöll 2015). Es konnte gezeigt werden, dass der At₁R auch unabhängig von Angiotensin II durch mechanischen Reiz aktiviert wird (Zou *et al.* 2004). Folglich bestehen mehrere Signalwege der Übertragung äußerer Stimuli auf den kontraktile Apparat der Zelle (Frank *et al.* 2011).

Der zelluläre Reiz in Form einer passiven Dehnung gelangt über ein Netzwerk aus Aktin und Myosin zur Z-Scheibe (Russell *et al.* 2010). Von der Z-Scheibe wird die mechanische Dehnung auf Titin übertragen (Knöll *et al.* 2013). Dieses Protein ist als zellulärer Stress-, aber auch Längensensor beschrieben worden und interagiert mit Telethonin, welches unter Komplexbildung mit MLP ebenfalls intrazelluläre Mechanotransduktion vermittelt (Knöll *et al.* 2002, Pinotsis *et al.* 2006, Knöll 2015). Herunterreguliertes MLP führt soweit, dass BNP und ANP durch Dehnung nicht mehr induziert werden können, und Kong beschreibt das Muscle LIM protein als regulatorische Größe im Rahmen der Kariomyozyten-Differenzierung (Kong *et al.* 1997).

Weiterhin an der Mechanotransduktion beteiligt ist der Calcineurin/NFAT-Signalweg (Frank *et al.* 2011). Die Aktivierung des Calcineurins bewirkt über die Dephosphorylierung von NFAT dessen nukleäre Translokation und somit die Induktion prohypertropher Gene (Becher 2006). Diese Signalkaskade wird durch die Bindung von Calmodulin, einen erhöhten Ca²⁺-

Spiegel, aber auch durch die Stimulation des Angiotensin II-Rezeptors und Calcineurin 1 aktiviert (Becher 2006, Frank *et al.* 2011). Übermäßig gesteigerte Aktivität oder der Funktionsverlust einzelner Komponenten der sarkomeren Z-Scheibe gelten als Ursache diverser kardialer Krankheiten einschließlich dilatativer, aber auch hypertropher Kardiomyopathien (Knöll *et al.* 2002, Bos *et al.* 2010, Knöll *et al.* 2010, Frank *et al.* 2011, Knöll 2015, Kimura 2016).

Der α_1 -Adrenorezeptor-Agonist Phenylephrin führt ähnlich wie biomechanischer „Stretch“ zur Induktion von „immediate-early“ Genen, die vor allem in der Frühphase der beginnenden Hypertrophie vermehrt gebildet werden (Simpson 1985, Moalic *et al.* 1989). Außerdem ist ein Anstieg der Sarkomer-Einheiten, der Zellgröße und Proteinsynthese beschrieben worden (Lee *et al.* 1988). Diese Veränderungen konnten ebenfalls in Versuchen der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Phenylephrin führte sowohl zu einer Zunahme der Zellgröße als auch zu einer Induktion der fötalen Gene *Nppa* und *Nppb* sowie zu einer Expressionssteigerung von *Rcan1-4*, was für eine Aktivierung der Hypertrophie-vermittelnden Signalwege spricht.

Auf der anderen Seite ermöglicht die transverse aortale Konstriktion *in vivo* die Induktion kardialer Hypertrophie. Durch diese experimentelle aortale Stenosierung greifen zunächst autoregulative Mechanismen wie der Frank-Starling-Mechanismus oder die Aktivierung des Sympathikus, die der Adaption der Erhaltung des Herzminutenvolumens dienen (Thews *et al.* 1991, Bittig 2005, Huppelsberg *et al.* 2005, Thews *et al.* 2005).

Die beschriebenen autoregulativen Mechanismen spiegeln die ausgelöste Stresssituation und führen zu den in der vorliegenden Arbeit gemessenen Veränderungen der *Rnd1*-Expression nach erfolgter TAC-Operation. Die nachgewiesene Hochregulation von *Rnd1* im Hypertrophie-Modell bestätigt die ermittelten Daten von Pott, der bereits eine Induktion von *Rnd1* nach PE-Stimulation, „Stretch“ und *in vivo* durch TAC beobachtet hat (Pott 2017).

Die kardiale Belastung geht zunächst mit einer adaptiven Herzhypertrophie und anfangs verbesserter Kontraktilität des Ventrikels einher (Nakamura *et al.* 2001). Diese funktionale Verbesserung nimmt mit der Entwicklung einer konzentrischen Hypertrophie weiter zu (Bittig 2005). Allerdings kommt es durch die persistierende Druckbelastung mit der Zeit zu immer stärker werdenden kontraktile Funktionseinbußen des Herzens, die in einer systolischen und diastolischen Dysfunktion münden (Liao *et al.* 2002). Im Laufe der Zeit bildet sich schließlich eine mechanisch bedingte Herzinsuffizienz aus (Forth *et al.* 2013).

So wurde in dieser Arbeit sowohl die biomechanisch als auch die humoral ausgelöste Hypertrophie induziert, um den Einfluss und die pathophysiologische Relevanz von RND1 und MLF1 in diesen Modellen herauszuarbeiten.

4.2 Ermittlung des Einflusses auf Zellproliferation und Apoptose

Um einen möglichen Effekt von RND1 auf den Zellzyklus zu detektieren, wurden die Proliferationsmarker Ki67 und PHH3 eingesetzt. Beide Biomarker sind vor allem in der Krebsforschung etabliert und ermöglichen dort die Abgrenzung zu entartetem Gewebe (Nasr *et al.* 2008). Während Ki67 in den G₁-, S-, G₂- und M-Phasen messbar ist, handelt es sich bei PHH3 genau genommen um einen Mitosemarker, da phosphoryliertes Histon H3 nahezu ausschließlich im Rahmen der späten G₂- und M-Phase exprimiert wird (Hendzel *et al.* 1997, Scholzen *et al.* 2000, Nielsen *et al.* 2013). Analog dazu konnten wir zeigen, dass deutlich mehr Ki67-positive als PHH3-positive Zelleiber vorlagen. Sämtliche Studien setzten die erwähnten Marker in immunhistochemischen Untersuchungen ein, um eine prognostische Aussage bezüglich der Proliferationsaktivität unterschiedlichster Gewebe treffen zu können (Determann 2009). Auch wir konnten trotz der geringen Überlebensdauer terminal differenzierter Kardiomyozyten proliferative Zellen detektieren.

Muralidhar *et al.* eruierte in einem Tiermodell, dass der MLF1-„Knockout“ zu einer verstärkten Proliferation von Kardiomyozyten auch über die physiologischen sieben Tage *post partum* hinaus führt (Muralidhar *et al.* 2014). Wir konnten ebenfalls zeigen, dass die Überexpression von MLF1 hemmenden Einfluss auf den Zellzyklus nimmt und der „Knockdown“ von MLF1 die Zellzyklus-Aktivität ankurbelt. Dazu wurden die Expressionen der Effektor-Caspasen 3 und 7, PARP, p53 und die der D-Cycline auf Proteinebene näher untersucht.

Die Analyse des quantitativen Vorkommens von Cyclin D1, D2 und D3 wurde in der vorgelegten Arbeit eingesetzt, um Hinweise auf die Zellzyklusaktivität behandelter Kardiomyozyten zu erhalten und Rückschlüsse auf mögliche Einflussgrößen zu ziehen. Die an der Regulation des Zellzyklus beteiligten Cyclin-abhängigen Kinasen erreichen ihre enzymatische Aktivität erst durch die Bindung eines geeigneten Cyclins als regulatorische Untereinheit (Dreyer-Schmitt 2009). In jeder Zellzyklusphase werden nur charakteristische Cyline exprimiert, wohingegen die Expression der CDKs keinen Zyklus-abhängigen Schwankungen unterliegt und ihre Konzentrationen nahezu konstant bleiben (Dreyer-Schmitt 2009). Die D-Cycline stellen die regulatorischen Untereinheiten der CDK4 und CDK6 dar, deren Aktivitäten für den G1/S-Übergang erforderlich sind (Sherr 1996). Ziel der sich bildenden Komplexe ist unter anderem die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins, die wiederum zur Freisetzung des E2F-Transkriptionsfaktors führt und dadurch die Genexpression der G1/S-Phase aktiviert (Lukas *et al.* 1996). Mutationen, Amplifikationen oder die Überexpression der Cycline bewirken eine Progression des Zellzyklus und werden häufig zusammen mit diversen Tumorgeschehen beobachtet (Hu *et al.* 2014). Hier konnten

wir zeigen, dass niedrige MLF1-Spiegel die D-Cycline induzieren und den Zellzyklus ankurbeln. Umgekehrt führte die MLF1-Überexpression zu entgegengesetzten Ergebnissen.

Die Aktivierung von p53 ist auf DNA-Schäden oder andere genomische Aberrationen zurückzuführen und kann entweder zu Zellzyklusarrest und anknüpfender DNA-Reparatur oder aber zum programmierten Zelltod führen (Levine 1997). Kommt es zu einem Nukleinsäure-Schaden in der Zelle, wird die Phosphorylierung von p53 an den Aminosäuren Ser15 und Ser20 induziert und eine verminderte Interaktion mit dem Onkoprotein MDM2 (engl. mouse double minute 2) bewirkt (Shieh *et al.* 1997). Aktiviertes MDM2 löst die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von p53 aus (Honda *et al.* 1997, Chehab *et al.* 1999). Weiterhin können die Checkpoint-Kinasen 1 und 2 Ser20 des p53 phosphorylieren und so dessen Stabilisierung und Aktivität verbessern (Shieh *et al.* 1999, Hirao *et al.* 2000). Die genannten Beispiele stellen nur einen geringen Anteil der möglichen Signalwege dar, die zu einer Steigerung der p53-Aktivität führen können. Als eine weitere Modulationsmöglichkeit von p53 konnten wir zeigen, dass die p53-Proteinexpression auch eine durch MLF1 regulierbare Größe darstellt. Zu dieser Erkenntnis sind auch Banerjee *et al.* gekommen, die MLF1 als indirekten Modulator der Apoptose durch Beeinflussung der p53-Aggregationsbildung beschreiben (Banerjee *et al.* 2017).

Die Aktivierung der Caspasen ist ein wesentlicher Schritt bei der Vollziehung der Apoptose und erfolgt über proteolytische Schritte (Crowley *et al.* 2016, Pan *et al.* 2016). Die dabei entstehenden Spaltprodukte stellen die aktive Form der Caspasen dar (Crowley *et al.* 2016). Caspase 3 ist ein 35 kDa großes inaktives Proenzym und wird in die beiden aktiven Untereinheiten von 17 kDa und 12 kDa gespalten. In unserer Arbeit wurde die aktivierte 17 kDa-Untereinheit untersucht und eine Expressionssteigerung durch überexprimiertes MLF1 und eine abgeschwächte Aktivität nach MLF1-„Knockdown“ beobachtet. Die Expression der ebenfalls untersuchten Caspase 7 wurde sowohl in ihrem inaktiven (35 kDa) als auch in ihrem aktivierten Zustand (20 kDa) detektiert. Auch hier löste MLF1 vergleichbare Änderungen der aktivierten Caspase 7 aus. Die nukleäre Poly(ADP-ribose)-Polymerase, kurz PARP, ist ein an zellulären DNA-Reparaturvorgängen beteiligtes Enzym, dessen Proteolyse auch im Rahmen der Apoptose einen Zwischenschritt dieser darstellt und als bedeutende Zielstruktur der Caspase 3 identifiziert wurde (Sato *et al.* 1992, Nicholson *et al.* 1995, Tewari *et al.* 1995, Cohen 1997). PARP ist von großer Bedeutung für die Validität der Zellen und ihr Abbau kann als Marker Apoptose-unterliegender Zellen gesehen werden (Oliver *et al.* 1998). Die von uns durchgeführten Proteinanalysen berücksichtigten sowohl die inaktiven Zustandsformen von Caspase 3, Caspase 7 und PARP als auch ihre aus proteolytischer Spaltung hervorgehenden aktiven Proteinfragmente. Auf diese Weise konnte das Ausmaß der in der Zelle ablaufenden Apoptosevorgänge untersucht werden.

Zusätzlich versuchten wir die Effekte von MLF1 auf die Apoptose durch den Einsatz zweier Modelle noch stärker herauszuarbeiten. Eine Cisplatin-Behandlung führte in unserem Modell zu einer Abnahme der Zellviabilität, zu einer Reduktion der Zellzahl und zu einer Induktion der Apoptose. Dies ist vergleichbar mit zahlreichen Analysen, die Cisplatin ebenfalls als einen differenziellen Apoptose-Induktor beschreiben (Rosenberg *et al.* 1969, Eastman 1990). Es zählt zu den anorganischen Platinverbindungen und wird heute in der Therapie unzähliger Karzinome eingesetzt (Rosenberg *et al.* 1969, Wanke 2010). Cisplatin gilt als eine der bedeutendsten chemotherapeutischen Substanzen und ist bekannt für seine hohe zytoreduktive und antitumorale Wirkung (Wanke 2010). Sein Wirkmechanismus beruht zum einen auf lokaler Denaturierung und Destabilisierung von DNA-Strängen, Störungen der Basenpaarung und Punktmutationen, und zum anderen auf der Vernetzung mit RNA und Proteinen, die zu einer Hemmung bestimmter Enzyme führen kann (Wanke 2010).

Die Reduktion der Sauerstoffbedingungen bis hin zur Anoxie führte zu einer Genexpressionsprofiländerung und einer damit einhergehenden vermehrten Expression von proapoptotischen Proteinen (Pflugrad 2005). Darüber hinaus stellen die umgebenden Milieubedingungen, wie Azidose oder Glukoseentzug, entscheidende Parameter dar, ob und wie lange die Kardiomyozyten unter hypoxischen Kulturbedingungen überleben können (Pflugrad 2005). In unseren Versuchen induzierte die Hypoxie eine Reduktion der Zellproliferation, gemessen an verminderten Expressionen der D-Cycline, und eine Abnahme der Zellviabilität.

Durch die beschriebenen Schlüsselpositionen der aufgelisteten Proteine ist ein umfassendes und mehrdimensionales Bild über die Viabilität der Zelle auf Proteinebene möglich.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

Es ist bekannt, dass Rho-GTPasen an der Kontrolle zahlreicher Signaltransduktionswege beteiligt sind, indem sie sich zwischen der GDP-gebundenen inaktiven und der GTP-gebundenen aktiven Form bewegen (Raftopoulou *et al.* 2004). So ist RND1 in die Modulation von Zytoskelett, Zellwachstum und -überleben involviert und trägt bei Dysregulation zur Tumorgenese bei (Xiang *et al.* 2016). Des Weiteren ist die Rho-family GTPase 1 als Biomarker zur Detektion von Kardiotoxizität bei Ratten beschrieben worden (Nishimura *et al.* 2013). Im Rahmen des kardialen „Remodelings“ oder der Herzhypertrophie ist die pathophysiologische Relevanz von RND1 erst wenig untersucht worden.

Diesem Projekt vorangegangene experimentelle Vorarbeiten konnten RND1 in einem „Microarray“ von RNA aus biomechanisch gedehnten NRVCs als ein reguliertes Gen

identifizieren (Pott 2017). So wurde die RND1-Expression nachweislich durch mechanischen Reiz signifikant hochreguliert (Pott 2017). Neben ihrem kardialen Vorkommen konnte RND1 auch in der Leber und Skelettmuskulatur nachgewiesen werden (Fagerberg *et al.* 2014). Nachdem die verstärkte Bildung durch mechanischen Reiz *in vitro* ermittelt und die kardiale Expression verifiziert wurde, konnte schließlich in einem Mausmodell auch *in vivo* eine vermehrte Aktivität nach transverser aortaler Konstriktion detektiert werden (Pott 2017). Darüber hinaus wurde nach der Behandlung der Zellen mit Phenylephrin ein ebenfalls erhöhtes RND1-Expressionsniveau gemessen (Pott 2017). Demnach gelang es, RND1 als ein sowohl durch mechanischen aber auch durch humoralen Stress induzierbares und scheinbar an der Mechanotransduktion beteiligtes Protein zu charakterisieren.

Immunzytologisch zeigte sich RND1 vorwiegend nukleär und perinukleär lokalisiert, was auf Proteinebene mittels subzellulärer Fraktionierung bestätigt werden konnte. Dies lässt die Beteiligung an der Regulation und Steuerung von Genexpressionen vermuten.

Sowohl physiologische als auch pathologische Belastungen des Herzmuskels können im Rahmen von Adaptationsmechanismen zur Hypertrophie führen und gehen unter anderem mit vergrößerten Zelleibern einher (Engelhardt *et al.* 2006). Neben der mikroskopisch detektierbaren Größenzunahme von Kardiomyozyten kann im Zuge des kardialen „Remodelings“ auf Genebene die Reaktivierung zahlreicher fötaler Gene beobachtet werden (Distefano *et al.* 2012). Die Überexpression von RND1 führte neben vergrößerten Zelleibern auch zu einer Induktion von *Nppa*, *Nppb* und *Rcan1-4*. *Rcan1-4* wurde als Regulator des Calcineurin und Marker für die Aktivität des Calcineurin-Signalweges mitbestimmt. Es ist beschrieben, dass *Rcan1-4* in hypertrophen Kardiomyozyten heraufreguliert ist (Landstrom *et al.* 2011). Bei der gleichzeitigen Behandlung der Kardiomyozyten mit Hypertrophie-erzeugenden Stimuli, wie 24- bzw. 48-stündiger „Stretch“ oder Phenylephrin, konnte eine noch weiter verstärkte Zunahme der gemessenen Parameter (Zellgröße, fötales Genprogramm und *Rcan1-4*) bewirkt werden. Folglich wird RND1 nicht nur in Hypertrophie-Modellen vermehrt exprimiert, sondern wirkt bei Überexpression auch selbst prohypertroph. Umgekehrt konnten wir im Zuge des RND1-„Knockdowns“ genau gegenteilige Ergebnisse hervorbringen. Geringe RND1-Expressionsniveaus bewirkten neben einer verminderten Zelloberfläche auch eine Suppression von *Nppa*, *Nppb* und von *Rcan1-4*.

Da bislang keine Untersuchungen zu Funktion oder Einfluss von RND1 auf kardiale Zellzyklusmechanismen durchgeführt wurden, analysierten wir den Effekt der GTPase auf die Proliferationsaktivität von neonatalen Rattenkardiomyozyten. Die Überexpression von RND1 regulierte signifikant die Ki67-Expression, was auf ein Proliferation-anregendes Potenzial von RND1 hinweist. Neben Ki67 induzierte eine hohe RND1-Proteinexpression auch die Anzahl PHH3-positiver Kardiomyozyten. Riou *et al.* beschreibt ebenfalls diese durch RND-Proteine induzierte Zellzyklusaktivität (Riou *et al.* 2010). Auch in der

Krebsforschung gelang es, RND1 als Induktor von Wachstum und Migration von Krebszellen zu erkennen (Xiang *et al.* 2016). Die Unterschiede in der Anzahl Ki67- und PHH3-positiver Zellen machten deutlich, dass wesentlich mehr Zellen in allen aktiven Phasen des Zellzyklus nachweisbar waren als in der M-Phase. Auf der anderen Seite führten geringe RND1-Spiegel zu verminderter Zyklusaktivität. Damit wirkt RND1 nicht nur prohypertroph, sondern ist auch für die Regeneration von Kardiomyozyten von Bedeutung. In der Analyse der Zellviabilität konnten wir keine Unterschiede durch die Überexpression bzw. den „Knockdown“ von RND1 feststellen. Somit ist RND1 relevanter Induktor von Zellproliferation und Zellgröße sowie von fötalen Genen und *Rcan1-4*.

Die im „Yeast two-Hybrid Screen“ aufgedeckte Interaktion zu Myozap kräftigt die Hypothese der Beteiligung von RND1 am kardialen Hypertrophie-Geschehen. Myozap und seine kardiale Funktion sind bereits in früheren Projekten der Arbeitsgruppe eingehend untersucht worden. Es wird verstärkt im Herzgewebe exprimiert und ist am Aufbau und der Funktion der *Disci intercalares* beteiligt (Seeger *et al.* 2010, Pieperhoff *et al.* 2012, Frank *et al.* 2014). Myozap ist in der Lage den SRF-Signalweg RhoA-abhängig zu aktivieren, wohingegen Myozap's Bindungspartner MRIP zur Hemmung dieser Signalkaskade führt (Seeger *et al.* 2010). In einem Zebrafisch-Modell konnte die durch den Myozap-„Knockdown“ induzierte kontraktile Dysfunktion der Kardiomyozyten und eine entstehende Kardiomyopathie als sich herausbildender Phänotyp veranschaulicht werden (Seeger *et al.* 2010). Daneben führte die Herunterregulation von Myozap in einem Mausmodell zu keinen veränderten morphologischen oder physiologischen Eigenschaften, doch wurde durch hypertrophe Stimulation eine verstärkt ausgeprägte Hypertrophie, einhergehend mit vermehrtem kardialen „Remodeling“ und Myokardfibrosierung, ausgelöst (Frank *et al.* 2014, Rangrez *et al.* 2016). Umgekehrt wurde ebenfalls in einem Mausmodell das Myocardium-enriched zonula occludens 1-associated protein überexprimiert und folglich eine zumindest teilweise durch SRF-„Signaling“ induzierte Kardiomyopathie *in vivo* detektiert (Frank *et al.* 2014). Begleitet wurde diese Myokarderkrankung von Proteinaggregationen in Kardiomyozyten und beschleunigten Apoptosevorgängen (Frank *et al.* 2014).

Wir bestätigten die im „Y2H-Screen“ identifizierte Interaktion zu Myozap durch Co-Immunopräzipitationen und konnten eine perinukleäre Colokalisation von RND1 und Myozap nachweisen. Die gesteigerte Proteinexpression beider Proteine nach 48 h-„Stretch“ deutet auf eine synergistische Regulation hin. Um nun weitere Erkenntnisse über die Beziehung zwischen RND1 und Myozap und den Einfluss auf Serum response factor-vermittelte Transkriptionen zu erhalten, führten wir eine Reihe von Luciferase-Reporter-„Assays“ durch. SRF vermittelt als multifunktionaler Transkriptionsfaktor die Regulation zahlreicher an Aktin-Zytoskelett, muskulärer Kontraktilität oder an zellulären Hypertrophie-bedingten Umbauvorgängen beteiligte Genexpressionen (Zhang *et al.* 2001b, Miano *et al.* 2007,

Rangrez *et al.* 2016). Ähnlich der bereits bekannten Wirkung von überexprimiertem Myozap bewirkte auch ein erhöhtes RND1-Expressionsniveau eine starke Aktivierung des SRF-Signalweges. Durch die gleichzeitige Überexpression von RND1 und Myozap in NRVCMs konnte die Induktion des SRF-„Signalings“ noch weiter verstärkt werden. Dies spricht für eine Interaktion der beiden Proteine und deren synergistisches Zusammenspiel in der Aktivierung des SRF-Signalweges und damit für die Induktion kardialer Hypertrophie. Auch die durch „Stretch“ induzierte SRF-Stimulation wurde nachweislich sowohl durch RND1 als auch durch Myozap deutlich verstärkt. Umgekehrt resultierte aus der Herunterregulation von RND1 und Myozap eine reduzierte SRF-Aktivität, die bei kombiniertem „Knockdown“ weiter abnahm. Die durch RND1 ausgelöste Stimulation des SRF-Signalweges und die induzierte zelluläre Hypertrophie lassen einen essenziellen Einfluss auf diesen am kardialen „Remodeling“ beteiligten Signalweg vermuten.

Unseren Untersuchungen zufolge bestehen zwar Wechselwirkungen zwischen RND1 und RhoA, die allerdings nicht allein für die RND1-ausgelöste Aktivierung der SRF-Signalkaskade verantwortlich sein können. So kann RND1 auch selbst oder über bisher noch unbekannte Interaktionspartner diesen an Zellproliferation und -differenzierung beteiligten Signalweg stimulieren (Abb. 34). Zur Klärung der gegenseitigen Abhängigkeit von RND1 und Myozap in der Induktion von SRF wurde in verschiedenen Versuchsansätzen jeweils eine der beiden Proteinexpressionen herunterreguliert. Interessanterweise war SRF nach RND1-Überexpression und kombiniertem Myozap-„Knockdown“ dennoch verstärkt aktiviert, sodass RND1 nicht auf Myozap als Interaktionspartner angewiesen zu sein scheint (Abb. 34). Auf der anderen Seite war nach Myozap-Überexpression und gleichzeitiger RND1-Herunterregulation keine signifikant erhöhte SRF-Aktivierung festgestellt worden, sodass wir von einer nicht notwendigen, aber hinreichenden RND1-Abhängigkeit ausgehen können.

Unter gleichzeitiger Hypertrophie-vermittelnder Dehnung der Kardiomyozyten wurde bei geringem RND1-„Level“ die SRF-Aktivitätszunahme reduziert, sodass diese nahezu der Aktivität „ungestretchter“ Zellen entsprach. RND1 spielt also eine entscheidende Rolle für die durch biomechanischen Reiz ausgelöste Differenzierung hin zu hypertrophierten Kardiomyozyten.

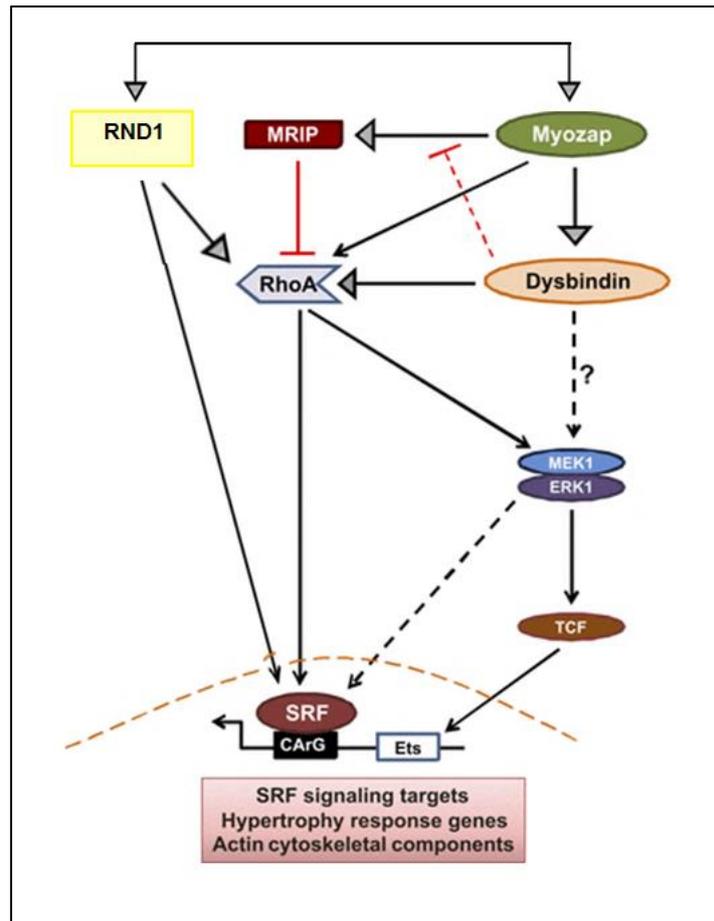


Abbildung 34: Die Rolle von RND1 im SRF-„Signaling“

Dargestellt sind die Beziehungen von RND1 zu Myozap, RhoA und dem Serum response factor. (Abb. modifiziert aus Rangrez *et. al* 2016)

Durch die Überprüfung der *Rnd1*-Expression in transgenen Myozap-Tieren und Myozap-„Knockout“-Mäusen konnten wir eine deutliche Expressionszunahme von *Rnd1* im transgenen Mausmodell zeigen. Dies verdeutlicht erneut eine Abhängigkeit von Myozap von RND1. Demgegenüber konnte eine in den KO-Tieren zwar abgeschwächte, aber verglichen mit den Wildtyp-Tieren dennoch signifikant höhere *Rnd1*-Expression gemessen werden, was erneut aufzeigt, dass die *Rnd1*-Aktivität nicht von Myozap abhängig ist. Möglicherweise basieren diese Ergebnisse auf einem kompensatorischen Anstieg der *Rnd1*-Genexpression bei gleichzeitig vorliegendem Myozap-„Knockout“ und können als eine Art negative Rückkopplung verstanden werden. Damit induziert sowohl die Hochregulation als auch die Abwesenheit von Myozap das *Rnd1*-Expressionsniveau. Weiterhin konnte der Verdacht einer Hypertrophie-induzierten *Rnd1*-Hochregulation durch den TAC-bedingten Anstieg der Nachlast im Herzen, der zu signifikant erhöhten *Rnd1*-Expressionsniveaus führte, bestätigt werden. Unabhängig vom vorliegenden Myozap-Spiegel (TG/KO) konnte ein durch TAC ausgelöster wesentlicher Anstieg in der *Rnd1*-Expression detektiert werden. Ein weiterer

Beleg dafür, dass *Rnd1* infolge der Druckbelastung des Herzens zwar deutlich vermehrt, aber nicht Myozap-abhängig exprimiert wird.

Den zu Beginn dieser Arbeit beschriebenen antagonistischen Effekt auf den RhoA/ROCK-Signalweg und die damit verbundene hemmende Wirkung auf die Herzhypertrophie können wir mit unseren Ergebnissen nicht stützen. Stattdessen war es uns möglich, neben der eindeutigen Hochregulation von RND1 in etablierten Hypertrophie-Modellen auch einen wesentlichen Einfluss von RND1 auf den am kardialen „Remodeling“ beteiligten SRF-Signalweg darzustellen.

Insgesamt charakterisierten wir RND1 als prohypertrophes und proliferationsanregendes Protein, welches damit zwei auf den ersten Blick kontroverse Rollen im kardiovaskulären Gesamtgeschehen bezieht. Auf der einen Seite kurbelt es die Zellproliferation an, auf der anderen Seite verstärkt RND1 das kardiale „Remodeling“ über die Induktion zellulärer Hypertrophie. Myokardiales „Remodeling“ gilt als Anpassungsreaktion an äußere Bedingungen wie biomechanische Belastungen beispielsweise durch Klappenvitien oder arterielle Hypertonie, aber auch die Proliferation von Herzmuskelzellen kann als Adaptation gesehen werden. So dient sie zum Beispiel dem Ersatz abgestorbenen Gewebes durch funktionell vitales. Auf diese Weise kann die zelluläre Proliferation als Teil des „Remodelings“ angesehen werden, sodass der nachgewiesene Einfluss von RND1 nachvollziehbar erscheint (Bernardo *et al.* 2016). Wang bestätigt unsere Überlegungen an einem Rattenmodell, indem er die durch aortale Konstriktion ausgelöste Kardiomyozytenproliferation und -hypertrophie in neonatalen Ratten veranschaulicht (Wang *et al.* 2017). Ihm gelang der Nachweis, dass NRVCs auf eine Nachlastbelastung in Form der Aortenstenosierung mit einem um 16,7 % erhöhten proliferativen Potenzial antworten (Wang *et al.* 2017). Neben dieser Reaktion auf induzierten Bluthochdruck zeigte eine andere Arbeitsgruppe, dass das neugeborene Rattenherz nach apikaler Resektion ähnlich wie das neonatale Mausherz zur Regeneration fähig ist (Zogbi *et al.* 2014). Demnach verifiziert die von uns beobachtete proliferationsstimulierende Wirkung von RND1 die Fähigkeit myokardialen Gewebes zu potenzieller Zellerneuerung. Allerdings gilt zu berücksichtigen, dass sämtliche Versuche dieses Projektes an neonatalen Rattenkardiomyozyten durchgeführt wurden, die im Gegensatz zu adulten Zellen eine gewisse Restfähigkeit zur zellulären Regeneration noch nicht abgelegt haben. Im adulten Herzen ist daher mit einer deutlich reduzierten Anzahl proliferativer Zellen zu rechnen.

Demzufolge bezieht RND1 eine bedeutende Position in der kardialen Pathophysiologie. Insbesondere das Herausarbeiten seiner Funktion in etablierten Hypertrophie-Modellen bzw. im SRF-„Signaling“ stützt nicht nur bisherige Ergebnisse der Arbeitsgruppe, sondern macht RND1 zu einer möglichen neuen therapeutischen Zielstruktur. So könnte das gezielte

Blockieren von RND1 progrediente Umbauprozesse des Myokards abschwächen oder sogar vollständig unterbinden.

MLF1 ist eng mit der Entwicklung der akuten myeloischen Leukämie und dem myelodysplastischen Syndrom assoziiert und im Rahmen dieser Krankheitsbilder zuerst beschrieben worden (Yoneda-Kato *et al.* 1996). In hämatopoetischen Zellen kommt es durch die Translokation t(3;5)(q25.1;q34) zu einem Fusionsprotein aus MLF1 und dem nukleolären Phosphoprotein Nucleophosmin (NPM) und folglich über die Dysregulation der Zelllinien-Differenzierung zu entsprechenden Erkrankungen (Yoneda-Kato *et al.* 1996). Die Rolle von MLF1 in der Pathophysiologie des Herzens ist dagegen noch nahezu unbekannt.

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte MLF1 durch das Durchführen eines „Microarray“-Experimentes von „gestreckten“ Kardiomyozyten als ein reguliertes Gen identifiziert werden (Rangrez *et al.* 2017). Die MLF1-Expression wurde durch biomechanische Dehnung hoch signifikant herunterreguliert (Rangrez *et al.* 2017). In einem anknüpfenden Mausmodell konnte dieses Ergebnis durch transverse aortale Konstriktion bestätigt werden (Pott 2017). Die Behandlung kardialer Myozyten mit Phenylephrin zeigte dagegen keinerlei Veränderungen in der MLF1-Expression (Pott 2017, Rangrez *et al.* 2017). So gingen wir von einem lediglich durch mechanische Reize regulierbaren Faktor aus. Außerdem konnten für MLF1 ein hohes Expressionsniveau in Herz- und Skelettmuskulatur und eine zytoplasmatische und nukleäre Lokalisation nachgewiesen werden (Pott 2017, Rangrez *et al.* 2017). Die Überexpression von MLF1 führte zu einer gesteigerten Expression von *Nppa* und *Nppb*, aber verminderten *Rcan1-4*-Aktivität, was auf einen weniger aktiven Calcineurin-Signalweg hindeutet (Pott 2017). Durch die zusätzliche Behandlung der NRVCs mit humoralem bzw. biomechanischem Stress konnte eine weitere Aggravation hypertropher Reaktionen ausgelöst werden (Pott 2017). Ein durchgeführter „Yeast two-Hybrid Screen“ deckte die Interaktion mit dem das Zytoskelett stabilisierenden MACF1 (engl.: microtubule actin cross-linking factor 1) auf und lieferte einen Hinweis auf einen am kardialen „Remodeling“ beteiligten Signalweg (Pott 2017, Rangrez *et al.* 2017).

In der vorgelegten Arbeit wurden nun zunächst die Auswirkungen des MLF1-„Knockdowns“ präsentiert. Anhand von Zellgrößenuntersuchungen ermittelten wir ein geringes MLF1-Niveau als ein die Zelloberfläche vergrößernden Faktor. Auch die Expressionen von Komponenten des fötalen Genprogrammes wie *Nppa* und *Nppb* wurden durch den MLF1-„Knockdown“ hochreguliert, was auf die Induzierbarkeit einer Hypertrophie hinweist. Die Herunterregulation von MLF1 durch dynamischen „Stretch“ ist damit kongruent mit den erhobenen „Knockdown“-Daten: Während kardiale Hypertrophie die MLF1-Expression drosselt, führen geringe MLF1-Spiegel selbst zu vergrößerten Zelleibern und zur Induktion

des fötalen Genprogrammes. Diese dynamischen Dehnungen führen zur Induktion der Zellproliferation des embryonalen Herzgewebes über die Aktivierung der p38/MAP-Kinase (Tobita *et al.* 2006, Clause *et al.* 2009). Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch ähnliche Befunde aus murinen Kardiomyozyten, die nach biomechanischem „Stretch“ eine erhöhte Zellproliferation durch vermindertes TGF β -„Signaling“ hervorriefen (Banerjee *et al.* 2015). Zusätzlich zu diesen Erkenntnissen konnten wir zeigen, dass das „Stretchen“ der NRVCMS durch die Suppression von p53 und die Induktion der D-Cycline eine vermehrte Proliferationsaktivität bewirkt. Außerdem veranschaulichten wir, dass die Suppression der MLF1-Expression neben dem Überleben neonataler Rattenkardiomyozyten auch die Zellproliferation prognostisch begünstigt, während erhöhte MLF1-Expressionen zu einer beschleunigten Apoptose und einer verminderten Zellproliferation führen. So induziert die Überexpression von MLF1 Apoptose über die Aktivierung von Caspase-Signalwegen (Caspase 3, Caspase 7 und PARP). Sun *et al.* beschreibt ebenfalls die Apoptose-induzierende Wirkung von MLF1 und berichtet gleichzeitig von Lymphozyten aus MLF1-„Knockout-Mäusen“, die gegenüber apoptotischer Stimulation resistenter waren als die Wildtyp-Zellen (Sun *et al.* 2015). Diese Ergebnisse konnten in zwei etablierten Modellen der Apoptose-Induktion in Kardiomyozyten (Cisplatin und Hypoxie) bestätigt werden, wobei vor allem letzteres besondere pathophysiologische Relevanz zeigt (Rangrez *et al.* 2017). Unsere Untersuchungen zentraler Komponenten des apoptotischen Systems stehen im Einklang mit diversen Studien und bekräftigen die Annahme, dass Cisplatin Mechanismen zur Einleitung des programmierten Zelltodes initiiert. So konnte nachgewiesen werden, dass Cisplatin durch sein breites therapeutisches Spektrum in der Therapie des Blasen-, Zervix-, Ovarial-, Endometrium-, Prostata-, Kopf- und Hals-, Ösophagus- und Bronchialkarzinoms sowie bei Sarkomen und malignen Lymphomen zum Einsatz kommt (Donislawski *et al.* 1991, Gabriel 2012). Es war uns möglich, die Cisplatin-vermittelte Apoptose anhand Caspase-Expressionen, Zellviabilität und Anzahl überlebender Zellen darzustellen und eine durch hochreguliertes MLF1 verstärkte Toxizität aufzuzeigen. Unsere Analysen zur Apoptoseinduktion unter Hypoxie ergaben deutliche Hinweise auf eine Induktion des programmierten Zelltodes nach 3 h hypoxischer Kultivierung. Der Anteil vitaler Zellen unter Hypoxie und die Expression der D-Cycline stützte unsere Hypothese der verstärkt ablaufenden Apoptose, die bei hohem MLF1-„Level“ weiter verstärkt wurde.

Im Gegensatz dazu hemmte der MLF1-„Knockdown“ die zellulären Apoptosevorgänge, beschleunigte die Zellproliferation über p53-Regress und Verstärkung der Aktivität der D-Cycline, schwächte Cisplatin in seiner Wirkung und dämpfte das Hypoxie-vermittelte Zellsterben. Auch an dieser Stelle lässt sich die in Vorarbeiten gezeigte, durch biomechanischen Reiz vermittelte Reduktion der MLF1-Expression als Auslöser vermehrter Zellproliferation und damit als Teil des physiologischen Regenerationsbestrebens deuten.

Des Weiteren konnten wir mit diesen Ergebnissen die von Yoneda-Kato 2005 beschriebene Stabilisierung von p53 bestätigen, die auf der Bindung mit CSN3 und der Hemmung der COP1-Expression basiert (Yoneda-Kato *et al.* 2005). Ein geringes MLF1-Expressionsniveau führte aber nicht nur zu vermehrtem Zellüberleben und einer gesteigerten Proliferationsfähigkeit der Kardiomyozyten, sondern reduzierte auch die terminale Differenzierung von proliferativen mononukleären Zellen zu nichtproliferativen binukleären Zellen. Da Kardiomyozyten postnatal die Fähigkeit zur Proliferation fast vollständig ablegen, machen diese Ergebnisse MLF1 zu einem potenziellen Ziel pharmakologischer Therapien. Die Tatsache, dass die Herunterregulation von MLF1 die Proliferationsfähigkeit verstärkt und Apoptosevorgänge bremst, könnte künftig als Ansatz genutzt werden, um die kardiale Regeneration zu fördern.

4.4 Ausblick

Die Charakterisierung der beiden „Stretch“-abhängig regulierten Proteine RND1 und MLF1 konnte im Rahmen dieser Arbeit wesentlich erweitert und die Einordnung ihrer Positionen im kardialen „Remodeling“ und in der Herzhypertrophie weitestgehend herausgearbeitet werden. Dennoch sind einige Schlüsselrollen beider Proteine nur ungenügend erforscht und erfordern eine Reihe weiterer Versuchsschritte.

Nachdem die intrazelluläre Lokalisation von RND1 immunzytologisch mithilfe von ausgewählten Antikörpern verdeutlicht wurde, sollte man, um eine mögliche unspezifische Epitopbindung des RND1-Antikörpers auszuschließen, künftig durch den Einsatz eines Protein-„Tags“ die bisherigen Ergebnisse überprüfen und bestätigen. Mithilfe dieser Markierung ließe sich das intrazelluläre Vorkommen des Fusionsproteins direkt visuell demonstrieren.

Nach der Darstellung der Interaktion von RND1 und Myozap soll nun im Folgenden die Regulation von RND1 in transgenen Myozap-Mäusen und Myozap-„Knockout“-Mäusen auch auf Proteinebene untersucht werden, um funktionelle Aussagen weiter untermauern zu können. Auch die Interaktion von RND1 und Myozap sollte anhand von kryokonservierten Gewebeschnitten validiert werden. Des Weiteren müsste die Beziehung der Rho-family GTPase 1 zu anderen bereits erforschten und an der SRF-Signalkaskade beteiligten Proteinen wie zum Beispiel Dysbindin, MRIP oder ERK1 untersucht werden, um die Einordnung in den gesamten Signalweg zu ermöglichen.

Außerdem plant unsere Arbeitsgruppe die detaillierte Ausarbeitung des Einflusses von RND1 auf den Zellzyklus. Erste Hinweise auf eine regulatorische Funktion lieferte die durchgeführte immunzytologische Untersuchung der Mitosemarker Ki67 und PHH3. Die Effekte der

Überexpression und des „Knockdowns“ von RND1 auf die Aktivität der Caspasen, der Cycline und auf p53 sollten zusätzlich in diesem Zusammenhang analysiert werden.

Für MLF1 könnte die durch den „Yeast two-Hybrid Screen“ bereits aufgedeckte Interaktion mit MACF1 durch eine Co-Immunpräzipitation bestätigt und auf die bereits festgestellte Beziehung zu Myozap vermehrt fokussiert werden. So sollte die Beeinflussung des SRF-„Signalings“ durch Überexpression bzw. Herunterregulation von MLF1 mittels Luciferase-„Assay“ und „Western Blot“ detektiert werden.

Des Weiteren habe ich in Kooperation mit Prof. Dr. David Hassel und seinem Team in zwei Heidelberg-Aufenthalten (2015) an der Generierung von zwei „Knockout“-Zebrafisch-Modellen durch den Einsatz des CRISPR (engl. clustered regulatory interspaced short palindromic repeat)/Cas9-Systems zur Verifizierung der *in vitro*-Daten und der Veranschaulichung der Auswirkungen beider Proteine auf das kardiale „Remodeling“ *in vivo* mitgewirkt. Im Anschluss an diese Arbeiten soll die grundlegende und funktionelle Charakterisierung der generierten Zebrafischlinien erfolgen. Die Auswirkungen des Funktionsverlustes eines jeden Allels sollten folglich verglichen und näher untersucht werden. Dazu können die entwickelten Phänotypen unter anderem mittels Echokardiographie zur basalen Herzfunktionsprüfung weiter analysiert werden. Außerdem ist geplant, die Herzfunktion auch unter induziertem Stress zu messen. Dies ist zum Beispiel mit chronischem β -Adrenorezeptor-Agonismus (Isoprenalin-Behandlung) oder Schwimmversuchen gegen definierte Fließgeschwindigkeiten möglich. Im Anschluss an diese funktionelle Charakterisierung werden abschließend immunhistochemische Untersuchungen, Proteinanalysen und Genexpressionsmessungen erfolgen.

Auf diese Weise kann der bisherige Kenntnisstand über beide Proteine und ihre Beteiligung an der kardialen Pathophysiologie weiter ausgebaut werden. RND1 und MLF1 stellen damit auch weiterhin zwei interessante Zielstrukturen für die laufende Forschung dar.

5 Zusammenfassung

Volumen- oder Druckbelastungen des Herzens können zu einer Verschlechterung der Herzfunktion und letztlich zur Herzinsuffizienz führen. Das kardiale „Remodeling“ umfasst diese molekularen und zellulären Veränderungen als Antwort auf adaptive, aber auch maladaptive Bedingungen und spielt eine bedeutende Rolle im Rahmen diverser Herzerkrankungen. Daher wurde in dieser Arbeit auf die Charakterisierung potenzieller Zielstrukturen und die Analyse ihres Einflusses auf die kardiale Physiologie und Pathophysiologie fokussiert. Die beiden „Stretch“-abhängig regulierten Proteine RND1 und MLF1 sind bereits in neonatalen Rattenkardiomyozyten identifiziert worden. Es konnte gezeigt werden, dass RND1 vorwiegend nukleär und perinukleär auftritt und überexprimiert zu vergrößerten Zelleibern und der Reinduktion des fötalen Genprogrammes führt. Diese prohypertrophen Effekte konnten zusätzlich durch einen Anstieg der *Rcan1-4*-Expression gestützt werden. Die durch „Stretch“ und die Behandlung mit Phenylephrin ausgelösten Hypertrophie-erzeugenden Prozesse wurden durch RND1-Überexpression weiter verstärkt. RND1 ist demnach nicht nur in Hypertrophie-Modellen vermehrt exprimiert, sondern wirkt auch selbst prohypertroph. Umgekehrt zeigten wir die Suppression von Zellgröße, von *Nppa* und *Nppb* als Komponenten des fötalen Genprogrammes und *Rcan1-4* als Regulator des Calcineurin-Signalweges nach Herunterregulation von RND1. Auch die durch mechanische oder humorale Belastung bewirkte Induktion dieser genannten Parameter wurde durch ein geringes RND1-Expressionsniveau abgeschwächt. Darüber hinaus konnte durch den Einsatz von Proliferationsmarkern (Ki67 und Phosphohiston H3) gezeigt werden, dass überexprimiertes RND1 Einfluss auf den Zellzyklus nimmt und zu vermehrt proliferationsaktiven Zellen führt. Zur Identifikation potenzieller Bindungspartner von RND1 wurde ein „Yeast two-Hybrid Screen“ durchgeführt, der die direkte Interaktion mit Myozap, einem am SRF-„Signaling“ beteiligten Glanzstreifen-Protein, nachgewiesen hat. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurden Co-Immunopräzipitationen durchgeführt und eine perinukleäre Colokalisation detektiert. Mit „Stretch“ behandelte Kardiomyozyten zeigten sowohl die für RND1 erwartete, aber auch die bei Myozap vermutete Hochregulation beider Konstrukte. Die RND1-Überexpression resultierte im Luciferase-„Assay“ in einer hoch signifikant gesteigerten SRF-Aktivität, deren vermehrte Expression auch auf Proteinebene bestätigt werden konnte. Umgekehrt wurde der SRF-Signalweg nach Herunterregulation von RND1 weniger induziert. In Anlehnung an die RhoA-abhängige Wirkung von Myozap konnten wir für RND1 eine weniger ausgeprägte Abhängigkeit von RhoA ermitteln. Da der Einfluss des „Stretchens“ bei gleichzeitiger Herunterregulation sowohl von RND1 als auch von Myozap beinahe vollständig aufgehoben wurde, vermuten wir eine essenzielle Rolle

beider Proteine im kardialen „Remodeling“. Weiterhin konnte abgeklärt werden, dass RND1 auch unabhängig von Myozap zur Aktivierung des SRF-„Signalings“ führen kann, während Myozap nur in Anwesenheit von RND1 verstärkte SRF-Aktivität auslöst. Des Weiteren konnte in einem transgenen Myozap-Mausmodell eine erhöhte *Rnd1*-Genexpression nachgewiesen und die Abhängigkeit Myozap's von *Rnd1* erneut bestätigt werden. Bei Herunterregulation von Myozap ist ein ebenfalls erhöhter *Rnd1*-Spiegel detektierbar und lässt eine kompensatorische und Myozap-unabhängige Regulation vermuten. Den Erwartungen entsprechend ließ sich *in vivo* ein Anstieg der *Rnd1*-Expression durch Hypertrophie-erzeugende Stimuli (hier transverse aortale Konstriktion) nachweisen.

Der adenovirale „Knockdown“ von MLF1 bewirkte neben einer Zunahme der Zelloberfläche auch eine Induktion von *Nppa*, *Nppb* und *Rcan1-4*. Des Weiteren konnten wir neben dem Hypertrophie-induzierenden Einfluss eine ebenfalls durch geringe MLF1-„Level“ ausgelöste Zunahme der Zellviabilität mittels PI- und MTT-„Assay“ detektieren. Analog dazu ergab die Analyse der Anzahl differenzierter binukleärer Kardiomyozyten eine Reduktion bei gleichzeitigem „Knockdown“ und eine Zunahme bei Überexpression von MLF1. Es zeigte sich eine durch MLF1 induzierte Zunahme der Expressionen von Caspase 3, Caspase 7 und Poly(ADP-ribose)-Polymerase, die bei reduziertem MLF1 vermindert exprimiert wurden. Diese Ergebnisse konnten in zwei etablierten Modellen der Apoptose-Induktion, zum einen durch die Behandlung der Zellen mit Cisplatin und zum anderen durch die Inkubation unter Hypoxie-Bedingungen, bestätigt werden. Umgekehrt wurde die Zellproliferation durch niedrige MLF1-Spiegel über die Aktivierung von D-Cylinen und die Inhibition von p53 induziert. Diese Effekte konnten auch unter biomechanischem „Stretch“ erzielt werden. Der MLF1-„Knockdown“ schützt also möglicherweise Kardiomyozyten vor Apoptose und steigert ihre Fähigkeit zur Proliferation. Darüber hinaus schützt ein MLF1-„Knockdown“ vor Hypoxie-induziertem Zelltod.

6 Literaturverzeichnis

- Ahuja P., Sdek P., MacLellan WR. (2007). Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration. *Physiol Rev* 87(2): 521-544.
- Ashikaga H., Aguilar-Rodríguez J., Gorsky S., Luszczyk E., Marquitti FM., Thompson B., Wu D., Garland J. (2015). Modelling the heart as a communication system. *J R Soc Interface* 12(105).
- Baker KM., Chernin MI., Wixson SK., Aceto JF. (1990). Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Am J Physiol* 259(2 Pt 2): H324-332.
- Balakumar P., Jagadeesh G. (2014). A century old renin-angiotensin system still grows with endless possibilities: AT1 receptor signaling cascades in cardiovascular pathophysiology. *Cell Signal* 26(10): 2147-2160.
- Banerjee I., Carrion K., Serrano R., Dyo J., Sasik R., Lund S., Willems E., Aceves S., Meili R., Mercola M., Chen J., Zambon A., Hardiman G., Doherty TA., Lange S., del Álamo JC., Nigam V. (2015). Cyclic stretch of embryonic cardiomyocytes increases proliferation, growth, and expression while repressing Tgf-beta signaling. *J Mol Cell Cardiol* 79: 133-144.
- Banerjee M., Datta M., Bhattacharyya NP. (2017). Modulation of mutant Huntingtin aggregates and toxicity by human myeloid leukemia factors. *Int J Biochem Cell Biol* 82: 1-9.
- Barutcu O., Kara M., Muratlı A., Güçlü O., Dereköy S. (2016). Clinical significance of Ki-67, c-erbB-2 and E-cadherin expressions in open partial laryngectomy patients. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg* 26(5): 283-292.
- Becher J. (2006). Untersuchung des Calcineurin Signalweges bei der Myokardhypertrophie. Medizinische Fakultät, Julius-Maximilian-Universität zu Würzburg.
- Behl C., Ziegler C. (2016). Molekulare Mechanismen der Zellalterung und ihre Bedeutung für Alterserkrankungen des Menschen. Berlin, Springer Verlag.
- Belaguli NS., Schildmeyer LA., Schwartz RJ. (1997). Organization and myogenic restricted expression of the murine serum response factor gene. A role for autoregulation. *J Biol Chem* 272(29): 18222-18231.
- Beltrami AP., Urbanek K., Kajstura J., Yan SM., Finato N., Bussani R., Nadal-Ginard B., Silvestri F., Leri A., Beltrami CA., Anversa P. (2001). Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 344(23): 1750-1757.
- Berenji K., Drazner MH., Rothermel BA., Hill JA. (2005). Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(1): H8-H16.
- Bernardo BC., McMullen JR. (2016). Molecular Aspects of Exercise-induced Cardiac Remodeling. *Cardiol Clin* 34(4): 515-530.
- Bernardo BC., Weeks KL., Pretorius L., McMullen JR. (2010). Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther* 128(1): 191-227.
- Bernt A., Rangrez AY., Eden M., Jungmann A., Katz S., Rohr C., Müller OJ., Katus HA., Sossalla ST., Williams T., Ritter O., Frank D., Frey N. (2016). Sumoylation-independent activation of Calcineurin-NFAT-signaling via SUMO2 mediates cardiomyocyte hypertrophy. *Sci Rep* 6: 35758.

- Bittig A. (2005). Der Einfluss von Geschlechtshormonen auf die Hypertrophieantwort nach Druckbelastung im Myokard der Maus. Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität zu Gießen.
- Bonneux L., Barendregt JJ., Meeter K., Bonsel GJ., van der Maas PJ. (1994). Estimating clinical morbidity due to ischemic heart disease and congestive heart failure: the future rise of heart failure. *Am J Public Health* 84(1): 20-28.
- Borschiwer M. (2014). Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems im Epha4-Lokus von embryonalen Stammzellen. Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin.
- Bos JM., Ackerman MJ. (2010). Z-disc genes in hypertrophic cardiomyopathy: stretching the cardiomyopathies? *J Am Coll Cardiol* 55(11): 1136-1138.
- Brahimi-Horn MC., Chiche J., Pouysségur J. (2007). Hypoxia and cancer. *J Mol Med (Berl.)* 85(12): 1301-1307.
- Brancaccio M., Fratta L., Notte A., Hirsch E., Poulet R., Guazzone S., De Acetis M., Vecchione C., Marino G., Altruda F., Silengo L., Tarone G., Lembo G. (2003). Melusin, a muscle-specific integrin beta1-interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload. *Nat Med* 9(1): 68-75.
- Brand T. (2003). Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev Biol* 258(1): 1-19.
- Bray N. J., Preece A., Williams NM., Moskvina V., Buckland PR., Owen MJ., O'Donovan MC. (2005). Haplotypes at the dystrobrevin binding protein 1 (DTNBP1) gene locus mediate risk for schizophrenia through reduced DTNBP1 expression. *Hum Mol Genet* 14(14): 1947-1954.
- Buggisch M. (2007). Mechanismen der Proliferation von Kardiomyozyten differenziert aus embryonalen Stammzellen der Maus. Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität zu Gießen.
- Bui AL., Horwich TB., Fonarow GC. (2011). Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat Rev Cardiol* 8(1): 30-41.
- Burchill LJ., Redington AN., Silversides CK., Ross HJ., Jimenez-Juan L., Mital S., Oechslin EN., Dragulescu A., Slorach C., Mertens L., Wald RM. (2015). Renin-angiotensin-aldosterone system genotype and serum BNP in a contemporary cohort of adults late after Fontan palliation. *Int J Cardiol* 197: 209-215.
- Burkard N., Becher J., Heindl C., Neyses L., Schuh K., Ritter O. (2005). Targeted proteolysis sustains calcineurin activation. *Circulation* 111(8): 1045-1053.
- Cameron VA., Ellmers LJ. (2003). Minireview: natriuretic peptides during development of the fetal heart and circulation. *Endocrinology* 144(6): 2191-2194.
- Cannone V., Barlera S., Pileggi S., Masson S., Franzosi MG., Latini R., Scardulla C., Clemenza F., Maggioni AP., Nicolosi GL., Tavazzi L., Burnett JC. (2014). The Anp genetic variant Rs5068 and circulating levels of natriuretic peptides in patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol* 176(3): 1249-1251.
- Carella DM. (2015). Brain Natriuretic Peptide: It's Not About the Brain or Just Another Smart Polypeptide-It's About the Heart. *Neonatal Netw* 34(6): 355-359.
- Chang HY., Wang CC., Wu YW., Chu PH., Wu CC., Hsu CH., Wen MS., Voon WC., Lin WS., Huang JL., Chen SM., Yang NI., Chang HC., Chang KC., Sung SH., Shyu KG., Lin JL., Mar GY., Chan KC., Kuo JY., Wang JH., Chen ZC., Tseng WK., Cherng WJ., Yin WH. (2017). One-Year Outcomes of Acute Decompensated Systolic Heart Failure in Taiwan: Lessons from TSOC-HFrEF Registry. *Acta Cardiol Sin* 33(2): 127-138.
- Chardin P. (2006). Function and regulation of Rnd proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(1): 54-62.

- Chehab NH., Malikzay A., Stavridi ES., Halazonetis TD. (1999). Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(24): 13777-13782.
- Cheng W., Li B., Kajstura J., Li P., Wolin MS., Sonnenblick EH., Hintze TH., Olivetti G., Anversa P. (1995). Stretch-induced programmed myocyte cell death. *J Clin Invest* 96(5): 2247-2259.
- Cheng YY., Lundy DJ., Lo AH., Wang YP., Ruan SC., Lin PJ., Hsieh PC. (2016). Reprogramming-derived gene cocktail increases cardiomyocyte proliferation for heart regeneration. *EMBO Mol Med* 9(2):251-264.
- Chow KL., Tse KY., Cheung CL., Wong KW., Cheung AN., Wong RW., Chan AN., Yuen NW., Ngan HY., Ip PP. (2016). The mitosis-specific marker phosphohistone-H3 (PHH3) is an independent prognosticator in uterine smooth muscle tumors: an outcome-based study. *Histopathology* 70(5):746-755.
- Clause KC., Tinney JP., Liu LJ., Keller BB., Tobita K. (2009). Engineered early embryonic cardiac tissue increases cardiomyocyte proliferation by cyclic mechanical stretch via p38-MAP kinase phosphorylation. *Tissue Eng Part A* 15(6): 1373-1380.
- Clubb FJ. Jr., Bishop SP. (1984). Formation of binucleated myocardial cells in the neonatal rat. An index for growth hypertrophy. *Lab Invest* 50(5): 571-577.
- Cohen GM. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 (Pt 1): 1-16.
- Cohn JN. (1997). Overview of the treatment of heart failure. *Am J Cardiol* 80(11a): 2I-6I.
- Cooper DL., Braverman IM., Sarris AH., Durivage HJ., Saidman BH., Davis CA., Hait WN. (1993). Cyclosporine treatment of refractory T-cell lymphomas. *Cancer* 71(7): 2335-2341.
- Cotton TF. (1914). Cardiac hypertrophy. *Can Med Assoc J* 4(8): 709-714.
- Cox EJ., Marsh SA. (2014). A systematic review of fetal genes as biomarkers of cardiac hypertrophy in rodent models of diabetes. *PLoS One* 9(3): e92903.
- Crawford DR., Leahy KP., Abramova N., Lan L., Wang Y., Davies KJ. (1997). Hamster adapt78 mRNA is a Down syndrome critical region homologue that is inducible by oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 342(1): 6-12.
- Crowley LC., Waterhouse NJ. (2016). Detecting Cleaved Caspase-3 in Apoptotic Cells by Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc* 2016(11): pdb.prot087312.
- de Azambuja E., Cardoso F., de Castro G Jr., Colozza M., Mano MS., Durbecq V., Sotiriou C., Larsimont D., Piccart-Gebhart MJ., Paesmans M. (2007). Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer* 96(10): 1504-1513.
- de Souza LE., Moura Costa MD., Bilek ES., Lopes MH., Martins VR., Püschel AW., Mercadante AF., Nakao LS., Zanata SM. (2014). STI1 antagonizes cytoskeleton collapse mediated by small GTPase Rnd1 and regulates neurite growth. *Exp Cell Res* 324(1): 84-91.
- deAlmeida AC., van Oort RJ., Wehrens XH. (2010). Transverse aortic constriction in mice. *J Vis Exp* (38).
- Determann O. (2009). Der KI-67-Index ist ein histopathologischer prognostischer Marker bei Mantelzell-Lymphomen in prospektiven und randomisierten Therapiestudien. Medizinische Fakultät, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Dickstein K., Cohen-Solal A., Filippatos G., McMurray JJ., Ponikowski P., Poole-Wilson PA., Strömberg A., van Veldhuisen DJ., Atar D., Hoes AW., Keren A., Mebazaa A., Nieminen M., Priori SG., Swedberg K; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). (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 J Heart Fail* 10(10): 933-989.
- Dietz JR. (2005). Mechanisms of atrial natriuretic peptide secretion from the atrium. *Cardiovasc Res* 68(1): 8-17.
- Distefano G., Sciacca P. (2012). Molecular pathogenesis of myocardial remodeling and new potential therapeutic targets in chronic heart failure. *Ital J Pediatr* 38: 41.
- Donislowski, Gain M., Meyer-Jürshof A. (1991). Cisplatin. *Zytostatika Handbuch Pharmazeutisch- wissenschaftliche Monographien*. Heiner Biller Verlag(1): 1-54.
- Dorn GW. 2nd, Robbins J., Sugden PH. (2003). Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res* 92(11): 1171-1175.
- Dreyer-Schmitt S. (2009). Induktion von Apoptose, Zellzyklusarrest und Differenzierung in AML-Zellen durch Histondeacetylaseinhibitoren. Medizinische Fakultät, Technische Universität zu München.
- Eastman A. (1990). Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. *Cancer Cells* 2(8-9): 275-280.
- Eghbali M., Deva R., Alioua A., Minosyan TY., Ruan H., Wang Y., Toro L., Stefani E. (2005). Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circ Res* 96(11): 1208-1216.
- Ekholm SV., Reed SI. (2000). Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 12(6): 676-684.
- el-Deiry WS. (1998). p21/p53, cellular growth control and genomic integrity. *Curr Top Microbiol Immunol* 227: 121-137.
- El Jamali A., Freund C., Rechner C., Scheidereit C., Dietz R., Bergmann MW. (2004). Reoxygenation after severe hypoxia induces cardiomyocyte hypertrophy in vitro: activation of CREB downstream of GSK3beta. *FASEB J* 18(10): 1096-1098.
- Engel N. (2008). Deregulation von Zellzyklus und Apoptose beim Ovarialkarzinom. Medizinische Fakultät, Charité – Universitätsmedizin Berlin.
- Engelhardt S., Merkle S. (2006). Physiologisches und pathologisches Myokardwachstum? *BIOspektrum*: 165-167.
- Epstein ND., Davis JS. (2003). Sensing stretch is fundamental. *Cell* 112(2): 147-150.
- Fagard RH. (1997). Impact of different sports and training on cardiac structure and function. *Cardiol Clin* 15(3): 397-412.
- Fagerberg L., Hallström BM., Oksvold P., Kampf C., Djureinovic D., Odeberg J., Habuka M., Tahmasebpoor S., Danielsson A., Edlund K., Asplund A., Sjöstedt E., Lundberg E., Szigartyo CA., Skogs M., Takanen JO., Berling H., Tegel H., Mulder J., Nilsson P., Schwenk JM., Lindskog C., Danielsson F., Mardinoglu A., Sivertsson A., von Feilitzen K., Forsberg M., Zwahlen M., Olsson I., Navani S., Huss M., Nielsen J., Ponten F., Uhlén M. (2014). Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomic* 13(2): 397-406.
- Falini B., Bigerna B., Pucciarini A., Tiacci E., Mecucci C., Morris SW., Bolli N., Rosati R., Hanissian S., Ma Z., Sun Y., Colombo E., Arber DA., Pacini R., La Starza R., Verducci Galletti B., Liso A., Martelli MP., Diverio D., Pelicci PG., Lo Coco F., Martelli MF. (2006). Aberrant subcellular expression of nucleophosmin and NPM-MLF1 fusion protein in acute myeloid leukaemia carrying t(3;5): a comparison with NPMc+ AML. *Leukemia* 20(2): 368-371.
- Feldman AM., Weinberg EO., Ray PE., Lorell BH. (1993). Selective changes in cardiac gene expression during compensated hypertrophy and the transition to cardiac decompensation in rats with chronic aortic banding. *Circ Res* 73(1): 184-192.

- Feng Y., Zhao J., Hou H., Zhang H., Jiao Y., Wang J., Wang Y., Sun Y. (2016). WDR26 promotes mitophagy of cardiomyocytes induced by hypoxia through Parkin translocation. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 48(12): 1075-1084.
- Fierabracci A., Pellegrino M. (2016). The Double Role of p53 in Cancer and Autoimmunity and Its Potential as Therapeutic Target. *Int J Mol Sci* 17(12).
- Forth W., Henschler D., Rummel W. (2013). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- Frank D., Frey N. (2011). Cardiac Z-disc signaling network. *J Biol Chem* 286(12): 9897-9904.
- Frank D., Kuhn C., Brors B., Hanselmann C., Lüdde M., Katus HA., Frey N. (2008). Gene expression pattern in biomechanically stretched cardiomyocytes: evidence for a stretch-specific gene program. *Hypertension* 51(2): 309-318.
- Frank D., Kuhn C., Katus HA., Frey N. (2006). The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease. *J Mol Med (Berl.)* 84(6): 446-468.
- Frank D., Rangrez AY., Poyanmehr R., Seeger TS., Kuhn C., Eden M., Stiebeling K., Bernt A., Grund C., Franke WW., Frey N. (2014). Mice with cardiac-restricted overexpression of Myozap are sensitized to biomechanical stress and develop a protein-aggregate-associated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 72: 196-207.
- Frey N., Barrientos T., Shelton JM., Frank D., Rütten H., Gehring D., Kuhn C., Lutz M., Rothermel B., Bassel-Duby R., Richardson JA., Katus HA., Hill JA., Olson EN. (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., Frank D., Lippl S., Kuhn C., Kögler H., Barrientos T., Rohr C., Will R., Müller OJ., Weiler H., Bassel-Duby R., Katus HA., Olson EN. (2008). Calsarcin-2 deficiency increases exercise capacity in mice through calcineurin/NFAT activation. *J Clin Invest* 118(11): 3598-3608.
- Frey N., Olson EN. (2002). Calsarcin-3, a novel skeletal muscle-specific member of the calsarcin family, interacts with multiple Z-disc proteins. *J Biol Chem* 277(16): 13998-14004.
- Frey N., Olson EN. (2003). Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* 65: 45-79.
- Frey N., Richardson JA, Olson EN. (2000). Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(26): 14632-14637.
- Gabriel VB. (2012). *Cisplatin und Carboplatin für die palliative Chemotherapie beim metastasierten malignen Melanom*. Medizinische Fakultät, Charité – Universitätsmedizin Berlin.
- Gerdes J., Schwab U., Lemke H., Stein H. (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31(1): 13-20.
- Godefroy N., Lemaire C., Mignotte B., Vayssière JL. (2006). p53 and Retinoblastoma protein (pRb): a complex network of interactions. *Apoptosis* 11(5): 659-661.
- Gopalan SM., Flaim C., Bhatia SN., Hoshijima M., Knoell R., Chien KR., Omens JH., McCulloch AD. (2003). Anisotropic stretch-induced hypertrophy in neonatal ventricular myocytes micropatterned on deformable elastomers. *Biotechnol Bioeng* 81(5): 578-587.
- Gottlieb RA., Bursleson KO., Kloner RA., Babior BM., Engler RL. (1994). Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 94(4): 1621-1628.
- Grossman W., Jones D., McLaurin LP. (1975). Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 56(1): 56-64.

- Grünig S. (2009). Vergleich zwischen physiologisch versus pathologischer linksventrikulärer Hypertrophie - Eine Studie an drei Mausmodellen. Medizinische Fakultät, Julius–Maximilians–Universität zu Würzburg.
- Hancock JT., Desikan R., Neill SJ. (2001). Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans* 29(Pt 2): 345-350.
- Hattori T., Shimokawa H., Higashi M., Hiroki J., Mukai Y., Tsutsui H., Kaibuchi K., Takeshita A. (2004). Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation* 109(18): 2234-2239.
- Henzel MJ., Wei Y., Mancini MA., Van Hooser A., Ranalli T., Brinkley BR., Bazett-Jones DP., Allis CD. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106(6): 348-360.
- Hescheler J., Fleischmann BK., Wartenberg M., Bloch W., Kolossov E., Ji G., Addicks K., Sauer H. (1999). Establishment of ionic channels and signalling cascades in the embryonic stem cell-derived primitive endoderm and cardiovascular system. *Cells Tissues Organs* 165(3-4): 153-164.
- Higashi M., Shimokawa H., Hattori T., Hiroki J., Mukai Y., Morikawa K., Ichiki T., Takahashi S., Takeshita A. (2003). Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD(P)H oxidase system. *Circ Res* 93(8): 767-775.
- Hill JA., Rothermel B., Yoo KD., Cabuay B., Demetroulis E., Weiss RM., Kutschke W., Bassel-Duby R., Williams RS. (2002). Targeted inhibition of calcineurin in pressure-overload cardiac hypertrophy. Preservation of systolic function. *J Biol Chem* 277(12): 10251-10255.
- Hirao A., Kong YY., Matsuoka S., Wakeham A., Ruland J., Yoshida H., Liu D., Elledge SJ., Mak TW. (2000). DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 287(5459): 1824-1827.
- Hirsch-Kauffmann M., Schweiger M., Schweiger MR. (2009). Biologie und molekulare Medizin für Mediziner und Naturwissenschaftler. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Hitzler JK., Witte DP., Jenkins NA., Copeland NG., Gilbert DJ., Naeve CW., Look AT., Morris SW. (1999). cDNA cloning, expression pattern, and chromosomal localization of Mlf1, murine homologue of a gene involved in myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Am J Pathol* 155(1): 53-59.
- Ho KK., Pinsky JL., Kannel WB., Levy D. (1993). The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol* 22(4 Suppl A): 6a-13a.
- Hogan PG., Chen L., Nardone J., Rao A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17(18): 2205-2232.
- Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris CC. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253(5015): 49-53.
- Höltje M., Hoffmann A., Hofmann F., Mucke C., Grosse G., Van Rooijen N., Kettenmann H., Just I., Ahnert-Hilger G. (2005). Role of Rho GTPase in astrocyte morphology and migratory response during in vitro wound healing. *J Neurochem* 95(5): 1237-1248.
- Honda R., Tanaka H., Yasuda H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 420(1): 25-27.
- Hou J., Kang YJ. (2012). Regression of pathological cardiac hypertrophy: signaling pathways and therapeutic targets. *Pharmacol Ther* 135(3): 337-354.
- Hu YY., Zheng R., Guo C., Niu YM. (2014). Association between cyclin D1 G870A polymorphism and cervical cancer risk: a cumulative meta-analysis involving 2,864 patients and 3,898 controls. *Diagn Pathol* 9: 168.

- Huang LE., Bunn HF. (2003). Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance. *J Biol Chem* 278(22): 19575-19578.
- Hunter AM., LaCasse EC., Korneluk RG. (2007). The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis* 12(9): 1543-1568.
- Huppelsberg J., Walter K. (2005). *Kurzlehrbuch Physiologie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag
- Ishikawa Y., Katoh H., Negishi M. (2006). Small GTPase Rnd1 is involved in neuronal activity-dependent dendritic development in hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 400(3): 218-223.
- Jost PJ., Grabow S., Gray D., McKenzie MD., Nachbur U., Huang DC., Bouillet P., Thomas HE., Borner C., Silke J., Strasser A., Kaufmann T. (2009). XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature* 460(7258): 1035-1039.
- Juan G., Traganos F., James WM., Ray JM., Roberge M., Sauve DM., Anderson H., Darzynkiewicz Z. (1998). Histone H3 phosphorylation and expression of cyclins A and B1 measured in individual cells during their progression through G2 and mitosis. *Cytometry* 32(2): 71-77.
- Juo P., Kuo CJ., Yuan J., Blenis J. (1998). Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol* 8(18): 1001-1008.
- Kang PM., Haunstetter A., Aoki H., Usheva A., Izumo S. (2000). Morphological and molecular characterization of adult cardiomyocyte apoptosis during hypoxia and reoxygenation. *Circ Res* 87(2): 118-125.
- Kang TB., Ben-Moshe T., Varfolomeev EE., Pewzner-Jung Y., Yogev N., Jurewicz A., Waisman A., Brenner O., Haffner R., Gustafsson E., Ramakrishnan P., Lapidot T., Wallach D. (2004). Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles. *J Immunol* 173(5): 2976-2984.
- Kao HY. (2015). The actinin family proteins: biological function and clinical implications. *Cell Biosci* 5: 48.
- Karsner HT., Saphir O., Todd TW. (1925). The State of the Cardiac Muscle in Hypertrophy and Atrophy. *Am J Pathol* 1(4): 351-372.351.
- Katanasaka Y., Suzuki H., Sunagawa Y., Hasegawa K., Morimoto T. (2016). Regulation of Cardiac Transcription Factor GATA4 by Post-Translational Modification in Cardiomyocyte Hypertrophy and Heart Failure. *Int Heart J* 57(6): 672-675.
- Kazemi-Esfarjani P., Benzer S. (2002). Suppression of polyglutamine toxicity by a Drosophila homolog of myeloid leukemia factor 1. *Hum Mol Genet* 11(21): 2657-2672.
- Kehat I., Gepstein A., Spira A., Itskovitz-Eldor J., Gepstein L. (2002). High-resolution electrophysiological assessment of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: a novel in vitro model for the study of conduction. *Circ Res* 91(8): 659-661.
- Kessler-Icekson G., Barhum Y., Schaper J., Schaper W., Kaganovsky E., Brand T. (2002). ANP expression in the hypertensive heart. *Exp Clin Cardiol* 7(2-3): 80-84.
- Keyomarsi K., Herliczek TW. (1997). The role of cyclin E in cell proliferation, development and cancer. *Prog Cell Cycle Res* 3: 171-191.
- Kimura A. (2016). Molecular genetics and pathogenesis of cardiomyopathy. *J Hum Genet* 61(1): 41-50.
- Kingsbury TJ., Cunningham KW. (2000). A conserved family of calcineurin regulators. *Genes Dev* 14(13): 1595-1604.
- Knöll R. (2015). A role for membrane shape and information processing in cardiac physiology. *Pflugers Arch* 467(1): 167-173.
- Knöll R., Buyandelger B. (2013). Z-disc transcriptional coupling, sarcomeroptosis and mechanoptosis. *Cell Biochem Biophys* 66(1): 65-71.

- Knoll R., Hoshijima M., Chien K. (2003). Cardiac mechanotransduction and implications for heart disease. *J Mol Med (Berl.)* 81(12): 750-756.
- Knöll R., Hoshijima M., Hoffman HM., Person V., Lorenzen-Schmidt I., Bang ML., Hayashi T., Shiga N., Yasukawa H., Schaper W., McKenna W., Yokoyama M., Schork NJ., Omens JH., McCulloch AD., Kimura A., Gregorio CC., Poller W., Schaper J., Schultzeiss HP., Chien KR. (2002). The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell* 111(7): 943-955.
- Knöll R., Kostin S., Klede S., Savvatis K., Klinge L., Stehle I., Gunkel S., Kötter S., Babicz K., Sohns M., Miocic S., Didié M., Knöll G., Zimmermann WH., Thelen P., Bickeböller H., Maier LS., Schaper W., Schaper J., Kraft T., Tschöpe C., Linke WA., Chien KR. (2010). A common MLP (muscle LIM protein) variant is associated with cardiomyopathy. *Circ Res* 106(4): 695-704.
- Kobayashi N., Horinaka S., Mita S., Nakano S., Honda T., Yoshida K., Kobayashi T., Matsuoka H. (2002). Critical role of Rho-kinase pathway for cardiac performance and remodeling in failing rat hearts. *Cardiovasc Res* 55(4): 757-767.
- Koch SE., Mann A., Jones S., Robbins N., Alkhattabi A., Worley MC., Gao X., Lasko-Roiniotis VM., Karani R., Fulford L., Jiang M., Nieman M., Lorenz JN., Rubinstein J. (2017). Transient receptor potential vanilloid 2 function regulates cardiac hypertrophy via stretch-induced activation. *J Hypertens* 35(3): 602-611.
- Komuro I., Katoh Y., Hoh E., Takaku F., Yazaki Y. (1991). Mechanisms of cardiac hypertrophy and injury--possible role of protein kinase C activation. *Jpn Circ J* 55(11): 1149-1157.
- Kong Y., Flick MJ., Kudla AJ., Konieczny SF. (1997). Muscle LIM protein promotes myogenesis by enhancing the activity of MyoD. *Mol Cell Biol* 17(8): 4750-4760.
- Ku HC., Lee SY., Wu YA., Yang KC., Su MJ. (2016). A Model of Cardiac Remodeling Through Constriction of the Abdominal Aorta in Rats. *J Vis Exp* (118).
- Landstrom AP., Kellen CA., Dixit SS., van Oort RJ., Garbino A., Weisleder N., Ma J., Wehrens XH., Ackerman MJ. (2011). Junctophilin-2 expression silencing causes cardiocyte hypertrophy and abnormal intracellular calcium-handling. *Circ Heart Fail* 4(2): 214-223.
- Ledda-Columbano GM., Molotzu F., Pibiri M., Cossu C., Perra A., Columbano A. (2006). Thyroid hormone induces cyclin D1 nuclear translocation and DNA synthesis in adult rat cardiomyocytes. *FASEB J* 20(1): 87-94.
- Lee HR., Henderson SA., Reynolds R., Dunnmon P., Yuan D., Chien KR. (1988). Alpha 1-adrenergic stimulation of cardiac gene transcription in neonatal rat myocardial cells. Effects on myosin light chain-2 gene expression. *J Biol Chem* 263(15): 7352-7358.
- Lemaire C., Godefroy N., Costina-Parvu I., Rincheval V., Renaud F., Trotot P., Bouleau S., Mignotte B., Vayssière JL. (2005). Caspase-9 can antagonize p53-induced apoptosis by generating a p76(Rb) truncated form of Rb. *Oncogene* 24(20): 3297-3308.
- Lesniak W., Schaefer C., Grueninger S., Chiesi M. (1995). Effect of alpha adrenergic stimulation and carnitine palmitoyl transferase I inhibition on hypertrophying adult rat cardiomyocytes in culture. *Mol Cell Biochem* 142(1): 25-34.
- Levine AJ. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88(3): 323-331.
- Levy D., Garrison RJ., Savage DD., Kannel WB., Castelli WP. (1990). Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 322(22): 1561-1566.
- Li H., Zhang Y., Wu Q. (2016). Role of corin in the regulation of blood pressure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*.

- Li YH., Ghavampur S., Bondallaz P., Will L., Grenningloh G., Püschel AW. (2009). Rnd1 regulates axon extension by enhancing the microtubule destabilizing activity of SCG10. *J Biol Chem* 284(1): 363-371.
- Li ZF., Wu X., Jiang Y., Liu J., Wu C., Inagaki M., Izawa I., Mizisin AP., Engvall E., Shelton GD. (2008). Non-pathogenic protein aggregates in skeletal muscle in MLF1 transgenic mice. *J Neurol Sci* 264(1-2): 77-86.
- Liao Y., Ishikura F., Beppu S., Asakura M., Takashima S., Asanuma H., Sanada S., Kim J., Ogita H., Kuzuya T., Node K., Kitakaze M., Hori M. (2002). Echocardiographic assessment of LV hypertrophy and function in aortic-banded mice: necropsy validation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282(5): H1703-1708.
- Linz W., Schölkens BA., Ganten D. (1989). Converting Enzyme Inhibition Specifically Prevents the Development and Induces Regression of Cardiac Hypertrophy in Rats. *Clin Exp Hypertens A* 11(7): 1325-1350.
- Litten RZ. 3rd, Martin BJ., Low RB., Alpert NR. (1982). Altered myosin isozyme patterns from pressure-overloaded and thyrotoxic hypertrophied rabbit hearts. *Circ Res* 50(6): 856-864.
- Liu R., Molkentin JD. (2016). Regulation of cardiac hypertrophy and remodeling through the dual-specificity MAPK phosphatases (DUSPs). *J Mol Cell Cardiol* 101: 44-49.
- Luchner A., Holmer S., Schunkert H., Riegger GA. (2003). Bedeutung der Herzinsuffizienzmarker BNP und NT-proBNP für die Klinik. *Deutsches Ärzteblatt*: 100: A 3314–3321 (Heft 3350).
- Lukas J., Bartkova J., Bartek J. (1996). Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin-dependent kinase-pRb-controlled G1 checkpoint. *Mol Cell Biol* 16(12): 6917-6925.
- Lüllmann-Rauch R. (2015). Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Maillet M., van Berlo JH., Molkentin JD. (2013). Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(1): 38-48.
- Mancia G., Fagard R., Narkiewicz K., Redón J., Zanchetti A., Böhm M., Christiaens T., Cifkova R., De Backer G., Dominiczak A., Galderisi M., Grobbee DE., Jaarsma T., Kirchhof P., Kjeldsen SE., Laurent S., Manolis AJ., Nilsson PM., Ruilope LM., Schmieder RE., Sirnes PA., Sleight P., Viigimaa M., Waeber B., Zannad F; Task Force Members. (2013). 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens* 31(7): 1281-1357.
- Martins CP., Berns A. (2002). Loss of p27(Kip1) but not p21(Cip1) decreases survival and synergizes with MYC in murine lymphomagenesis. *EMBO J* 21(14): 3739-3748.
- Matsumoto N., Yoneda-Kato N., Iguchi T., Kishimoto Y., Kyo T., Sawada H., Tatsumi E., Fukuhara S. (2000). Elevated MLF1 expression correlates with malignant progression from myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 14(10): 1757-1765.
- Matsushime H., Quelle DE., Shurtleff SA., Shibuya M., Sherr CJ., Kato JY. (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 14(3): 2066-2076.
- Maury S., Litvinova E., Boyer O., Benard L., Bruel S., Klatzmann D., Cohen JL. (2002). Effect of combined cytostatic cyclosporin A and cytolytic suicide gene therapy on the prevention of experimental graft-versus-host disease. *Gene Ther* 9(3): 201-207.
- McIlwain DR., Berger T., Mak TW. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspec Biol* 5(4): a008656.
- Merry AH., Boer JM., Schouten LJ., Feskens EJ., Verschuren WM., Gorgels AP., van den Brandt PA. (2009). Validity of coronary heart diseases and heart failure based on hospital

- discharge and mortality data in the Netherlands using the cardiovascular registry Maastricht cohort study. *Eur J Epidemiol* 24(5): 237-247.
- Miano JM. (2010). Role of serum response factor in the pathogenesis of disease. *Lab Invest* 90(9): 1274-1284.
- Miano JM., Long X., Fujiwara K. (2007). Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *Am J Physiol Cell Physiol* 292(1): C70-C81.
- Miano JM., Ramanan N., Georger MA., de Mesy Bentley KL., Emerson RL., Balza RO. Jr., Xiao Q., Weiler H., Ginty DD., Misra RP. (2004). Restricted inactivation of serum response factor to the cardiovascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(49): 17132-17137.
- Mihl, C., et al. (2008). Cardiac remodelling: concentric versus eccentric hypertrophy in strength and endurance athletes. *Netherlands heart journal* 16(4): 129-133.
- Milano CA., Dolber PC., Rockman HA., Bond RA., Venable ME., Allen LF., Lefkowitz RJ. (1994). Myocardial expression of a constitutively active alpha 1B-adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(21): 10109-10113.
- Miyashita T., Krajewski S., Krajewska M., Wang HG., Lin HK., Liebermann DA., Hoffman B., Reed JC. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9(6): 1799-1805.
- Moalic JM., Bauters C., Himbert D., Bercovici J., Mouas C., Guicheney P., Baudoin-Legros M., Rappaport L., Emanoil-Ravier R., Mezger V. (1989). Phenylephrine, vasopressin and angiotensin II as determinants of proto-oncogene and heat-shock protein gene expression in adult rat heart and aorta. *J Hypertens* 7(3): 195-201.
- Molkentin JD., Lu JR., Antos CL., Markham B., Richardson J., Robbins J., Grant SR., Olson EN. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93(2): 215-228.
- Montrobert A. (2010). Vergleich der Apoptoseaktivierung anhand der Caspase-3 Verteilung in einer Gliomzelllinie und Astrozytenkultur nach Inkubation mit TNF- α und PKC-Inhibitoren. Medizinische Fakultät, Ruhr-Universität Bochum.
- Mori T., Chen YF., Feng JA., Hayashi T., Oparil S., Perry GJ. (2004). Volume overload results in exaggerated cardiac hypertrophy in the atrial natriuretic peptide knockout mouse. *Cardiovasc Res* 61(4): 771-779.
- Mulero MC., Aubareda A., Orzáez M., Messeguer J., Serrano-Candelas E., Martínez-Hoyer S., Messeguer A., Pérez-Payá E., Pérez-Riba M. (2009). Inhibiting the calcineurin-NFAT (nuclear factor of activated T cells) signaling pathway with a regulator of calcineurin-derived peptide without affecting general calcineurin phosphatase activity. *J Biol Chem* 284(14): 9394-9401.
- Müller-Esterl W., Brandt U., Anderka O., Kerscher S., Kieß S., Ridinger K. (2011). *Biochemie: eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Heidelberg, Spektrum, Akad. Verl.
- Müller M. (2004). Survivin und seine alternativen Spleißvarianten: Untersuchungen zu ihrer Bedeutung für eine Zytostatika-induzierte Apoptose und ihren molekularen Interaktionspartnern. Medizinische Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Muralidhar S., Xiao F., Thet S., Sadek H. (2014). Mif1 regulates myocyte proliferation in postnatal hearts. *Circulation* 130, A20492.
- Murphy JM., Silke J. (2014). *Ars Moriendi; the art of dying well - new insights into the molecular pathways of necroptotic cell death*. *EMBO Rep* 15(2): 155-164.

- Nakamura A., Rokosh DG., Paccanaro M., Yee RR., Simpson PC., Grossman W., Foster E. (2001). LV systolic performance improves with development of hypertrophy after transverse aortic constriction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281(3): H1104-1112.
- Nakayama M., Takeda M., Asaumi Y., Shimokawa H. (2014). Identification and visualization of stimulus-specific transcriptional activity in cardiac hypertrophy in mice. *Int J Cardiovasc Imaging* 30(1): 211-219.
- Nasr MR., El-Zammar O. (2008). Comparison of pHH3, Ki-67, and survivin immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol* 30(2): 117-122.
- Nehra S., Bhardwaj V., Kar S., Saraswat D. (2016). Chronic Hypobaric Hypoxia Induces Right Ventricular Hypertrophy and Apoptosis in Rats: Therapeutic Potential of Nanocurcumin in Improving Adaptation. *High Alt Med Biol* 17(4): 342-352.
- Nelson TJ., Balza R. Jr., Xiao Q., Misra RP. (2005). SRF-dependent gene expression in isolated cardiomyocytes: regulation of genes involved in cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 39(3): 479-489.
- Neumann T., Biermann J., Erbel R., Neumann A., Wasem J., Ertl G., Dietz R. (2009). Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives. *Dtsch Arztebl Int* 106(16): 269-275.
- Newton K., Sun X., Dixit VM. (2004). Kinase RIP3 is dispensable for normal NF-kappa Bs, signaling by the B-cell and T-cell receptors, tumor necrosis factor receptor 1, and Toll-like receptors 2 and 4. *Mol Cell Biol* 24(4): 1464-1469.
- Nicholson DW., Ali A., Thornberry NA., Vaillancourt JP., Ding CK., Gallant M., Gareau Y., Griffin PR., Labelle M., Lazebnik YA. (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376(6535): 37-43.
- Nielsen PS., Riber-Hansen R., Jensen TO., Schmidt H., Steiniche T. (2013). Proliferation indices of phosphohistone H3 and Ki67: strong prognostic markers in a consecutive cohort with stage I/II melanoma. *Mod Pathol* 26(3): 404-413.
- Nishida M., Maruyama Y., Tanaka R., Kontani K., Nagao T., Kurose H. (2000). G alpha(i) and G alpha(o) are target proteins of reactive oxygen species. *Nature* 408(6811): 492-495.
- Nishimura Y., Morikawa Y., Kondo C., Tonomura Y., Fukushima R., Torii M., Uehara T. (2013). Genomic biomarkers for cardiotoxicity in rats as a sensitive tool in preclinical studies. *J Appl Toxicol* 33(10): 1120-1130.
- Nobes CD., Lauritzen I., Mattei MG., Paris S., Hall A., Chardin P. (1998). A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J Cell Biol* 141(1): 187-197.
- Noma K., Oyama N., Liao JK. (2006). Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 290(3): C661-C668.
- O'Connell TD., Ishizaka S., Nakamura A., Swigart PM., Rodrigo MC., Simpson GL., Cotecchia S., Rokosh DG., Grossman W., Foster E., Simpson PC. (2003). The alpha(1A/C)- and alpha(1B)-adrenergic receptors are required for physiological cardiac hypertrophy in the double-knockout mouse. *J Clin Invest* 111(11): 1783-1791.
- Okada T., et al. (2015). The Rho GTPase Rnd1 suppresses mammary tumorigenesis and EMT by restraining Ras-MAPK signalling. *Nature cell biology* 17(1): 81-94.
- Oliver, FJ., de la Rubia G., Rolli V., Ruiz-Ruiz MC., de Murcia G., Murcia JM. (1998). Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J Biol Chem* 273(50): 33533-33539.
- Otey CA., Carpen O. (2004). Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton* 58(2): 104-111.

- Pan Y., Jiang L., Lin H., Cheng H. (2016). Cell death affected by dental alloys: Modes and mechanisms. *Dent Mater J*.
- Pandya K., Pulli B., Bultman S., Smithies O. (2010). Reversible epigenetic modifications of the two cardiac myosin heavy chain genes during changes in expression. *Gene Expr* 15(2): 51-59.
- Panther F., Williams T., Ritter O. (2009). Inhibition of the calcineurin-NFAT signalling cascade in the treatment of heart failure. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 4(3): 180-186.
- Parlakian A., Tuil D., Hamard G., Tavernier G., Hentzen D., Concordet JP., Paulin D., Li Z., Daegelen D. (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.
- Pasumarthi KB., Nakajima H., Nakajima HO., Soonpaa MH., Field LJ. (2005). Targeted expression of cyclin D2 results in cardiomyocyte DNA synthesis and infarct regression in transgenic mice. *Circ Res* 96(1): 110-118.
- Pavletich NP. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 287(5): 821-828.
- Penault-Llorca F., Radosevic-Robin N. (2017). Ki67 assessment in breast cancer: an update. *Pathology* 49(2):166-171.
- Perera RK., Sprenger JU., Steinbrecher JH., Hübscher D., Lehnart SE., Abesser M., Schuh K., El-Armouche A., Nikolaev VO. (2015). Microdomain switch of cGMP-regulated phosphodiesterases leads to ANP-induced augmentation of beta-adrenoceptor-stimulated contractility in early cardiac hypertrophy. *Circ Res* 116(8): 1304-1311.
- Peters U., Solominidou E., Korkmaz Y., Rüttermann S., Klocke A., Flemmig TF., Beikler T. (2016). Regulator of Calcineurin 1 in Periodontal Disease. *Mediators Inflamm* 2016: 5475821.
- Pfeffer MA. (2003). Cardiac function and heart failure. *J Am Coll Cardiol* 42(2): 390-392.
- Pflugrad U. (2005). Identifizierung und Charakterisierung Hypoxie-abhängig regulierter Gene in Prostata-Tumorzelllinien und primären Prostata-Epithelzellen. Medizinische Fakultät, Freie Universität Berlin.
- Pieperhoff S., Rickelt S., Heid H., Claycomb WC., Zimbelmann R., Kuhn C., Winter-Simanowski S., Kuhn C., Frey N., Franke WW. (2012). The plaque protein myozap identified as a novel major component of adhering junctions in endothelia of the blood and the lymph vascular systems. *J Cell Mol Med* 16(8): 1709-1719.
- Pinotsis N., Petoukhov M., Lange S., Svergun D., Zou P., Gautel M., Wilmanns M. (2006). Evidence for a dimeric assembly of two titin/telethonin complexes induced by the telethonin C-terminus. *J Struct Biol* 155(2): 239-250.
- Pluim BM., Zwinderman AH., van der Laarse A., van der Wall EE. (2000). The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation* 101(3): 336-344.
- Pott J. (2017). Mlf1 und Rnd1 – Zwei stretch-abhängig regulierte Gene und ihr Einfluss auf die kardiale Hypertrophie. Medizinische Fakultät, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Raftopoulou M., Hall A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 265(1): 23-32.
- Rangrez AY., Bernt A., Poyanmehr R., Harazin V., Boomgaarden I., Kuhn C., Rohrbeck A., Frank D., Frey N. (2013). Dysbindin is a potent inducer of RhoA-SRF-mediated cardiomyocyte hypertrophy. *J Cell Biol* 203(4): 643-656.
- Rangrez AY., Eden M., Poyanmehr R., Kuhn C., Stiebeling K., Dierck F., Bernt A., Lüllmann-Rauch R., Weiler H., Kirchof P., Frank D., Frey N. (2016). Myozap Deficiency Promotes Adverse Cardiac Remodeling via Differential Regulation of Mitogen-activated Protein

- Kinase/Serum-response Factor and beta-Catenin/GSK-3beta Protein Signaling. *J Biol Chem* 291(8): 4128-4143.
- Rangrez AY., Pott J., Kluge A., Frauen R., Stiebeling K., Hoppe P., Sossalla S., Frey N., Frank D. (2017). Myeloid leukemia factor-1 is a novel modulator of neonatal rat cardiomyocyte proliferation. *Biochim Biophys Acta*.
- Rappaport L., Samuel JL., Bertier B., Bugaisky L., Marotte F., Mercadier A., Schwartz K. (1984). Isomyosins, microtubules and desmin during the onset of cardiac hypertrophy in the rat. *Eur Heart J* 5 Suppl F: 243-250.
- Rassow J., Hauser K., Netzker R., Deutzmann R. (2016). *Duale Reihe Biochemie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Rickelt S., Kuhn C., Winter-Simanowski S., Zimbelmann R., Frey N., Franke WW. (2011). Protein myozap--a late addition to the molecular ensembles of various kinds of adherens junctions. *Cell Tissue Res* 346(3): 347-359.
- Riedl SJ., Shi Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(11): 897-907.
- Riou P., Villalonga P., Ridley AJ. (2010). Rnd proteins: multifunctional regulators of the cytoskeleton and cell cycle progression. *Bioessays* 32(11): 986-992.
- Ritter O., Hack S., Schuh K., Röthlein N., Perrot A., Osterziel KJ., Schulte HD., Neyses L. (2002). Calcineurin in human heart hypertrophy. *Circulation* 105(19): 2265-2269.
- Robson RM., Goll DE., Arakawa N., Stromer MH. (1970). Purification and properties of alpha-actinin from rabbit skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 200(2): 296-318.
- Rosenberg B., VanCamp L., Trosko JE., Mansour VH. (1969). Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* 222(5191): 385-386.
- Rothermel BA., McKinsey TA., Vega RB., Nicol RL., Mammen P., Yang J., Antos CL., Shelton JM., Bassel-Duby R., Olson EN., Williams RS. (2001). Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6): 3328-3333.
- Roussel MF. (1999). The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* 18(38): 5311-5317.
- Russell B., Curtis MW., Koshman YE., Samarel AM. (2010). Mechanical stress-induced sarcomere assembly for cardiac muscle growth in length and width. *J Mol Cell Cardiol* 48(5): 817-823.
- Ruwhof C., van der Laarse A. (2000a). Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res* 47(1): 23-37.
- Ruwhof C., van Wamel AE., Egas JM., van der Laarse A. (2000b). Cyclic stretch induces the release of growth promoting factors from cultured neonatal cardiomyocytes and cardiac fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 208(1-2): 89-98.
- Sadler T. (2008). *Medizinische Embryologie*, Georg Thieme Verlag.
- Sadoshima J., Izumo S. (1993a). Mechanotransduction in stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes. *J Recept Res* 13(1-4): 777-794.
- Sadoshima J., Jahn L., Takahashi T., Kulik TJ., Izumo S. (1992). Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 267(15): 10551-10560.
- Sadoshima J., Xu Y., Slayter HS., Izumo S. (1993b). Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 75(5): 977-984.
- Samraj AK., Keil E., Ueffing N., Schulze-Osthoff K., Schmitz I. (2006). Loss of caspase-9 provides genetic evidence for the type I/II concept of CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 281(40): 29652-29659.

- Sasaki K., Murakami T., Kawasaki M., Takahashi M. (1987). The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol* 133(3): 579-584.
- Satoh MS., Lindahl T. (1992). Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature* 356(6367): 356-358.
- Schirmer H., Lunde P., Rasmussen K. (1999). Prevalence of left ventricular hypertrophy in a general population; The Tromso Study. *Eur Heart J* 20(6): 429-438.
- Scholzen T., Gerdes J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182(3): 311-322.
- Schwab SG., Knapp M., Mondabon S., Hallmayer J., Borrmann-Hassenbach M., Albus M., Lerer B., Rietschel M., Trixler M., Maier W., Wildenauer DB. (2003). Support for association of schizophrenia with genetic variation in the 6p22.3 gene, dysbindin, in sib-pair families with linkage and in an additional sample of triad families. *Am J Hum Genet* 72(1): 185-190.
- Seeger TS., Frank D., Rohr C., Will R., Just S., Grund C., Lyon R., Luedde M., Koegl M., Sheikh F., Rottbauer W., Franke WW., Katus HA., Olson EN., Frey N. (2010). Myozap, a novel intercalated disc protein, activates serum response factor-dependent signaling and is required to maintain cardiac function in vivo. *Circ Res* 106(5): 880-890.
- Sequeira V., Nijenkamp LL., Regan JA., van der Velden J. (2014). The physiological role of cardiac cytoskeleton and its alterations in heart failure. *Biochim Biophys Acta* 1838(2): 700-722.
- Shah NG., Trivedi TI., Tankshali RA., Goswami JV., Jetly DH., Shukla SN., Shah PM., Verma RJ. (2009). Prognostic significance of molecular markers in oral squamous cell carcinoma: a multivariate analysis. *Head Neck* 31(12): 1544-1556.
- Sherr CJ. (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274(5293): 1672-1677.
- Shi CS., Kehrl JH. (2016). Cytochrome c Negatively Regulates NLRP3 Inflammasomes. *PLoS One* 11(12): e0167636.
- Shieh SY., Ikeda M., Taya Y., Prives C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91(3): 325-334.
- Shieh SY., Taya Y., Prives C. (1999). DNA damage-inducible phosphorylation of p53 at N-terminal sites including a novel site, Ser20, requires tetramerization. *EMBO J* 18(7): 1815-1823.
- Shiozaki EN., Chai J., Shi Y. (2002). Oligomerization and activation of caspase-9, induced by Apaf-1 CARD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(7): 4197-4202.
- Simpson P. (1983). Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha 1 adrenergic response. *J Clin Invest* 72(2): 732-738.
- Simpson P. (1985). Stimulation of hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells through an alpha 1-adrenergic receptor and induction of beating through an alpha 1- and beta 1-adrenergic receptor interaction. Evidence for independent regulation of growth and beating. *Circ Res* 56(6): 884-894.
- Simpson PC. (1999). Beta-protein kinase C and hypertrophic signaling in human heart failure. *Circulation* 99(3): 334-337.
- Snir M., Kehat I., Gepstein A., Coleman R., Itskovitz-Eldor J., Livne E., Gepstein L. (2003). Assessment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285(6): H2355-H2363.
- Soonpaa MH., Field LJ. (1998). Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ Res* 83(1): 15-26.
- Sorimachi H., Freiburg A., Kolmerer B., Ishiura S., Stier G., Gregorio CC., Labeit D., Linke WA., Suzuki K., Labeit S. (1997). Tissue-specific expression and alpha-actinin binding

- properties of the Z-disc titin: implications for the nature of vertebrate Z-discs. *J Mol Biol* 270(5): 688-695.
- Spencer SL., Gaudet S., Albeck JG., Burke JM., Sorger PK. (2009). Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis. *Nature* 459(7245): 428-432.
- Stephanou A., Brar BK., Scarabelli TM., Jonassen AK., Yellon DM., Marber MS., Knight RA., Latchman DS. (2000). Ischemia-induced STAT-1 expression and activation play a critical role in cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem* 275(14): 10002-10008.
- Sun Y., Fu A., Xu W., Chao JR., Moshiah S., Morris SW. (2015). Myeloid leukemia factor 1 interfered with Bcl-XL to promote apoptosis and its function was regulated by 14-3-3. *J Physiol Biochem* 71(4): 807-821.
- Talbot K., Louneva N., Cohen JW., Kazi H., Blake DJ., Arnold SE. (2011). Synaptic dysbindin-1 reductions in schizophrenia occur in an isoform-specific manner indicating their subsynaptic location. *PLoS One* 6(3): e16886.
- Tamamori-Adachi M., Ito H., Sumrejkanchanakij P., Adachi S., Hiroe M., Shimizu M., Kawauchi J., Sunamori M., Marumo F., Kitajima S., Ikeda MA. (2003). Critical role of cyclin D1 nuclear import in cardiomyocyte proliferation. *Circ Res* 92(1): e12-e19.
- Tewari M., Quan LT., O'Rourke K., Desnoyers S., Zeng Z., Beidler DR., Poirier GG., Salvesen GS., Dixit VM. (1995). Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81(5): 801-809.
- Thews G., Mutschler E., Vaupel P. (1991). *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. Stuttgart, Wiss. Verl.-Ges.
- Thews G., Vaupel P. (2005). *Vegetative Physiologie*. Heidelberg, Springer Verlag.
- Tobita K., Liu LJ., Janczewski AM., Tinney JP., Nonemaker JM., Augustine S., Stolz DB., Shroff SG., Keller BB. (2006). Engineered early embryonic cardiac tissue retains proliferative and contractile properties of developing embryonic myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(4): H1829-H1837.
- Tolias KF., Duman JG., Um K. (2011). Control of synapse development and plasticity by Rho GTPase regulatory proteins. *Prog Neurobiol* 94(2): 133-148.
- Trepast X., Deng L., An SS., Navajas D., Tschumperlin DJ., Gerthoffer WT., Butler JP., Fredberg JJ. (2007). Universal physical responses to stretch in the living cell. *Nature* 447(7144): 592-595.
- Turan RD., Aslan GS., Yücel D., Döğler R., Kocabaş F. (2016). Evolving approaches to heart regeneration by therapeutic stimulation of resident cardiomyocyte cell cycle. *Anatol J Cardiol* 16(11): 881-886.
- Ueno H., Perryman MB., Roberts R., Schneider MD. (1988). Differentiation of cardiac myocytes after mitogen withdrawal exhibits three sequential states of the ventricular growth response. *J Cell Biol* 107(5): 1911-1918.
- Urbanek K., Quaini F., Tasca G., Torella D., Castaldo C., Nadal-Ginard B., Leri A., Kajstura J., Quaini E., Anversa P. (2003). Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(18): 10440-10445.
- van Wamel AJ., Ruwhof C., van der Valk-Kokshoorn LJ., Schrier PI., van der Laarse A. (2000a). Rapid effects of stretched myocardial and vascular cells on gene expression of neonatal rat cardiomyocytes with emphasis on autocrine and paracrine mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 381(1): 67-73.
- van Wamel JE., Ruwhof C., van der Valk-Kokshoorn EJ., Schrier PI., van der Laarse A. (2000b). Rapid gene transcription induced by stretch in cardiac myocytes and fibroblasts and

- their paracrine influence on stationary myocytes and fibroblasts. *Pflügers Arch* 439(6): 781-788.
- Vanden Berghe T., Vanlangenakker N., Parthoens E., Deckers W., Devos M., Festjens N., Guerin C.J., Brunk UT., Declercq W., Vandenabeele P. (2010). Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ* 17(6): 922-930.
- Varfolomeev EE., Schuchmann M., Luria V., Chiannikulchai N., Beckmann JS., Mett IL., Rebrikov D., Brodianski VM., Kemper OC., Kollet O., Lapidot T., Soffer D., Sobe T., Avraham KB., Goncharov T., Holtmann H., Lonai P., Wallach D. (1998). Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 9(2): 267-276.
- Viale G., Regan MM., Mastropasqua MG., Maffini F., Maiorano E., Colleoni M., Price KN., Golouh R., Perin T., Brown RW., Kovács A., Pillay K., Ohlschlegel C., Gusterson BA., Castiglione-Gertsch M., Gelber RD., Goldhirsch A., Coates AS.; International Breast Cancer Study Group. (2008). Predictive value of tumor Ki-67 expression in two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 100(3): 207-212.
- Wandler A., Spaun E., Steiniche T., Nielsen PS. (2016). Automated quantification of Ki67/MART1 stains may prevent false-negative melanoma diagnoses. *J Cutan Pathol* 43(11): 956-962.
- Wang D., Gladysheva IP., Fan TH., Sullivan R., Houg AK., Reed GL. (2014). Atrial natriuretic peptide affects cardiac remodeling, function, heart failure, and survival in a mouse model of dilated cardiomyopathy. *Hypertension* 63(3): 514-519.
- Wang TJ., Larson MG., Levy D., Benjamin EJ., Leip EP., Omland T., Wolf PA., Vasan RS. (2004). Plasma natriuretic peptide levels and the risk of cardiovascular events and death. *N Engl J Med* 350(7): 655-663.
- Wang Z., Schmull S., Zheng H., Shan J., Zou R., Xue S. (2017). Ascending Aortic Constriction Promotes Cardiomyocyte Proliferation in Neonatal Rats. *Int Heart J*.
- Wanke F. (2010). Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen nach kombinierter Einwirkung von Cisplatin und Bestrahlung auf eukaryote Zellen. Medizinische Fakultät, Georg-August-Universität zu Göttingen.
- Weber KT., Brilla CG. (1993). Structural basis for pathologic left ventricular hypertrophy. *Clin Cardiol* 16(5 Suppl 2): li10-li14.
- Weeds A. (2013). Hugh Huxley (1924-2013). *Nature* 500(7464): 530.
- Wei MC., Lindsten T., Mootha VK., Weiler S., Gross A., Ashiya M., Thompson CB., Korsmeyer SJ. (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 14(16): 2060-2071.
- Weins A., Schwarz K., Faul C., Barisoni L., Linke WA., Mundel P. (2001). Differentiation- and stress-dependent nuclear cytoplasmic redistribution of myopodin, a novel actin-bundling protein. *J Cell Biol* 155(3): 393-404.
- Wilkins BJ., Dai YS., Bueno OF., Parsons SA., Xu J., Plank DM., Jones F., Kimball TR., Molkentin JD. (2004). Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res* 94(1): 110-118.
- Williams DJ., Cohen C., Darrow M., Page AJ., Chastain B., Adams AL. (2011). Proliferation (Ki-67 and phosphohistone H3) and oncotype DX recurrence score in estrogen receptor-positive breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 19(5): 431-436.
- Wu CL., Zukerberg LR., Ngwu C., Harlow E., Lees JA. (1995). In vivo association of E2F and DP family proteins. *Mol Cell Biol* 15(5): 2536-2546.

- Xiang G., Yi Y., Weiwei H., Weiming W. (2016). RND1 is up-regulated in esophageal squamous cell carcinoma and promotes the growth and migration of cancer cells. *Tumour Biol* 37(1): 773-779.
- Yamazaki T., Komuro I., Kudoh S., Zou Y., Shiojima I., Hiroi Y., Mizuno T., Maemura K., Kurihara H., Aikawa R., Takano H., Yazaki Y. (1996). Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 271(6): 3221-3228.
- Yanagida T., Ishii Y. (2012). Muscle contraction mechanism based on single molecule measurements. *J Muscle Res Cell Motil* 33(6): 395-402.
- Yang J., Rothermel B., Vega RB., Frey N., McKinsey TA., Olson EN., Bassel-Duby R., Williams RS. (2000). Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ Res* 87(12): E61-E68.
- Yang YJ., Chen W., Edgar A., Li B., Molkenstein JD., Berman JN., Lin TJ. (2009). Rcan1 negatively regulates Fc epsilonRI-mediated signaling and mast cell function. *J Exp Med* 206(1): 195-207.
- Yaoita H., Sakabe A., Maehara K., Maruyama Y. (2002). Different effects of carvedilol, metoprolol, and propranolol on left ventricular remodeling after coronary stenosis or after permanent coronary occlusion in rats. *Circulation* 105(8): 975-980.
- Yoneda-Kato N., Fukuhara S., Kato J. (1999). Apoptosis induced by the myelodysplastic syndrome-associated NPM-MLF1 chimeric protein. *Oncogene* 18(25): 3716-3724.
- Yoneda-Kato N., Kato JY. (2008). Shuttling imbalance of MLF1 results in p53 instability and increases susceptibility to oncogenic transformation. *Mol Cell Biol* 28(1): 422-434.
- Yoneda-Kato N., Look AT., Kirstein MN., Valentine MB., Raimondi SC., Cohen KJ., Carroll AJ., Morris SW. (1996). The t(3;5)(q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, NPM-MLF1. *Oncogene* 12(2): 265-275.
- Yoneda-Kato N., Tomoda K., Umehara M., Arata Y., Kato JY. (2005). Myeloid leukemia factor 1 regulates p53 by suppressing COP1 via COP9 signalosome subunit 3. *EMBO J* 24(9): 1739-1749.
- Zablocki D., Sadoshima J. (2013). Solving the cardiac hypertrophy riddle: The angiotensin II-mechanical stress connection. *Circ Res* 113(11): 1192-1195.
- Zak R. (1983). Cardiac hypertrophy: biochemical and cellular relationships. *Hosp Pract (Off Ed)* 18(3): 85-97.
- Zhang X., Azhar G., Chai J., Sheridan P., Nagano K., Brown T., Yang J., Khrapko K., Borrás AM., Lawitts J., Misra RP., Wei JY. (2001a). Cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of serum response factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280(4): H1782-H1792.
- Zhang X., Chai J., Azhar G., Sheridan P., Borrás AM., Furr MC., Khrapko K., Lawitts J., Misra RP., Wei JY. (2001b). Early postnatal cardiac changes and premature death in transgenic mice overexpressing a mutant form of serum response factor. *J Biol Chem* 276(43): 40033-40040.
- Zheng D., Wang G., Li S., Fan GC., Peng T. (2015). Calpain-1 induces endoplasmic reticulum stress in promoting cardiomyocyte apoptosis following hypoxia/reoxygenation. *Biochim Biophys Acta* 1852(5): 882-892.
- Zhu P., Zhang CB., Yang P., Chen J., Liu YQ., Hu HM., Huang H., Bao ZS., Zhang W., Kong WJ., Jiang T. (2016). Phosphohistone H3 (pHH3) is a prognostic and epithelial to mesenchymal transition marker in diffuse gliomas. *Oncotarget* 7(29): 45005-45014.
- Zhuang J., Yamada KA., Saffitz JE., Kléber AG. (2000). Pulsatile stretch remodels cell-to-cell communication in cultured myocytes. *Circ Res* 87(4): 316-322.

- Zogbi C., Satri de Carvalho AE., Nakamuta JS., Caceres Vde M., Prando S., Giorgi MC., Rochitte CE., Meneghetti JC., Krieger JE. (2014). Early postnatal rat ventricle resection leads to long-term preserved cardiac function despite tissue hypoperfusion. *Physiol Rep* 2(8).
- Zou Y., Akazawa H., Qin Y., Sano M., Takano H., Minamino T., Makita N., Iwanaga K., Zhu W., Kudoh S., Toko H., Tamura K., Kihara M., Nagai T., Fukamizu A., Umemura S., Iiri T., Fujita T., Komuro I. (2004). Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nat Cell Biol* 6(6): 499-506.
- Zou Y., Komuro I. (2001). The mutants of calcineurin transgenic mice. *Clin Calcium* 11(6): 767-769.

7 Veröffentlichungen

M. Kamrath, J. Gantenberg, **A. Kluge**, J. Pott, K. Stiebeling, P. Hoppe, I. Boomgaarden, N. Frey, D. Frank; Phasic biomechanical stretch leads to regulation of a specific subset of microRNAs including miR-146a; Poster, DGK Jahrestagung 2015, Mannheim

J. Pott¹, **A. Kluge**¹, R. Frauen, A. Bernt, A.Y. Rangrez, I. Boomgaarden, R. Poyanmehr, N. Frey, D. Frank; MLF1 and RND1, two stretch-dependent regulated genes first described in the context of myocardial hypertrophy; Poster, DGK Jahrestagung 2016, Mannheim

A. Kluge, J. Pott, A.Y. Rangrez, A. Bernt, K. Stiebeling, N. Frey, D. Frank; The Role of the Stretch-Responsive Genes Mlf1 and Rnd1 for Cardiac Physiology and Pathophysiology; Poster, BCVS Scientific Sessions 2016, Phoenix

A. Kluge, J. Pott, A.Y. Rangrez, A. Bernt, D. Hassel, N. Frey, D. Frank; Rnd1: A Novel Stretch-Responsive Gene Induces Cardiac Hypertrophy and Proliferation; Poster, e:Med Meeting 2016, Kiel

A. Y. Rangrez, J. Pott, **A. Kluge**, R. Frauen, K. Stiebeling, S. Sossalla, N. Frey, D. Frank; Myeloid Leukemia Factor 1 is a Stress Responsive Modulator of Neonatal Rat Cardiomyocyte Proliferation; Poster, e:Med Meeting 2016, Kiel

A.Y. Rangrez¹, J. Pott¹, **A. Kluge**¹, R. Frauen, K. Stiebeling, S. Sossalla, N. Frey, D. Frank; 2016. Myeloid Leukemia Factor-1 is a Novel Modulator of Neonatal Rat Cardiomyocyte Proliferation. *Biochim Biophys Acta* 1864(4):634-644

A. Kluge¹, A.Y. Rangrez¹, J. Pott¹, A. Bernt, R. Frauen, A. Rohrbeck, N. Frey, D. Frank; 2019. Rho-family GTPase 1 (RND1) is a biomechanical stress-sensitive activator of cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 129:130-143

¹ Diese Autoren haben gleichermaßen zu der Publikation beigetragen.

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Derk Frank für die Bereitstellung des Themas, die Finanzierung dieses Projektes und vor allem für die herausragende Betreuung meinen Dank aussprechen. Danke, dass Du mir stets mit Rat und Tat zur Seite standest und ich die Möglichkeit hatte, in Heidelberg zu forschen und meine Arbeit auf renommierten Kongressen vorzustellen. Herzlichen Dank.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Norbert Frey für die Schaffung hervorragender Voraussetzungen für molekularbiologisches Arbeiten am Herzen danken. Sie haben den Grundstein für den Erfolg dieses Projektes gelegt.

Auch möchte ich mich bei meiner Arbeitsgruppe und dem gesamten Laborteam für die gute und herzliche Zusammenarbeit bedanken. Ich habe mit Euch nicht nur Arbeitskollegen, sondern auch Freunde dazugewonnen. Ein ganz besonderes Dankeschön geht an dieser Stelle an Dr. Ashraf Rangrez und Dr. Alexander Bernt, die zu jeder Zeit für mich ansprechbar waren, mir stets mit konstruktiven Ideen zur Seite standen und mir Lösungswege aufgezeigt haben. Außerdem möchte ich Jost Pott erwähnen, der mit seinem Projekt die Vorarbeiten zu dieser Arbeit lieferte und mich sein begonnenes Projekt fortführen ließ. Es war mir eine große Freude, mit Dir zusammenzuarbeiten.

Natürlich gilt mein Dank neben den Mitarbeitern der AG Molekulare Kardiologie des UKSH Kiel auch Prof. Dr. David Hassel samt seiner Arbeitsgruppe. Sie ermöglichten mir, in Heidelberg mit Zebrafischen zu arbeiten um in absehbarer Zeit meine *in vitro*-erzeugten Daten mit einem Tiermodell betätigen zu können. Danke für die freundliche Aufnahme in Euer Team und die geduldige Hilfe bei der Laborarbeit.

Ein weiteres Dankeschön geht an meinen ehemaligen Deutschlehrer Herrn Werner Mischo, der sich die Zeit genommen hat, wie schon in früheren Zeiten, Rechtschreibung und Grammatik zu korrigieren. Vielen lieben Dank.

Zuletzt möchte ich meinen Freunden und meiner Familie für ihre immerwährende Unterstützung danken. Danke, dass Ihr immer hinter mir gestanden habt und in schwierigen Lebenssituationen stets Verlass auf Euch war. Der größte Dank ist meinen Eltern und meiner Zwillingsschwester Julia gewidmet. Für Eure liebevolle Unterstützung, Euer motivierendes Zusprechen und Euer stets entgegengebrachtes Vertrauen bin ich Euch auf ewig dankbar. Ohne Euch würde ich heute nicht da sein, wo ich bin.

